

**PLASENTA SFEROİD (MİKRO DOKU) MODELİNDE
VORTİOKSETİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF VORTIOXETINE
ON PLACENTAL SPHEROID (MICRO TISSUE) MODEL**

SELEN SANİN

DOÇ. DR. AYSUN KILIÇ SÜLOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Canım Aileme,

ÖZET

PLASENTA SFEROİD (MİKRO DOKU) MODELİNDE VORTİOKSETİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Selen SANİN

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU

Haziran 2021, 125 sayfa

Gebelikte besinlerin maternal-plasental geçişini; annenin beslenmesi ve metabolizması, plasentadan geçiş gradiyenti, utero-plasental ve fetoplasental kan akışı, plasenta bariyerinin yapısı, büyüklüğü ve transfer kapasitesi belirlemektedir. Son yıllarda gebelik süresince maruz kalınan kimyasal madde ve ilaç kullanımında büyük bir artış olmuştur. Ancak, etik kısıtlamalar nedeniyle insanlar üzerinde testler yapılamadığından güncel plasenta bariyer modeli çalışmalarına olan ihtiyaç artmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında, insan plasenta koryokarsinom hücreleriyle (BeWo) birlikte insan göbek kordonu ven hücrelerinin (HUVEC) mono ve ortak kültürleri yapılarak plasenta dokusu iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) sistemlerde modellenmiştir. 3B modelinde iskelesiz bir ortamda Petri Dish® kalıplarıyla sferoidler oluşturulmuş ve hücre lokalizasyonları floresan boyamalar ve çap ölçümleri ile karakterize edilmiştir. Oluşturulan kültürlerde gebelikte kullanımı konusunda literatür bilgilerinde eksiklikler bulunan bir antidepresan etken maddesi olan Vortiksetin 7,5, 15 ve 30 µM'lık konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat boyunca hücrelerle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücre canlılık analizleri (MTS, Kalsein-PI-DAPI) yapılmıştır. Transepitelial elektriksel direnç ölçümü (TEER) ve sodyum floresan (Na-F) geçiş analiziyle bariyer bütünlüğü ölçülmüştür. Plasenta bariyerinin yapısına katılan bağlantı proteinlerinden epitelial (E)-kaderin, hücre iskeleti elemanlarından filamentöz

(F)-aktin ve serotonin taşıyıcısı (SERT) protein lokalizasyonları immunfloresan boyama ile gösterilmiştir. İnsan koryonik gonadotropin (β -hCG) hormon üretim miktarındaki değişiklikler ölçülerek belirlenmiştir.

Vortioksetinin artan dozlarına bağlı olarak 2B gruplarda hücre canlılığı azalmıştır. 3B mikro dokularda ise doz gruplarında Vortioksetinin toksik etkisine karşı direnç gösterilmiş ve canlılık kontrol gruplarından yüksek bulunmuştur. Sferoidler oluşturulurken BeWo, HUVEC ve ortak kültür grupları için çap uzunluğu ve alan ölçümleri inkübasyon süresiyle orantılı şekilde artmıştır. Ayrıca, sferoidlerin CellTracker boyaması ile hücre lokalizasyonları belirlenmiştir. Kalsein-PI floresan görüntüleme ile Vortioksetin uygulamalarının MTS canlılık analizi ile karşılaştırılması yapılarak nitel ve nicel ölçümler elde edilmiştir. BeWo hücrelerinde E-Kaderin, F-aktin ve SERT immünfloresan boyalar yapılarak artan doz miktarlarında inkübasyon süresine bağlı olarak hücrelerarası bütünlüğün bozulduğu, hücreiçi iskelet elemanlarının yapısının değiştiği ve SERT reseptör miktarında azalma olduğu görülmüştür. Aynı zamanda BeWo ve ortak kültür grubunda 2B ve 3B β -hCG hormon miktarı ölçülerek 3B kültür gruplarında daha yüksek miktarda hormon üretimi görülmüştür.

Bu tez çalışması, antidepresan ilacı Brintelliks'in etken maddesi olan Vortioksetinin plasental toksisitesini, bariyer yapısının verdiği yanıtı, hormon üretimini 2B ve 3B sistemlerde kıyaslayarak mono ve ortak kültürleri açısından bir değerlendirme sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: BeWo, HUVEC, plasenta modeli, sferoid, Vortioksetin, TEER, Na-F, E-kaderin, F-aktin, SERT, β -hCG.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF VORTIOXETINE ON PLACENTAL SPHEROID (MICRO TISSUE) MODEL

Selen SANIN

Master of Biology, Department of Zoology

Supervisor: Assoc. Prof. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU

June 2021, 125 pages

Maternal-placental transmission of nutrients during pregnancy, maternal nutrition and metabolism, placental transition gradient, utero-placental and feto-placental blood flow, structure, size and transfer capacity of the placental barrier are determined. In recent years, there has been a great increase in the use of chemicals and drugs during pregnancy, but due to ethical restrictions, the need for current placental barrier model studies has increased as tests cannot be performed on humans.

Within the scope of this thesis, mono and co-cultures of human umbilical cord vein cells (HUVEC) together with human placental choriocarcinoma cells (BeWo) were made and placental tissue was modeled in two and three dimensional systems.

Spheroids were created with three dimensional (3D) Petri Dish® molds in a scaffold-free environment and cell localizations were characterized by fluorescent dyes and diameter measurements. Vortioxetine, the active ingredient of the SSRI type multimodal drug, was exposed to the cultures formed at 7.5, 15 and 30 μM concentrations for 24, 48 and 72 hours. At the end of the incubation, cell viability analyzes (MTS, Calcein-PI-DAPI) were performed. Barrier integrity was measured by transepithelial electrical resistance measurement (TEER) and sodium fluorescence (Na-

F) transition analysis. The localizations of epithelial (E)-cadherin, filamentous (F)-actin and serotonin transporter (SERT) protein from cytoskeletal elements, which are the connecting proteins involved in the structure of the placental barrier, were demonstrated by immunofluorescence staining. It was determined by measuring changes in the amount of human chorionic gonadotropin (β -hCG) hormone production.

Cell viability decreased in 2D groups due to increasing doses of vortioxetine. In the 3D micro-tissues, on the other hand, the dose groups showed resistance to the toxic effect of Vortioxetine and the viability was higher than the control groups. While forming spheroids, diameter length and area increased proportionally with incubation time for BeWo, HUVEC and co-culture groups. Also, cell localization of spheroids was determined by CellTracker staining. Qualitative and quantitative measurements were obtained by comparing calcein-PI fluorescent imaging and Vortioxetine applications with MTS viability analysis. E-cadherin, F-actin and SERT immunofluorescent dyes were applied in BeWo cells, and it was observed that intercellular integrity was impaired, the structure of intracellular skeletal elements was changed, and SERT receptor expression decreased depending on the incubation period at increasing doses. At the same time, the amount of 2D and 3D β -hCG hormones was measured in the BeWo and co-culture groups, and a higher amount of hormone production was observed in the 3D culture groups.

This thesis study presents an evaluation in terms of mono and co-cultures by comparing the placental toxicity of vortioxetine, the active ingredient of the antidepressant drug Brintellix, the response of the barrier structure, hormone production in 2D and 3D systems.

Keywords: BeWo, HUVEC, placental model, spheroid, Vortioxetine, TEER, Na-F
E-cadherin, F-actin, SERT, β -hCG.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca daima bana inanan, kanatlarının altına alıp uçmadan önce yürümeyi öğreten, bilgi ve tecrübelerini her daim aktarıp vaktini ve sabrını asla esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımda aktardığı deneyim, gösterdiği yol ve kazandırdığı tecrübelerle, güler yüzü ve anlayışıyla Sayın Arş. Gör. Dr. Elif KARACAOĞLU'na,

Projenin oluşturulmasında verdiği katkılardan dolayı Prof. Dr. Evrim Arzu KOÇKAYA'ya,

Çalışmamın floresan ölçüm ve görüntüleme analizleri için bizlerle imkânlarını paylaşan Sayın Prof. Dr. Hatice MERGEN'e,

Bilgilerini aktarıp, zamanını ayırarak analiz sonuçlarını almamda desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Arş. Gör. Hayriye AKEL BİLGİÇ'e ve Sayın Arş. Gör. Başak Ezgi SARAÇ'a,

Tez çalışmalarımın başından sonuna kadar desteğini daima hissettiğim, çalışma arkadaşından çok daha fazlası olan Merve DEMİR'e ve Beyza Nur UDUN'a, aynı laboratuvarı paylaştığım tüm arkadaşlarıma,

Çalışmalarımıza 1001-SBAG / 119S511 numaralı proje ile finansal destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na,

Bana her zaman inandıkları ve mesafeleri hissettirmedikleri için, pandemi süreci boyunca ayrı kalmak zorunda olduğum ve sonsuz desteklerini gördüğüm aileme,

Beni yalnız hissettirmedikleri için, her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen Güneri ailesine,

Bana olan inancı, desteği ve yol arkadaşlığıyla Berkay Öztürk'e,

Saygılarımı, sevgilerimi sunar ve içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT | iii |
| TEŞEKKÜR | v |
| İÇİNDEKİLER..... | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | ix |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | xiii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1. Plasenta Dokusu | 3 |
| 2.2. <i>İn Vitro</i> Çalışmalarda Plasenta Hücreleri..... | 8 |
| 2.3. Endotel Hücre Özellikleri ve HUVEC Hücre Hattı | 11 |
| 2.4. İki ve Üç Boyutlu Hücre Kültürü Sistemleri..... | 14 |
| 2.5. Gebelikte Antidepresan Kullanımı..... | 19 |
| 2.6. Brintelliks ve Etken Maddesi Vortiksetin | 20 |
| 2.7. Epitelyal (E)-Kaderin | 22 |
| 2.8. Fibröz (Filamentöz) Aktin (F-aktin) | 23 |
| 2.9. Serotonin Geri Alım Reseptörleri (SERT)..... | 24 |
| 2.10. İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu (β -hCG)..... | 24 |
| 2.11. Hücre Karakterizasyon Testleri..... | 25 |
| 2.11.1. Üreme Eğrisi | 25 |
| 2.11.2. Sterilite Testleri | 26 |
| 2.12. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite Testleri | 27 |
| 2.12.1. MTS Canlılık Analizi | 28 |
| 2.12.2. Kalsein AM- Propidium Iyodit (PI)-DAPI Floresan Boyama ile Canlı ve Ölü Hücrelerin Tespiti | 29 |
| 2.13. Bariyer Bütünlüğünün Ölçümü (Transepitelyel Elektriksel Direnç-TEER) ve Sodyum Floresan Tuzu Akış Analizi (Na-F) | 30 |
| 2.14. İmmünfloresan Boyama | 31 |

| | |
|--|----|
| 2.15. ELISA Yöntemi İle Hormon Miktarının Belirlenmesi | 32 |
| 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR..... | 34 |
| 3.1. Hücre Kültürü Koşulları | 37 |
| 3.1.1. BeWo ve HUVEC Hücrelerinin Üretimi ve Pasajlanması | 37 |
| 3.1.2. BeWo ve HUVEC Hücrelerinin Dondurulması ve Çözdürülmesi | 38 |
| 3.2. Mikoplazma Testi | 39 |
| 3.3. Hücrelerin İkenme Zamanlarının Belirlenmesi | 39 |
| 3.4. Vortioxetin Stok Çözeltilisinin Hazırlanması ve Uygulanması | 40 |
| 3.5. MTS Canlılık Analizi..... | 40 |
| 3.5.1. Mono ve Ortak Kültür Gruplarında MTS Analizi | 41 |
| 3.5.2. Vortioxetin Uygulama Gruplarında MTS Analizi | 41 |
| 3.6. Forskolin Uygulaması..... | 42 |
| 3.7. Sferoidlerin (Mikro dokuların) Oluşturulması..... | 43 |
| 3.7.1 Agar Jellerin Hazırlanması | 43 |
| 3.8. Canlı Hücre Boyama (CellTracker™)..... | 44 |
| 3.9. Kalsein AM-PI-DAPI Floresan Boyama ile Sferoidlerde Canlılık Analizi..... | 46 |
| 3.10. Bariyer Bütünlüğünün Ölçümü (Transepitelyel Elektriksel Direnç-TEER) ve Na- F Akış Analizi..... | 47 |
| 3.11. E-kaderin ve F-aktinin İmmüno Floresan Boyaması..... | 48 |
| 3.12. Serotonin Geri Alım (SERT) Reseptörlerinin İmmüno Floresan Boyaması | 49 |
| 3.13. β -HCG Hormon Seviyesinin ELISA ile Ölçülmesi..... | 51 |
| 3.14. İstatistiksel Yöntemler | 52 |
| 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA | 54 |
| 4.1. Sterilite Testi..... | 54 |
| 4.2. Hücrelerin Üreme Eğrileri ve Morfolojisi | 54 |
| 4.3. İki Boyutlu BeWo Hücrelerinde Forskolin Uygulaması ve E-Kaderin IF Görüntüsü | 55 |
| 4.4. İki Boyutlu Sistemlerde Hücre Canlılık Analizi Sonuçları | 57 |
| 4.4.1. Ortak Kültür Gruplarının Belirlenmesinde MTS Analizi | 57 |
| 4.4.2. Mono ve Ortak Kültürlerde CellTracker Canlı Hücre Boyama Görüntüleri ve Floresan Ölçümü | 59 |
| 4.4.3. Mono ve Ortak Kültürlerde Vortioxetin Uygulamasında Canlılık Analizleri..... | 61 |

| | |
|---|---|
| 4.5. Üç Boyutlu Sistemlerde BeWo ve SynBeWo Gruplarında Canlılık ve Çap Ölçüm Sonuçları..... | 65 |
| 4.6. Üç Boyutlu Sistemlerde Hücre Canlılık Analizi Sonuçları..... | 67 |
| 4.6.1. Ortak Kültür Gruplarının Belirlenmesinde MTS Analizi | 67 |
| 4.6.2. Mono ve Ortak Kültürlerde CellTracker Canlı Hücre Boyama Görüntüleri | 68 |
| 4.6.3. Mono ve Ortak Kültürlerde Vortiksetin Uygulamasında Canlılık Analizleri | 75 |
| 4.6.4. Mono ve Ortak Kültürlerde Kalsein-PI-DAPI Görüntüleri..... | 81 |
| 4.7. Bariyer Bütünlüğünün Ölçümü (Transepitelyel Elektriksel Direnç-TEER) ve Na-F Akış Analiz Sonuçları | 88 |
| 4.8. E-kaderin İmmünfloresan Görüntüleri | 92 |
| 4.9. F-Aktin İmmünfloresan Görüntüleri | 96 |
| 4.10. Serotonin Geri alım Reseptörleri (SERT) İmmünfloresan Görüntüleri | 100 |
| 4.11. β -HCG Hormon Seviyelerinin Ölçüm Sonuçları | 104 |
| 5. YORUM | 108 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 112 |
| ÖZGEÇMİŞ | Hata! Yer işareti tanımlanmamış. |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. Plasenta yapısı ve EVT (Ekstravillöz trofoblast) yapısı, maternal ve fetal kan arasındaki hücre bariyerleri | 4 |
| Şekil 2.2. İnsan plasentanın ilk trimesterdeki yapısı ve hücre tipleri | 5 |
| Şekil 2.3. Villus yapısındaki sitotrofoblast hücrelerinin forskolin uygulanması ile sinsityotrofoblast hücrelerine farklılaşması | 10 |
| Şekil 2.4. Sferoid oluşumu ve ortak kültürlerde endotel hücre kullanımıyla görülen vaskülerize edilmiş doku | 16 |
| Şekil 2.5. Sferoid tabakalarına göre oksijen seviyesi ve pH değişikliği | 18 |
| Şekil 2.6. Sferoid tabakalarına göre gaz, atık ve besin miktarları | 19 |
| Şekil 2.7. Vortioxetin molekülünün kimyasal yapısı | 21 |
| Şekil 2.8. Sferoid agregat oluşumunda hücre bağlantılarının lokalizasyonu | 23 |
| Şekil 2.9. Hücre büyüme eğrisi | 26 |
| Şekil 2.10. MTS tetrazolium tuzunun kimyasal yapısı ve indirgenerek renkli formazan kristallerine dönüşümü | 29 |
| Şekil 2.11. Kalsein boyasının hücre içerisinde floresan boyaya dönüşümü | 29 |
| Şekil 2.12. (A) TEER cihazı ile hücre ekimi yapılmış (B) insertler üzerinde direnç ölçümü. | 31 |
| Şekil 3.1. A. Petri Dish® kalıpları üzerine ısıtılmış ve steril agaroz dökülmesi, B. Agarozların oda sıcaklığında soğuması, C. Katılaştıran agarozu kalıplardan çıkartılması, D. Agarozların hücre ekiminden önce serumsuz besiyeri ile inkübasyonu gösterilmiştir. | 44 |
| Şekil 3.2. 2B sistemde deney planı. | 53 |
| Şekil 3.3. 3B sistemlerde deney planı. | 53 |
| Şekil 4.1. BeWo hücrelerinin üreme eğrisi. | 54 |
| Şekil 4.2. HUVEC hücrelerinin üreme eğrisi. | 55 |
| Şekil 4.3. Hücrelerin inverted mikroskop görüntüleri. A. BeWo, B. HUVEC hücreleri. | 55 |
| Şekil 4.4. Sinsityotrofoblast (SynBeWo) hücre görüntüsü, A. İverted mikroskop görüntüsü, B. E-Kaderin-DAPI floresan görüntüsü, polinükleer hücreler..... | 57 |
| Şekil 4.5. BeWo ve HUVEC 2B ortak kültür gruplarında 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyon sonrası MTS canlılık analizi. | 58 |
| Şekil 4.6. 2B mono ve ortak kültürlerde CellTracker boyama floresan görüntüleri. Yeşil renkte BeWo ve kırmızı renkte HUVEC hücreleri. | 59 |
| Şekil 4.7. 2B ortak kültürlerde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası CellTracker BeWo hücrelerine ait yeşil boyama floresan ölçümleri..... | 60 |
| Şekil 4.8. 2B ortak kültürlerde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası CellTracker HUVEC hücrelerine ait kırmızı boyama floresan ölçümleri..... | 61 |
| Şekil 4.9. BeWo hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat Vortioxetin uygulaması sonrası hücre canlılık yüzde değişim grafiği. | 62 |
| Şekil 4.10. HUVEC hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat Vortioxetin uygulaması sonrası hücre canlılık yüzde değişim grafiği. | 63 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.11. 3:1 BeWo ve HUVEC ortak kültürlerinde 24, 48 ve 72 saat Vortioksetin uygulaması sonrası hücre canlılık yüzde değişim grafiği..... | 64 |
| Şekil 4.12. BeWo ve SynBeWo hücrelerinde 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyon sonrası MTS canlılık analizi. | 65 |
| Şekil 4.13. BeWo ve SynBeWo hücrelerinde 4. ve 8. gün inkübasyon sonrası çap ölçümü..... | 66 |
| Şekil 4.14. Sferoid ortak kültür gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası MTS canlılık analizi. . | 67 |
| Şekil 4.15. 3B BeWo ve HUVEC mono kültürlerde 24, 48 ve 72 saat CellTracker boyama floresan görüntüleri. | 69 |
| Şekil 4.16. 3B BeWo ve HUVEC mono kültürlerde 96 ve 120 saat CellTracker boyama floresan görüntüleri. | 69 |
| Şekil 4.17. 3B 2:1, 3:1 ve 4:1 ortak kültürlerde 24, 48 ve 72 saat CellTracker boyama floresan görüntüleri. Yeşil renk BeWo hücreler, kırmızı renk HUVEC hücreleri | 70 |
| Şekil 4.18. 3B 2:1, 3:1 ve 4:1 ortak kültürlerde 96 ve 120 saat CellTracker boyama floresan görüntüleri | 71 |
| Şekil 4.19. BeWo, HUVEC ve 3:1 oran grubunda agarlara hücre ekiminden 1 saat sonra ve 72 saat sonra agregatlar oluşup Vortioksetin uygulaması yapılmaya başlanan inkübasyon süresi görüntüleri..... | 72 |
| Şekil 4.20. BeWo mono kültürlerinin hücre ekiminden 72 saat sonra sferoid çap ve alan ölçümü. | 73 |
| Şekil 4.21. 3B BeWo ve 3:1 oran grubunun 6 gün boyunca sferoid alan ölçümü..... | 73 |
| Şekil 4.22. 3B BeWo ve 3:1 oran grubunun 6 gün boyunca sferoid çap ölçümü..... | 74 |
| Şekil 4.23. 3B sferoidlerde Celltracker boyama görüntüsü..... | 75 |
| Şekil 4.24. 3B BeWo sferoidlerinde 24, 48 ve 72 saat Vortioksetin uygulaması sonrası hücre canlılık yüzde değişim grafiği. | 76 |
| Şekil 4.25. 3B HUVEC sferoidlerinde 24, 48 ve 72 saat Vortioksetin uygulaması sonrası hücre canlılık yüzde değişim grafiği. | 77 |
| Şekil 4.26. 3B 3:1 oran grubunda 24, 48 ve 72 saat Vortioksetin uygulaması sonrası hücre canlılık yüzde değişim grafiği..... | 78 |
| Şekil 4.27. 3B BeWo sferoidlerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca 7,5 µM, 15 µM ve 30 µM Vortioksetin uygulamasının inverted mikroskop görüntüleri | 79 |
| Şekil 4.28. 3B HUVEC sferoidlerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca 7,5 µM, 15 µM ve 30 µM Vortioksetin uygulamasının inverted mikroskop görüntüleri | 80 |
| Şekil 4.29. 3B ortak kültür oran grubu sferoidlerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca 7,5 µM, 15 µM ve 30 µM Vortioksetin uygulamasının inverted mikroskop görüntüleri | 81 |
| Şekil 4.30. BeWo hücreleri 24 saat 30 µM ve 45 µM Vortioksetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri | 83 |
| Şekil 4.31. BeWo hücreleri 48 saat 30 µM ve 45 µM Vortioksetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri | 84 |
| Şekil 4.32. BeWo hücreleri 72 saat 30 µM ve 45 µM Vortioksetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri | 84 |
| Şekil 4.33. HUVEC hücreleri 24 saat 30 µM ve 45 µM Vortioksetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri. | 85 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.34. HUVEC hücreleri 48 saat 30 μ M ve 45 μ M Vortioksetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri | 85 |
| Şekil 4.35. HUVEC hücreleri 72 saat 30 μ M ve 45 μ M Vortioksetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri | 86 |
| Şekil 4.36. 3:1 ortak kültür oran grubu 24 saat 30 μ M ve 45 μ M Vortioksetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri..... | 86 |
| Şekil 4.37. 3:1 ortak kültür oran grubu 48 saat 30 μ M ve 45 μ M Vortioksetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri..... | 87 |
| Şekil 3.38. 3:1 ortak kültür oran grubu 72 saat 30 μ M ve 45 μ M Vortioksetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri..... | 87 |
| Şekil 4.39. BeWo hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca 15 μ M ve 30 μ M Vortioksetin uygulamasının TEER analizi. | 89 |
| Şekil 4.40. BeWo hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca 15 μ M ve 30 μ M Vortioksetin uygulamasının Na-F analizi..... | 89 |
| Şekil 4.41. HUVEC hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca 15 μ M ve 30 μ M Vortioksetin uygulamasının TEER analizi. | 90 |
| Şekil 4.42. HUVEC hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca 15 μ M ve 30 μ M Vortioksetin uygulamasının Na-F analizi..... | 90 |
| Şekil 4.43. 3:1 oran ortak kültür grubunda 24, 48 ve 72 saat boyunca 15 μ M ve 30 μ M Vortioksetin uygulamasının TEER analizi..... | 91 |
| Şekil 4.44. 3:1 oran ortak kültür grubunda 24, 48 ve 72 saat boyunca 15 μ M ve 30 μ M Vortioksetin uygulamasının Na-F analizi..... | 92 |
| Şekil 4.45. BeWo hücrelerinde kontrol grubunun 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. E-Kaderin, C. Birleştirilmiş görüntüsü. | 93 |
| Şekil 4.46. BeWo hücrelerinde 7,5 μ M Vortioksetin uygulaması 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. E-Kaderin, C. Birleştirilmiş görüntüsü..... | 93 |
| Şekil 4.47. BeWo hücrelerinde 15 μ M Vortioksetin uygulaması 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. E-Kaderin, C. Birleştirilmiş görüntüsü..... | 94 |
| Şekil 4.48. BeWo hücrelerinde kontrol grubunun 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. E-Kaderin, C. Birleştirilmiş görüntüsü. | 94 |
| Şekil 4.49. BeWo hücrelerinde 7,5 μ M Vortioksetin uygulaması 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. E-Kaderin, C. Birleştirilmiş görüntüsü..... | 95 |
| Şekil 4.50. BeWo hücrelerinde 15 μ M Vortioksetin uygulaması 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. E-Kaderin, C. Birleştirilmiş görüntüsü..... | 95 |
| Şekil 4.51. BeWo hücrelerinde kontrol grubunun 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. F-Aktin, C. Birleştirilmiş görüntüsü. | 97 |

| | |
|--|-----|
| Şekil 4.52. BeWo hücrelerinde 7,5 µM Vortioksetin uygulaması 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. F-Aktin, C. Birleştirilmiş görüntüsü. | 97 |
| Şekil 4.53. BeWo hücrelerinde 15 µM Vortioksetin uygulaması 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. F-Aktin, C. Birleştirilmiş görüntüsü. | 98 |
| Şekil 4.54. BeWo hücrelerinde kontrol grubunun 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. F-Aktin, C. Birleştirilmiş görüntüsü. | 98 |
| Şekil 4.55. BeWo hücrelerinde 7,5 µM Vortioksetin uygulamanın 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. F-Aktin, C. Birleştirilmiş görüntüsü. | 99 |
| Şekil 4.56. BeWo hücrelerinde 15 µM Vortioksetin uygulamanın 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. F-Aktin, C. Birleştirilmiş görüntüsü. | 99 |
| Şekil 4.57. BeWo hücrelerinde kontrol grubunun 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyaması inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. SERT, C. Birleştirilmiş görüntüsü. | 101 |
| Şekil 4.58. BeWo hücrelerinde 7,5 µM Vortioksetin uygulaması 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. SERT, C. Birleştirilmiş görüntüsü. | 101 |
| Şekil 4.59. BeWo hücrelerinde 15 µM Vortioksetin uygulamanın 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. SERT, C. Birleştirilmiş görüntüsü. | 102 |
| Şekil 4.60. BeWo hücrelerinde kontrol grubunun 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. SERT, C. Birleştirilmiş görüntüsü. | 102 |
| Şekil 4.61. BeWo hücrelerinde 7,5 µM Vortioksetin uygulaması 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. SERT, C. Birleştirilmiş görüntüsü. | 103 |
| Şekil 4.62. BeWo hücrelerinde 15 µM Vortioksetin uygulamanın 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. SERT, C. Birleştirilmiş görüntüsü. | 103 |
| Şekil 4.63. 2B ve 3B sistemlerde BeWo ve 3:1 ortak kültür oran grubunun 24, 48 ve 72 saatlik Vortioksetin uygulamasından sonra β-HCG hormon seviyelerinin ölçümü. | 105 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 2.1. BeWo hücrelerinin özellikleri [14]. | 11 |
| Çizelge 2.1. İki ve üç boyutlu hücre kültürünün karşılaştırılması [51–54]. | 17 |
| Çizelge 3.1. IF boyamalarda kullanılan solüsyonlar ve malzeme bilgileri. | 35 |
| Çizelge 3.2. Deney gruplarında kullanılan kısaltmalar. | 36 |
| Çizelge 3.2. CellTracker™ boya bilgileri. | 45 |

Çizelge 4.1. BeWo ve HUVEC hücrelerinin Vortiooksetin maruziyeti ile IC₅₀ konsantrasyonları..... 64

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|----|------------------|
| °C | Santigrat derece |
| Ω | Ohm |

| | |
|------|---------------------------|
| IC50 | İnhibisyon konsantrasyonu |
| kDa | Kilo Dalton |

Kısaltmalar

| | |
|--------------|--|
| 5-HT | Serotonin |
| β -hCG | İnsan koryonik gonadotropin |
| BSA | Sığır serum albümin |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-fenil-indole |
| DMEM | Dulbecco's modified eagle's medium |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| EDTA | Etilendiaminotetraasetik asit |
| ELISA | Enzime Bağlı İmmünosorbent Analizleri |
| EVT | Ekstravillöz trofoblast |
| F-aktin | Filamentöz aktin |
| FSS | Fötal sığır serumu |
| HDM | Hücre dışı madde |
| IF | İmmünfloresan |
| MTS | 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum |
| Na-F | Sodyum Floresan Tuzu |
| OD | Optik dansite (Absorbans) |
| PBS | Fosfat tampon çözeltisi |
| PI | Propidyum iyodit |
| PİZ | Populasyon ikilenme zamanı |
| SERT | Serotonin Geri Alım Reseptörü |

| | |
|------|-----------------------------------|
| SSRI | Serotonin Geri Alım İnhibitörü |
| TEER | Transepitelyel Elektriksel Direnç |
| MFI | Mean Flourescence Intensity |

1. GİRİŞ

Günümüzde gebelik süresince görülen psikolojik rahatsızlıkların %8-10 kadarı antidepresan ilaçlar reçete edilerek tedavi edilmektedir. Son yıllarda gebelikte kullanımı artan ilaç ve kimyasal madde miktarı gebe sağlığı, fetüse aktarılan madde miktarı ve embriyonik gelişim açısından riskler taşımaktadır. Gebelikte anne ve bebek arasında seçici geçirgen bir bariyer olarak görev yapan plasentanın yapısında meydana gelen toksik etkiler fetüs sağlığını doğrudan etkilemektedir. Ancak etik kısıtlamalar nedeniyle insanlar üzerinde testler yapılamadığından plasenta modeli çalışmalarına olan ihtiyaç artmıştır [1]. Gebelik boyunca aktif metabolizmaya sahip ve dinamik olarak fizyolojisi değişen bu organın literatürde *in vitro* koşullarda oluşturulmuş ve standart olarak kabul görmüş bir modeli bulunmamaktadır. *In vivo* plasenta dokusunu temsil edebilecek yeni bir plasenta modeli geliştirmek toksisitesinin değerlendirilmesi gereken gıda, kozmetik, ilaç vb. her ksenobiyotik için yeni bir imkân sunmaktadır.

Son yıllarda *in vitro* çalışmalarda sıklıkla tercih edilen üç boyutlu hücre kültürü hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks etkileşimleri, ifade edilen genler, reseptörler ve üretilen salgı maddeleriyle metabolik/morfolojik olarak iki boyutlu hücre kültürüne kıyasla *in vivo* dokuları daha yakından temsil etmektedir [2]. Özellikle plasenta gibi farklı hücre katmanlarından oluşup çeşitli nişler barındıran dokuların modellenmesinde üç boyutlu çalışmalar ortak kültür yapılmasına olanak vermeleriyle ön plana çıkmaktadır. Hücrelerin farklı adhezyon ve kohezyon kuvvetiyle birlikte sahip oldukları biyomekanik özellikler ortak kültürlerde kompleks yapıların aydınlatılmasına olanak sağlamaktadır [3]. *In vivo* plasenta dokusu yalnızca plasenta hücreleriyle değil yapısındaki fetal endotel hücrelerle de desteklenmektedir. Bu nedenle yapılan çalışmada insan plasenta hücresine (BeWo) ek olarak insan göbek kordonu ven endotel hücresi (HUVEC) kullanılmış ve iskelesiz ortamda üç boyutlu sferoidler (mikro dokular) oluşturulmuştur.

Oluşturulan plasenta mikro dokularının etkinliği için literatürde plasenta üzerine toksisitesi ile ilgili yeterli bilgi bulunmayan bir serotonin geri alım inhibitör (SSRI) sınıfına dahil Brintelliks antidepresan ilacının etken maddesi olan Vortiooksetin kullanılmıştır [4]. Yapılan tez çalışmasında BeWo ve HUVEC hücrelerinin iki ve üç boyutlu tekli/ortak kültür modellemesi yapılmış ve etkinliklerinin araştırılması hedeflenmiştir. İki farklı boyutta hücrelerin verdiği yanıt karşılaştırılmış ve plasenta

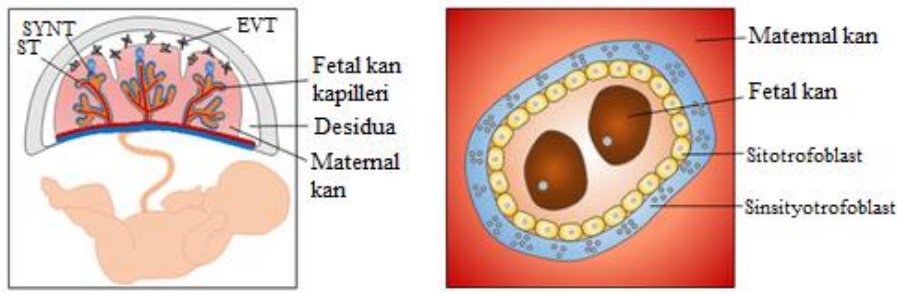
dokusunun Vortiooksetin maruziyeti açısından *in vitro* karşılaştırmalı olarak değerlendirilebileceği veriler elde edilmiştir. Kullanılan BeWo ve HUVEC hücreleriyle literatürde Petri Dish'ler kullanılarak oluşturulan mikro dokular ile yapılan başka bir çalışmaya rastlanmaması tezin özgün kısmını oluşturmaktadır ve literatüre plasenta modeli konusunda büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Plasenta Dokusu

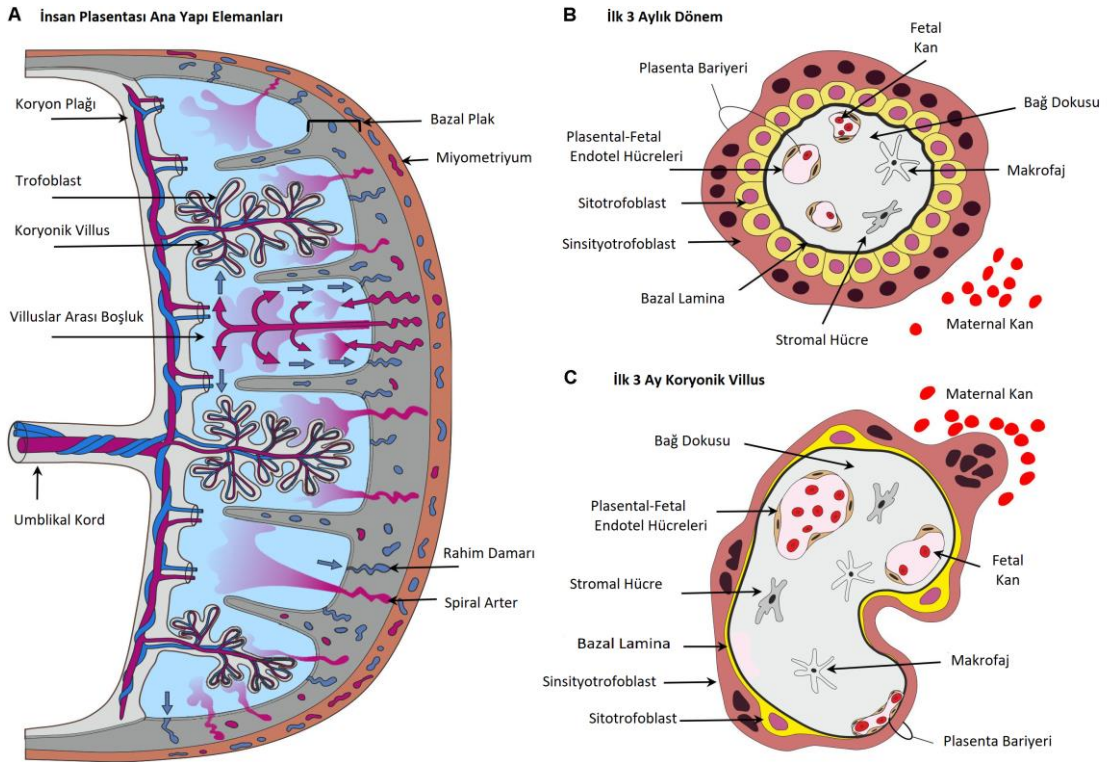
Evrimsel sürecin çok önemli bir basamağını oluşturan sudan karaya geçişle birlikte canlıların geçirdiği çeşitli adaptasyonlar değişen canlı türlerine bağlı olarak, döllenme tiplerinde farklılık göstermiştir. *Chordata* filum üyesi olup *Mammalia* sınıfında bulunan ve *Placentalia* sınıfı üyesi olan *Homo sapiens* türü, internal tipte döllenme ve gelişme göstererek dünya üzerindeki en gelişmiş üreme tipine sahiptir [5]. Memelilerde gebelik genellikle tuba uterinanın ampulla bölgesinde ovulasyon geçiren oosit-2 ve spermin fertilizasyonu ile başlayan biyolojik bir süreçtir. Fertilizasyon aşamasında vitellus dağılışı ve miktarına göre sırasıyla izolesital/alesital tipteki zigot maternal ve paternal kromozomların (haploid) kaynaşmasıyla diploid kromozoma sahip hale gelmektedir [6]. Geçirdiği holoblastik equal hücre bölünmeleriyle blastosist adını alan zigot, gebeliğin 4. gününde uterusu ulaşmaktadır. Blastosist yarıklanmaya devam ederken etrafındaki zona pellusida zarının etkisiyle her bölünmede hücrelerin hacmi giderek azalmaktadır. Morula evresindeki blastomerlerin (12-15 hücre) hacimlerindeki değişiklik iç ve dış hücre kitlesi olarak farklılaşmasına sebep olmaktadır. Bu aşamada uterusu biriken sıvı blastosist etrafındaki zona pellusidayı geçerek kompaksiyon geçirmiş blastosistin içinde blastosöl olarak adlandırılan bir boşluk meydana getirmektedir. İç hücre kitlesi ve blastosöl boşluğu bulunan blastosist, zona pellusidanın dejenere olmasıyla 2-3 gün içinde endometriyuma implante olmaktadır. İmplantasyon, blastosistin iç hücre kitlesinin olduğu embriyonik (animal) kutuptan farklılaşan ilk hücre kitlesi olan ve trofoblast olarak adlandırılan ektoderm kökenli, beslenmeden sorumlu dış hücre kitlesiyle gerçekleşmektedir. Gebeliğin 10. gününde konseptusun trofoblast hücreleri çoğalarak endometriyumda invazyon gerçekleştirir ve koryon tabakasını oluşturmaya başlanmaktadır [7,8] Koryon tabakasının dış yüzeyi desidualizasyon geçirmiş endometriyumun desidua bazalis tabakasının glikojen ve lipitçe zengin mukozasıyla kaynaşarak maternal ve fetal dolaşım arasında gebelik boyunca alışverişi sağlayacak bir doku oluşturmaktadır [9]. Bu sayede maternal ve fetal birliktelik boyunca besin maddesi ve gaz alışverişi, antikör geçişi sağlayan, hormon üreten ve seçici geçirgen özellik gösteren plasenta dokusu oluşur ve doğuma kadar bir bariyer olarak görev almaktadır [10].

Blastosistin iç hücre kitlesinde bu tür fizyolojik ve morfolojik değişiklikler yaşanırken blastosöl ve embriyoblastları çevreleyen trofoblast hücreleri fetal zarları ve plasentayı oluşturmaktadır. Placenta gebelik boyunca pek çok değişim göstermektedir [11,12]. Bu değişimlerden en önemlisi implantasyonu sağlayan trofoblast hücrelerinin gebeliğin 8. gününde iki farklı tabaka oluşturmasıdır; (a) sitotrofoblast tabakası mononükleer hücrelerden oluşurken (b), sinsityotrofoblast tabakası mitoz bölünme geçiren sitotrofoblast hücrelerinin hücre sınırları belirgin olmayan polinükleer hücrelerinden oluşmaktadır (Şekil 2.1.) [13]. Gebelik süresince sitotrofoblast tabakası kesintili hale gelirken sinsityotrofoblast tabakası da incelmektedir. Bunun sonucu olarak placenta dokusu ile gerçekleşen anne ve fetus arasındaki alışverişin miktarı dönemsel olarak farklılık göstermektedir [14]. Bu değişimlerden kaynaklı biyokimyasal ve moleküler etkileşimler gebelik sırasında maternal arayüzden fetal arayüze geçen ksenobiyotiklerin tehlike boyutu ile ilgili kesin bir bilgi sunulmasını engellemektedir [11].



Şekil 2.1. Placenta yapısı ve EVT (Ekstravillöz trofoblast) yapısı, maternal ve fetal kan arasındaki hücre bariyerleri [15].

Placenta'nın kotiledon olarak adlandırılan fonksiyonel birimleri koryon zarından köken almış villus içeren yapılardan oluşmaktadır (Şekil 2.2). Villusların kor bölgesinde fetal kılcal damarların endotel hücrelerini barındıran bol damarlı bir mezoderm, dışta onu çevreleyen sitotrofoblast hücreleri ve en dışta da sinsityotrofoblastlar bulunmaktadır [7].



Şekil 2.2. İnsan plasentanın ilk trimesterdeki yapısı ve hücre tipleri [16].

Diğer primat türlerine benzer olarak *Homo sapiens* plasentadaki villusların lakunar boşluklarda maternal kan ile direkt temas halinde olmasından dolayı hemikoryal tip ile karakterize edilmektedir [14]. Bu tabakalaşma ile plasenta dokusu kan-plasenta bariyerini oluşturmaktadır [17]. Ayrıca insanlarda işlevselliğini kaybetmiş olan vitelluslu arkasındaki küçük bir kese halinde duran allantois koryonun yapısına katılmaktadır. Bu nedenle *Homo sapiens* plasentasını ayrıca koryoallontoik tip plasenta olarak da adlandırılmaktadır [17]. Allantois kesesinden çıkan *arteria umbilicalis* damarları plasenta aracılığı ile fetüse temiz kan taşırken, fetüsten çıkan kirli kanın filtrasyonu için *vena umbilicalis* damarı Warton peltesi içerisine gömülmüş halde göbek kordonunu oluşturmaktadır. İki arter ve bir venin bulunduğu bu yapı maternal ve fetal arayüz arasında madde alışverişine aracılık etmektedir [13].

Plasentada hormonlar implante olmuş fetüsün trofoblast hücreleri ile düzenlenmektedir. Bunlar; temel gebelik hormonu olan insan koryonik gonadotropin (β -hCG), progesteron ve östrojenlerdir [18].

Plasenta, fetüsü zararlı etkenlere karşı koruyan seçici geçirgen bir bariyer olarak kabul edilse de ilaç ve ilaç metabolitlerinin pek çoğu pasif difüzyon ile plasentayı geçip embriyoya ulaşabilmektedir [13]. Plasentanın maternal ve fetal arayüzler arasındaki madde taşınımı endotel tabakası ve sinsityumlu trofoblast tabakası arasında gerçekleşmektedir. Sinsityotrofoblastların plazma zarında taşıyıcı proteinler, enzimler ve hormon reseptörleri bulunmaktadır [14]. Ksenobiyotiklerin maternal ve fetal geçişi plasentadan geçen kan miktarı, gebelik boyunca plasentanın yüzey alanındaki artış ve yaşlanmasından kaynaklı incelenmesi, taşınımında rol alan transfer proteinlerinin dağılımı gibi maternal kaynaklı değişimler ile etkilenmektedir. Bunlara ek olarak, ksenobiyotiğin aktarım boyunca konsantrasyonundaki değişiklikler, kullanılan madde ilaç ise organik yapısına bağlı olarak lipofilikliği, iyonlaşma derecesi, afinitesi, moleküler ağırlığı gibi özellikler ve gradiyentin pH derecesi gibi metabolizma değiştirici faktörlerden de etkilenmektedir. Fetüsün gebelik boyunca büyümesi ve metabolizma hızındaki artış da transfer miktar ve hızını değiştiren faktörlerdendir [19].

Gebelik boyunca maruz kalınan ksenobiyotiklerin transferi, fetüsü doğrudan etkileyebildiği gibi plasenta dokusunun metabolizmasını değiştirerek bebeği dolaylı yoldan da etkileyebilmektedir. Plasenta dokusunun doğru ve tam fonksiyonu tüm gebelik sürecinde kilit nokta olarak rol almaktadır. Dokudaki herhangi bir disfonksiyon fetal gelişimi geriletebileceği gibi doğrudan engelleyebilmektedir. Bu sebeple ksenobiyotiklerin absorpsiyonu, dağılımı, metabolize edilmesi, taşınmasına aracılık eden protein yapılarının iyi anlaşılması gerekmektedir.

Plasentada ksenobiyotiklerin taşıyıcı proteinler ile taşınımı, ATP bağlayıcı kasetlerle (ABC) gerçekleşmektedir. Bu proteinler sinsityotrofoblastların apikal (maternal) ve bazal (fötal) yüzeyinde bulunmaktadır [14]. Hücre zarına gömülü olan bu proteinler ATP harcayarak hücre içerisindeki eksojen kaynaklı ajanları konsantrasyonlarını azaltacak şekilde hücre dışına pompalamaktadır. Gebelikte ilaçların farmakokinetiği plasental taşınımında ABC protein ailesi ile düzenlenmektedir [20]. Bu protein ailesinin üyeleri üç grupta incelenmektedir. (a) P-glikoprotein (MDR1-2-3, ABCB1) sınıfı yapılan immünohistokimyasal çalışmalarla gebeliğin üç trimesterinde de sinsityotrofoblastların apikal ve bazal yüzeyinde ifade edildiği gösterilmiştir [21]. P-glikoproteinler substrat özgünlüğü olarak çok geniş bir spektruma sahiptir ve ilaçların fetal dokulardan maternal kan akışına doğru geri alımında rol almaktadır [14], (b) Çoklu

ilaç direnç proteinleri (MRP1, ABCC1) fetal arayüze ksenobiyotik geçişini engelleyerek bariyer görevi yapmaktadır. Literatürde bu proteinlerin plasentadaki çalışma prensipleri üzerine kesin bir bilgi bulunmamaktadır [20]. (c) Meme kanseri dirençli proteinleri (BCRP) sinsityotrofoblastların apikal yüzeyinde ve koryon villuslarının fetal damarlarında ifade edilmektedir. BCPR'ler P-glikoproteinler gibi sitotoksik ilaçların fetal dokulardan geri alınımından sorumludur. Substrat olarak organik iyonlar, negatif ve pozitif yüklü moleküller, sülfat konjugatları gibi bileşenleri geniş özgünlükle seçip maternal arayüze aktarmaktadır [14,22]. Çözünmüş maddelerin taşınımında ise organik anyon taşıyan polipeptitler (OATP), östrojen sentezine izin veren steroid sülfatların taşınmasında rol oynayan organik anyon taşıyıcılar (OAT), monoaminler (serotonin, dopamin, norepinefrin ve histamin) için yüksek bir afinite gösterip ve maternal kandaki fazla konsantrasyonu düşüren organik katyon taşıyıcılar (OCTN1), hücre dışı monoamin konsantrasyonlarını düzenleyip amniyotik sıvı ve fetal dolaşımında homeostazın korunmasında rol alan monoamin taşıyıcılar (Serotonin taşıyıcı (SERT), norepinefrin taşıyıcılar (NET)) bulunmaktadır. Fetüsün gelişiminde rol alan tiroid hormonları monokarboksilat taşıyıcılar (MCT), DNA replikasyonu, vitamin metabolizması ve aminoasit sentezinde substrat olarak gerekli olan folik asit (B9 vitamini) ise folat taşıyıcılar (FR α) ile maternal kandan plasentaya taşınmaktadır [14,23].

Fetal kapiller ve maternal kan arasında madde alışverişinin yaşandığı bölge incelendiğinde ve burada emilimi sağlayan mikrovillusların sayısının azalmasıyla pasif difüzyon her zamankinden daha çok gerçekleşmektedir [10].

Moleküler boyutu ~600 Dalton ağırlığındaki ve lipofilik özellikteki antidepresanlar gibi ksenobiyotik ve biyolojik moleküller, pasif difüzyon ile plasentadan kolayca geçebilmektedir [20]. Pasif difüzyon, antidepresan transferinin başlıca mekanizması olsa da aktif hücresel taşınım ve plasental metabolizma gibi diğer faktörler de antidepresanlar arasında görülen geçiş farklılıklarına neden olmaktadır. Bu nedenle plasentanın yapısında ve dolayısıyla işlevinde meydana gelen değişimler ilacın fetüse geçiş oranını belirlemektedir [10].

2.2. *In Vitro* Çalışmalarda Plasenta Hücreleri

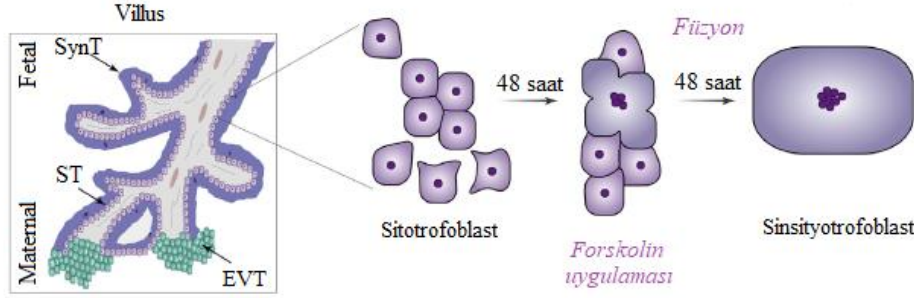
Plasenta dokusunun araştırma amaçlı kullanımı için elde edilmesinde üç farklı yol tercih edilmektedir. Sezaryen doğum yapan kadınlardan etik izin sonrası plasenta dokuları alınabilmektedir. *In vivo* ortamdan alınmış plasentadaki kanı uzaklaştırmak için öncesinde tampon çözeltiler ile perfüze edilir ve bu sayede plasentadaki fonksiyonel birim olan kotiledon yapısı görünür hale getirilir. Kotiledon, maternal ve fetal kan akışını taklit etmesi için hazırlanmış tampon çözeltilerin bulunduğu iki farklı rezervuarın bağlandığı ortak bir bölme yerleştirilir. Transferi veya toksisitesi incelenecek ilaç maternal kan akışını temsil eden rezervuara yüklenmektedir. İlacın varlığı sistemde izlenmektedir. Uygun tüm şartlar sağlansa bile sistemin sürdürülebilirliği laboratuvar ortamında birkaç saat ile sınırlıdır [24]. Bununla birlikte plasentanın doğum sürecinde zarar görmesi veya rezeksiyon sırasında dokunun metabolik olarak aktif olmaması gibi ihtimallerden dolayı perfüzyon kotiledon modellerinden elde edilen veriler tam anlamıyla gerçeği yansıtamamaktadır. Modelle ilgili bir başka kritik nokta zamansal olarak fetüsün ilk trimesterdeki ksenobiyotiklerle karşı karşıya kaldığı toksisitesiyle ilgili bilgi veremiyor olmasıdır. Ayrıca taşıyıcı ve enzimlerin bireysel farklılıkları gebelik süresince dinamik olarak değiştiğinden elde edilen veriler gebelik sürecini tam olarak yansıtamamaktadır [10]. Bu faktörlerin tümü göz önüne alındığında perfüze plasenta modellerinin büyük bir dezavantaja sahip olduğu ve deneysel verilerin önemli ölçüde kabul edilebilir olmadığı düşünülmektedir [25].

Plasenta dokusundan elde edilen primer sitotrofoblast hücrelerinin kültürü ile de *in vitro* ortamda çalışılması mümkündür. Petri kaplarında uygun besiyeri ile inkübe edilen izole primer hücreler *in vivo* ortamındaki gibi kültür ortamında da hormon salgılamaktadır. Sitotoksiste ve hücre alım testlerinde kullanılabilen primer sitotrofoblast hücreleriyle çalışmanın bazı dezavantajları bulunmaktadır. Primer sitotrofoblast hücreleri kültürlendiklerinde herhangi bir dış etki olmaksızın sinsityumlanarak sinsityotrofoblast hale gelmektedir. Bu dönüşüm hücrelerin tutundukları yüzeyde boşluklar yaratmaktadır. Dolayısıyla transfer çalışmalarındaki önemli bir kriter olan tek tabakayı oluşturup gerçek bir bariyer olarak görev yapamamaktadır. Diğer bir dezavantaj ise primer sitotrofoblast hücrelerinde tekrarlanabilir hücre popülasyonu elde edilemediği için alınan veriler istatistik açısından anlam taşımamaktadır [14]. Perfüze doku ve primer kültür yöntemleriyle karşılaştırılacak olursa ölümsüzleştirilmiş hücre hatları kullanılarak

yapılan çalışmalar büyük avantaj sağlamaktadır. *In vitro* çalışmalarla pasajlanabilen ve pasajlandığı takdirde morfolojileri değişmeyen hücre hatları elde edilmiştir. Gebe koryokarsinomundan türetilen hücre hatları arasında BeWo, JEG-3 ve JAr hücreleri bulunmaktadır. Bu hücre hatlarının morfoloji ve biyokimya özelliklerinin normal trofoblastlarla karşılaştırılması için kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır [24,25]. Plasenta dokusunda nadir olarak rastlanan malignan tümör tipi olan koryon epitelyoma anormal olarak hamilelik sonrasında yüksek miktarda gonadotropin hormonu sentezlemesiyle karakterize edilmektedir. Histolojik incelemelerde bu tümörün farklılaşmamış ve tek çekirdekli halde bulunan sitotrofoblast hücreleri olduğu anlaşılmıştır. Proliferasyon yeteneğinin fazla olması, çok çekirdekli sinsityotrofoblast hücrelerine dönüştürülebilmesi ve hamilelikte bir belirteç olarak kullanılan β -hCG hormonunu sentezlemesi bu hücrelerin ölümsüz hale getirilip *in vitro* ortamlarda kullanımını avantajlı hale getirmiştir. BeWo hücreleri olarak adlandırılan bu hücreler, plasenta dokusundaki trofoblast hücrelerinin morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini hormon sekresyonu ve birkaç tip interlökinin dâhil olduğu sitokin ifadesi ile göstermektedir (Çizelge 2.1). İnsan plasentasından izole edilen ve ilk kez 1968 yılında Pattillo ve Gey tarafından ölümsüzleştirilen BeWo hücreleri yaklaşık 40 yıldır plasenta dokusunu yansıması amacıyla *in vitro* çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir [14,26]. BeWo hücreleri çoğaltıldıkları ortamda kümeli üreme tipine sahiptir. Oluşturdukları hücre kümelerinin apikal yüzeylerinde ise yoğun miktarda mikrovillüslara sahiptirler. Bu sayede elektrik akımıyla yapılan geçirgenlik testlerinde transepitelyal direnç göstermektedir ve paraselüler maddelerin transfer miktarıyla plasenta bariyerini yansıttığı kanıtlanmıştır. Hücrelerin gösterdiği bu direnç hücreler arasındaki sıkı bağlantılar ile desteklenmektedir [14].

BeWo hücreleri kültür ortamında dışardan uygulanan forskolin maddesiyle sinsityumlanarak sinsityotrofoblast hücre özelliği kazanmaktadır. Forskolin, hücre içi sinyal aktarımında kullanılan ikincil habercileri (cAMP) indüklemektedir [27]. Bu sayede ilk trimesterdeki sitotrofoblast hücrelerinin morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini gösteren BeWo hücreleri olgunlaşarak gebeliğin son trimesterindeki sinsityotrofoblastlara dönüşmektedir. BeWo hücrelerinin sinsityumlanarak füzyon hale gelmesi (sinsityotrofoblast) sinsitin-1 ve sinsitin-2 gibi zarf proteinlerinin plasentaya özgü reseptörler ile etkileşime girmesiyle gerçekleşmektedir (Şekil 2.3). Forskolin maddesinin uygulanması da bu zarf proteinlerinin ifadesini arttırmaktadır. Proteinler ile

etkileşime giren reseptörlerin miktarındaki düşüş ise doğru orantılı olarak hücrelerin füzyonunu azaltmaktadır. Bu koşullar altında BeWo hücreleriyle çalışmanın en büyük avantajı erken ve geç gebelik dönemindeki trofoblast hücrelerinin farklılaştırılarak tek bir hücre hattı ile yansıtılabilmesidir. BeWo hücrelerinde madde taşınımı ise *in vivo* plasenta dokusuna benzer olarak P-glikoprotein, MRP-2, BCRP, MDR1-3 ve SERT reseptörleri ile gerçekleşmektedir [14].



Şekil 2.3. Villus yapısındaki sitotrofoblast hücrelerinin forskolin uygulanması ile sinsityotrofoblast hücrelerine farklılaşması [28].

BeWo hücrelerinin enzimatik reaksiyonları genelde karaciğerde bulunan sitokrom P450 enzim ailesi ile gerçekleşmektedir. Ekstrahepatik sitokrom P450 enzimleri (CYP) plasenta dokusundaki ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunu sağlayan Faz I ve Faz II reaksiyonlarında görev almaktadır. Plasentada bulunan CYP enzimleri gebeliğin ilk aylarında daha fazla ifade edilirken ilerleyen dönemlerde miktarı azalmaktadır. Plasentadaki ekstrahepatik CYP ifadesi karaciğere kıyasla oldukça azdır ve *in vitro* ortamda da buna bağlı olarak daha az ifade edilmektedir. Fakat ksenobiyotik sitotoksitesisi çalışmalarında *in vivo* plasenta dokusunu yeterli miktarda yansıtmaktadır [14]. Plasentadan izole edilen hücrelerde, detoksifikasyon sağlayan CYP4B1 ve CYP19 enzimleri bulunmuştur. Bu enzimler ayrıca steroid aromataz olarak görev yapıp androjenlerden östrojen üretimini sağlamaktadır. Bunun dışında CYP1A1, CYP1B1 CYP2E1 ve CYP3A enzimleri de plasentada ifade edilmektedir. BeWo hücreleri ise plasenta dokusuna benzer olarak CYP19, CYP1A1 ve CYP3A4 enzimlerini ifade etmektedir. Plasentadaki CYP enzim miktarının azlığı Faz I ve Faz II reaksiyonlarının yeterli miktarda gerçekleşmemesine sebep olmaktadır. Bu durum metabolit aktivasyonunu düşürmediğinden fetotoksitede gözardı edilmemektedir. Bu durum

çeşitli teratojenik bulgular yaratmakta ve anormal intrauterin büyüme geriliği ortaya çıkarmaktadır [29].

Çizelge 2.1. BeWo hücrelerinin özellikleri [14].

| BeWo Hücre hattı | |
|-------------------------|--|
| Gen düzeyinde ifade | Progesteron İnsan koryonik gonadotropin (HCG-B), İnsan plasental laktogen (HPL) (İnsan koryonik Somatomammotropin) Östrojen, östron, östriol, östradiol. İmmunoperoksidaz boyama da keratin için pozitifdir. |
| Hüresel düzeyde ifade | Progesteron İnsan koryonik gonadotropin (HCG-B), İnsan plasental laktogen (HPL) (İnsan koryonik Somatomammotropin) Östrojen, östron, östriol, östradiol. Keratin |
| Metabolik enzim ifadesi | CYP1B, CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 |

JEG-3 ve JAr hücre hatları ise gebe koryokarsinomundan elde edilmiştir. JEG-3 hücreleri kültür ortamında sinsitiotrofoblastların biyolojik ve biyokimyasal özelliklerini göstermelerine rağmen, sitotrofoblast hücrelerine özgü olarak mononükleerler ve forskolin maddesinin uygulanmasıyla polinükleer forma dönüşmemektedir. JAR hücreleri ise sitotrofoblast hücrelerine benzemektedir. Bu iki hücre hattında ortak olarak belirlenen taşıyıcıların (P-gp, MRP, BCRP) ifadelerinde miktar olarak farklılıklar bulunmaktadır. Ayrıca hücrelerin tek tabaka oluşturup transfer çalışmalarında kullanılabilmesi üzerine literatür bilgileri kısıtlıdır ve genişletilmesi gerekmektedir [14].

2.3. Endotel Hücre Özellikleri ve HUVEC Hücre Hattı

Damarlar histolojik farklılıklarından ötürü en dışta tunika adventisya, ortada tunika media ve lümene en yakın bölgede tunika intima olarak adlandırılmaktadır. Tunika intima bölgesi lümene göre içten dışa endotel hücre tabakası, bazal lamina ve subendotel tabaka olarak üç bölüme ayrılmaktadır. Endotel hücreleri işlevlerine göre buldukları dokularda yapısal farklılıklar göstermektedir. Hücrelerin arasındaki sıkı bağlantıların yoğun olduğu ve madde geçişinin pinositotik veziküller aracılığıyla az miktarda gerçekleştiği kapiller sistemi sürekli (fenestresiz, kesintisiz) kapiller olarak adlandırılmaktadır. Plasenta gibi kan ile aralarında bariyer olan yapılarda sürekli kapiller görülmektedir [30]. Endotel hücrelerinin hücre-hücre ve hücre-hücreler arası madde etkileşimleri sayesinde doku bütünlüğünün korunması ve sinyalizasyonu sağlanmaktadır.

Sıkı bağlantılarla biraraya gelmiş endotel hücrelerinin esas işlevi damar içerisindeki vasküler bütünlüğü sağlayarak geçirgenliği azaltmaktır. Bununla birlikte sağlıklı bir damar yapısında endotel hücreleri antitrombotik işlev göstererek pıhtılaşmayı ve trombosit yapışmasını engellemektedir. Endotel tabaka bütünlüğünün bozulduğu bölgelerde ise pıhtılaşma sağlanmaktadır. Bu sadece endotel hücrelerinin sitoplazmasında bulunan Weibel Palade granülleri içerisindeki von Willebrand faktörlerinin yardımıyla gerçekleştirir. Von Willebrand faktörleri kan kaybını azaltacak trombüs oluşumunu meydana getirmektedir [31]. Kısaca endotel hücreleri sağlıklı kan akışı için pıhtılaşmayı engellerken bunun aksinin gerçekleştiği durumlarda pıhtılaşmayı sağlayarak homeostazı korumaktadır.

Endotel hücrelerinin bir diğer görevi damar yapısında morfolojik farklılıklar yaratarak kan akış hızını değiştirmektir. Nitrik oksit (NO) ve prostosiklin (prostaglandin-I2) salgılayarak vazodilatör etki yaratıp damar çapında daraltma meydana getirmektedir. Vazokonstrüktör etki için ise trombosit aktive edici faktör (PAF) ve endotelin-1 salgılayarak damar çapındaki genişlemeyi arttırmaktadır [32]. Bu sayede doku ve organlar ihtiyaç duyduğu kan seviyesine damarların genişlemesi veya daralmasıyla ulaşabilmektedir.

Endotel hücreleri sahip oldukları yüzey reseptörleri ile vaskülogenez ve anjiyogenez olarak adlandırılan iki sürecin gerçekleşmesinde önemli rol oynamaktadır. Vaskülogenez damar oluşum basamağının ilk adımıdır [33]. İntraembriyonik ve ekstraembriyonik kan damarlarının oluşumu aynı embriyonik dönemde gerçekleşmektedir. İlkel kan adacıklarını oluşturacak prekürsörler ekstraembriyonik visseral mezoderm (şıplanik) içerisindeki mezenşimal hücrelerdir. Mezenşimal hücreler farklılaşarak hematopoietik kök hücreler ve anjiyoblast hücrelerini oluşturmaktadır. Hematopoietik kök hücreler kan adacıklarını oluştururken, anjiyoblastlar endotel hücrelere farklılaşmaktadır. Aynı şekilde göbek kordonu içerisindeki mezenşimlerin farklılaşmasıyla oluşan anjiyoblastların sefalik yönde hareketiyle ilkel kan damarları oluşmaktadır. Ekstraembriyonik ve intraembriyonik damarların yoğunlaşp biraraya geldiği bölgelerde embriyo ve maternal arasında ilk plasenta taslağı görülmektedir [13]. Vaskülogenezde primer kapiller pleksusun oluşumu implante olmuş embriyonun trofoblastlarınca salınan çeşitli büyüme faktörleri aracılığıyla gerçekleşmektedir [34]. Bunlar; Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2) ve

neuropilin-1'dir. Yukarıda bahsedilen indüklenmelerde reseptör veya VEGF eksikliği sonucu hematopoiez oluşumu gerçekleşmemektedir. Dolayısıyla kan hücrelerinin oluşumu ve endotel hücrelerinin farklılaşması engellenirse damar oluşumu da olumsuz yönde etkilenmektedir. Bunun sonucunda embriyoda malformasyon veya erken ölüm görülebilmektedir [35].

Çalışmada kullanılan HUVEC hücreleri 1988 yılında Hideyuki Ide ve arkadaşları tarafından ölümsüzleştirilmiş ve *in vitro* çalışmalar için primer hücrelere kıyasla uygun hale getirilmiştir. Primer HUVEC hücreleri göbek kordonu venlerinden izole edilip kültüre edildikten sonra *Polyomaviridae* familyasından Simian virüsü (SV40) ile transdüke edilmiştir. Bu sayede hücrelere viral yöntemle aktarılan rekombinant DNA, genoma entegre olmuş ve protoonkogenlerin uyarımı ile hücreyi ölümsüz hale getirmiştir [36]. Hücrenin *in vitro* çalışmalarda yüksek proliferasyon göstermesi, kolay pasajlanması ve pasajlandığında karakteristik özelliklerini yitirmemesinden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir [37]. Ayrıca HUVEC hücreleri, dolaşım sisteminde bulunan endotel hücrelerine biyolojik olarak en çok benzerlik gösteren hücre tipidir [32].

Vasküler endotelial hücre özelliklerini taşıyan HUVEC hücreleri su, çözünen maddeler, elektrolitler için kan ve altta yatan dokular arasında geçişi için seçici bir bariyer olarak kritik bir rol oynamaktadır. Endotel hücreler bu özellikleriyle plasenta bariyerine katkı sağlamaktadır. Bu hücreler, vasküler bozuklukların fizyolojisinde, doku mühendisliğinde biyomateryalleriyle ve farmosötik çalışmalarla birlikte azoregülasyon, pıhtılaşma, fibrinoliz, ateroskleroz çalışmalarında kullanılmaktadırlar [38].

HUVEC hücrelerini, von Willebrand faktörü ve endotele özgü yapışma molekülü, CD31 gibi endotel hücrelerine özgü belirteçlerin ifadesi, büyüme faktörleri için reseptörlerin ifadesi, sitokinler, vazoaktif ligandlar ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) için dönüştürücü sinyal yolları, transforme edici büyüme faktörü- β , tümör nekroz faktörü (TNF) ve anjiyotensin II de dahil olmak üzere doğal vasküler endotel hücrelerinin neredeyse tüm özelliklerini taşımaktadır [39]. Üç boyutlu *in vitro* çalışmalarda oluşturulan sferoidlere HUVEC hücrelerinin desteği ile vasküler ağ modellenen yapıya katılarak sferoidin *in vivo* ortamına daha yakın bir şekilde büyümesine izin vermektedir [2,33].

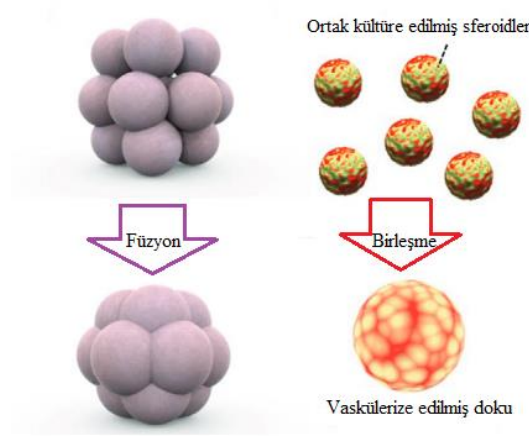
2.4. İki ve Üç Boyutlu Hücre Kültürü Sistemleri

Gelenekselleşmiş iki boyutlu hücre kültürüne kıyasla, üç boyutlu hücre kültürünün sağladığı doku taklidi çeşitli yönleriyle öne çıkmaktadır. *In vitro* çalışmalarda incelenilen tüm hücreler için ortak bir süreç geçerlidir. Bu süreç hücrenin bölünmesi, olgunlaşması ve ölümünü kapsayan mekanizmalar bütünü olarak ifade edilebilir. Tüm bu karmaşık biyolojik süreci kapsayan araştırmalar hücre-hücre ve hücre-HDM etkileşiminin maksimum verim ile elde edilebildiği yöntemlerde anlamlılık kazanmaktadır. Sitoloji çalışmalarında doğru hücre seçimi kadar doğru niş seçimi de önemlidir. Bu sebeple hücrelerin sert bir zemine tutunarak adherent bir şekilde çoğaldığı ortamlardansa hücrelerin HDM bileşenleri ile etkileşimde olduğu ortamlar hücre davranış çatısı altında ön planda tutulmaktadır. Üç boyutlu hücre kültürlerinde hücrelerin canlı organizmalarda yaşanan dinamiklerini yansıtan pek çok parametre bulunmaktadır [40].

Tek tabakalı ve homojen olarak kültüre edilen hücre araştırmalarından sonra hücre çoğalması, hücre göçü, sinyalleşme, farklılaşma gibi içerisinde karmaşık biyolojik süreçler barındıran araştırmaların üç boyutlu hücre kültürlerinde incelenmesinin bilimsel açıdan daha doyurucu olduğu görülmüştür. Canlı organizmalardaki dokuya özgü dinamik niş ve hücrenin çevresiyle etkileşimlerinin en doğru şekilde yansıtılması için *in vitro* ortamlarda bu simülasyonu ancak hücrelerin kendiliğinden ürettiği HDM veya HDM'nin bileşenlerini taklit edebilecek yapay iskele kullanılarak oluşturulmaktadır. Hücrenin doku bütünlüğünde destek aldığı doğal matriks elemanlarını yansıtan biyolojik ve fizyolojik olarak uyumlu sentezlenmiş yapay iskeleler üç boyutlu hücre kültüründe sıklıkla tercih edilmektedir. Bununla birlikte üç boyutlu hücre kültürünü oluşturmanın bir diğer yolu ise iskele kullanmadan ve hücrelerin iki boyutlu hücre kültürünün aksine tutunacakları bir substrat olmadan -kendiliğinden- biraraya gelmesidir. Bu iki yöntem tamamen ortaya konulan hipotez ve amaç doğrultusunda birbirinin önüne geçmektedir. Kemik ve kıkırdak gibi sert doku bütünlüğü görülen ve hücre bazında incelenen araştırmalarda iskeleli kültürler tercih edilirken, mide, beyin ve plasenta gibi yumuşak dokulardaki *in vivo*ya en yakın ifadeler hücrenin kendiliğinden biraraya geldiği ve mikro doku oluşumuna yönlendiği modellerde incelenmesi daha uygun olmaktadır. Üç boyutlu hücre kültürü bu anlamda hücreler için mekanik, kimyasal ve yapısal anlamda hücreleri destekleyici yönüyle öne çıkmaktadır [41,42].

Hücrelerin kültüre edileceği ideal iskele özellikleri şu şekilde sıralanmaktadır; iskele yapısını oluşturan malzemelerin hücreler üzerinde toksik etkisinin olmaması gerekmektedir. İskele *in vivo* ortam için biyouyumlu aynı zamanda biyobozunur olmalıdır. Hücrelerin iskeleye tutunması ve göç hareketini yapabilmesi için uygun yapışma özelliklerine sahip ve metabolitlerin, atıkların, besin maddelerinin difüzyonu için uygun por büyüklüğünde sentezlenmelidir. Bu sayede biyolojik ortamın taklidi sağlanmış ve hücrelerin *in vivo* ortamına yakın niş sağlanmaktadır [43]. Oluşturulacak iskele temelinde doğal veya sentetik polimer malzemelerden elde edilebilmektedir. Doğal iskeleler kollajen, jelatin gibi hücre HDM bileşenlerini barındırmaktadır. Sentetik iskeleler ise poliamid, polivinilalkol, polyester gibi ticari malzemelerden oluşmaktadır. Oluşturulan iskeleler temel malzemesine göre hidrojel, matrijel, kriyojel, nanolif veya seramik yapısında amacına uygun olarak kullanılmaktadır [41].

Üç boyutlu hücre kültürü ortamlarında mikro dokular, hücrelerin tutunma yüzeyi en aza indirilerek dolayısıyla iskele desteği olmadan ve kendiliğinden biraraya gelme yetenekleriyle oluşmaktadır (Şekil 2.4.). Hücrelerin sahip olduğu adhesif ve kohesif kuvvetler tabakalaşma yaratarak hücrelerin birarada bulunmasını sağlamaktadır. Bu şekilde oluşan mikro dokuların temeli Diferansiyel Adezyon Hipotezi (DAH) olarak adlandırılmaktadır. Hücrelerin sahip olduğu bu çekim kuvvetleri oluşan mikro dokunun periferinde veya merkezinde yer almasına göre yön vermektedir. Kohesif kuvveti yetersiz hücreler mikro dokunun periferine yerleşirken, kohesif kuvveti fazla olan hücreler mikro dokunun merkezinde bulunmaktadır. Bu iki karakteristik özellik dışında hücrelerin yüzey yapışma molekülleri ve hücre iskelet elemanlarının etkisiyle oluşan biyomekanik özellikleri de mikro doku oluşumunda önemli bir role sahiptir [44]. Şekil 2.5 ve Şekil 2.6'da sferoid tabaklarına göre sahip oldukları heterojen gradiyent gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Sferoid oluşumu ve ortak kültürlerde endotel hücre kullanımıyla görülen vaskülerize edilmiş doku [2].

Mikro doku oluşumunu sağlayacak üç farklı yöntem bulunmaktadır. Zorla yüzdürme tekniği, hücrelerin tutunamayacağı non-adheziv yüzeylerde hücreler kendiliğinden biraraya gelerek mikro dokular oluşturmaktadır. Asılı damla tekniğinde, yaklaşık 20 μL 'lik hücre süspansiyonları bir yüzeye damlatıldıktan sonra düzenek ters çevrilerek mevcut damlanın içerisindeki hücrelerin yüzey gerilimi sayesinde kendiliğinden bir araya gelmesi sağlanmaktadır [45]. Son olarak yüzdürme tekniğiyle mikro doku oluşumunda ise biyoreaktörlere alınan hücrelerin reaktör içerisindeki pervane ile yörünge yaratılması sonucu veya reaktörlerin direkt santrifüj edilmesiyle bir itme-çekme kuvveti yaratılıp mikro dokular oluşturulmaktadır [46]. Bu üç tekniğin ortak noktası hücrelerin tutundukları yapışkan bir yüzey olmaması ve genelde döndürücü bir etkisinin olmasıdır [47].

Üç boyutlu kültür sistemlerinde hücrelerin salgı maddeleri, hücre yüzey proteinleri, ifade ettikleri gen düzeyleri, sinyalizasyon, proliferasyon, metabolik ve morfolojik gelişimleri iki boyutlu kültür sistemine göre *in vivo* sistemi daha iyi yansıtmaktadır ve son yıllarda pek çok araştırmacı tarafından sıklıkla tercih edilmektedir (Çizelge 2.2) [48].

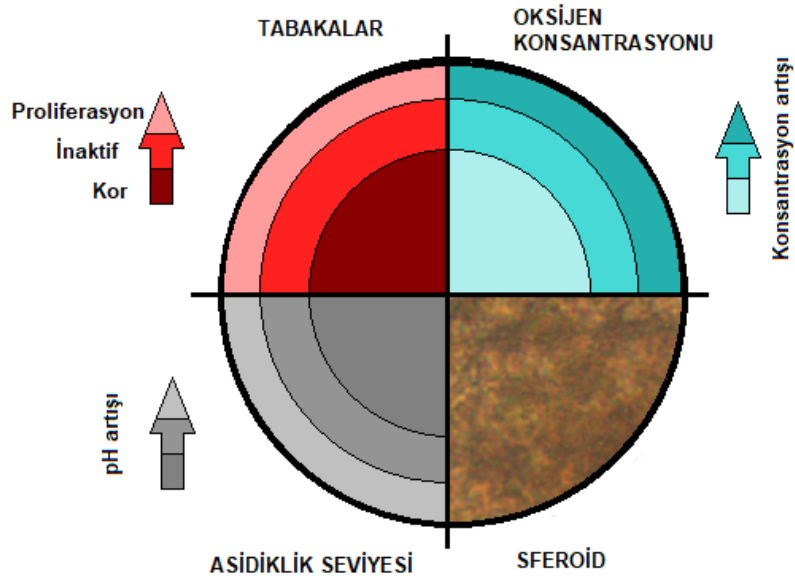
Üç boyutlu hücre kültüründe iskeleli veya iskelesiz ortamda oluşturulan mikro dokuların ilaç direncinin 2 boyutlu sistemlere göre daha fazla olması ilaç geliştirmede ve uygun doz belirlemede uygun yanıt vermektedir [49].

In vivo ortamı daha yakından yansıtan modeller tedavi yanıtlarının incelenmesi ve mevcut tedavileri iyileştirmek adına büyük kolaylık sağlamaktadır [50].

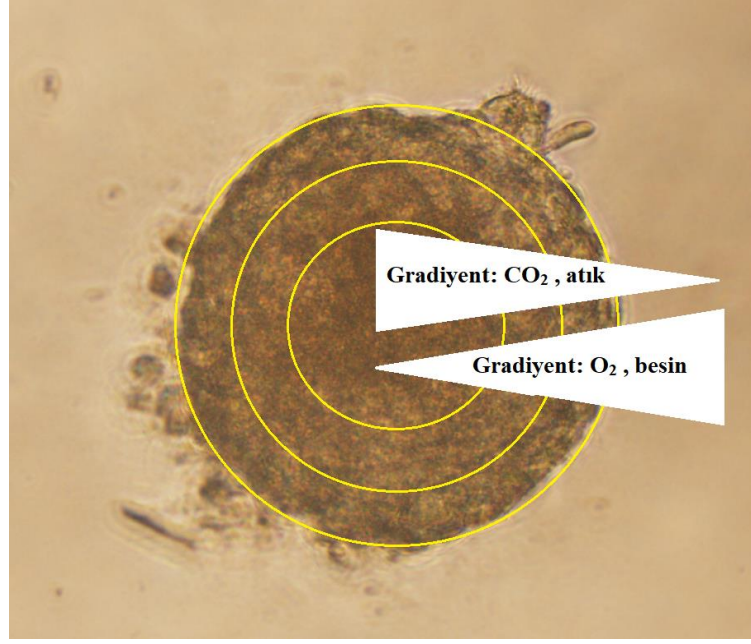
Çizelge 2.2. İki ve üç boyutlu hücre kültürünün karşılaştırılması [51–54].

| | Avantajlar | Dezavantajlar |
|----------------------------------|---|--|
| İki Boyutlu Hücre Kültürü | <ol style="list-style-type: none"> 1. Maliyeti düşüktür. 2. Zengin literatür içeriği mevcuttur. 3. Uygulanacak analizlerin protokolleri belirlenmiş ve yaygın şekilde kullanılmaktadır. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Tek tabakalı hücre morfolojisi orijinal doku yapısına benzememektedir. 2. Hücreler sert ve düz zemine tutunduğundan fenotipik açıdan yetersizdir. 3. <i>In vivo</i>nun aksine oksijen, besin ve metabolit gibi bileşenlerin alımı homojenite gösterir. |
| Üç Boyutlu Hücre Kültürü | <ol style="list-style-type: none"> 1. Hücre-hücre-HDM bağlantısı vardır. 2. Her yöne hücre çoğalmasıyla korunmuş morfoloji ve fenotip görülür. 3. Tümör dokusu mikro ortam taklidi yaratılır. 4. Sferoidlerde HDM üretimi iskele ile desteklenen kültüre oranla daha fazla görülür. 5. Hücre sayısına bağlı sferoid çapı/hacmi kontrol altında tutulabilir. 6. Pro-anjiyojenik faktör üretimiyle anjiyogenez indüksiyonu, pre-vaskülerizasyon sinyalleri üretimi görülür. 7. Bariyer doku oluşturmada <i>in vivo</i>'ya yakın sonuçlar elde edilir. 8. Difüzyon gradiyentinde kültür koşullarının dinamik kontrolü sağlanır. 9. Hücrelerde <i>in vivo</i> doku gibi oksijen, besin ve metabolit gibi bileşenlerin alımı heterojenite gösterir. 10. Uzun vadeli kültüryona olanak tanır. 11. Farklı hücre tiplerinin ortak kültürü yapılabilir. | <ol style="list-style-type: none"> 1. Maliyetlidir. 2. Görüntüleme ve karakterizasyon teknikleri zor ve tecrübe gerektirir. 3. Mikro doku boyutuna bağlı olarak kor bölgesinde iskemi görülebilir. 4. Büyük ölçekte üretimler için standardizasyon zayıftır. 5. Mevcut ticari testler yetersizdir. 6. Kompleks matriks yapısının optimizasyonu zordur. |

Üç boyutlu hücre kültüründe sferoid oluşturmak için geliştirilen materyallerden biri de Petri Dish®'lerdir. Morgan ve arkadaşları tarafından üretilen Petri Dish® kalıpları plastik yapıda ve üzerinde homojen boşluklar bulunan malzemelerdir [3]. Üzerlerine ısıtılmış agaroz döküldükten sonra oda sıcaklığında polimerleşen agarozun elde edilmesiyle hücrelerin iskelesiz ortamda mikro doku oluşturacağı non-adhesiv bir ortam oluşturmaktadır. Belirlenen hücre sayısı ekimi ile kontrol edilebilen sferoid hacim ve çapı (100-500 μM) Petri Dish® kalıplarını kullanmakta büyük bir avantaj sağlamaktadır. Bunun haricinde kalıpların otoklavlanabilmesi sterilite koşullarına uyum sağlamaktadır. Agaroz jel üzerine primer hücre, kök hücre veya kanser hücresi gibi farklı özellikteki hücreler ekilebileceği gibi, birden fazla hücre birarada ekilerek ortak kültür çalışmaları yapmak mümkündür [55]. Birden fazla hücrenin biraraya getirilip doku bütünlüğünü mümkün olduğunca yansıttığından bu teknik son yıllarda bilimsel makalelerde yer almıştır.



Şekil 2.5. Sferoid tabakalarına göre oksijen seviyesi ve pH değişikliği [56].



Şekil 2.6. Sferoid tabakalarına göre gaz, atık ve besin miktarları [57].

2.5. Gebelikte Antidepresan Kullanımı

Uluslararası çalışmalar depresyonun büyük çoğunluğunun doğurganlık süreçlerini içine alan 18-44 yaş aralığındaki kadınlarda görüldüğünü belirtmektedir. Bu süreçlerin temelinde hormonal, biyolojik ve psikososyal değişimlerin yaşanmasıyla birlikte kaygı ve stres oluşturabilecek birçok etkenle karşılaşılmaktadır. Geçmiş yıllarda gebelik dönemi “psikiyatrik bozukluklar için koruyucu bir süreç” olarak görülürken, bahsedilen etkenlerle birlikte günümüzde bu görüş artık kabul görmemektedir. Kısaca gebelik, kadınların yaşamında genelde en yüksek endişe, stres, kaygı bozukluğu ve depresyon görülen bir süreçtir. Bu nedenle yaşanan depresyon hali fetüs üzerinde postpartum depresyona sebep olacak şekilde etkileyebilmektedir. Gebelikte depresyon hali görülme sıklığı %12-36 olarak değişiklik göstermektedir ve bu şikayetle doktorlarına başvuran gebelerin %8-10 kadar tedavi için antidepresan ilaç ile tedavi edilmektedir. Dünya çapında reçeteli olarak satılan antidepresanlar kullanılan en yaygın ilaç grubudur ve antidepresanlar arasında kullanımına en sık rastlanılan ilaç (%10) 1988 yılında piyasaya sürülen seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI)'dir [1,58,59]. SSRI antidepresan grubu ilaçlar arasında; Fluoksetin, Sertralin, Paroksetin, Sitalopram, Essitalopram, Fluvoksamin, Venlafaksin ve Vortiksetin bulunmaktadır [60]. SSRI'ların etki mekanizması serotonin (5-HT) geri alım taşıyıcısına (SERT) bağlanarak serotoninin

presinaptik nöron tarafından yeniden alımını engelleyerek sinaptik yarıktaki serotonin seviyelerinin artışı sağlamaktır [59].

Plasentanın işlevsel birimi olan trofoblastların SSRI ile maruziyetinde, trofoblastların invazyonu, utero-plasental arterlerin yeniden yapılandırılması ve trofoblastların farklılaşması dahil çeşitli süreçleri etkileyebilmektedir. Bunun sonucunda erken doğum, düşük doğum ağırlığı oranlarında artış ve nöro-davranışsal rahatsızlık, gerilemiş fetal gelişim, intrauterin büyüme kısıtlamaları ve preeklampsi görülebilmektedir. Bu durum, gebelikte risk oluşturabilecek antidepresanların kullanımının onayı konusundaki endişeleri arttırmıştır ve gelecek nesillerin sağlığı için araştırmaların genişletilmesi gerektiğini vurgulamaktadır [61]. Gebelik sırasında kullanılan ilaçların plasenta aracılığı ile fetüse aktarılması, fetüsün postnatal ve embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri nedeniyle son 10 yıldır dünya ilaç düzenleme ve halk sağlığı ile ilgilenen kurumlarca incelenmektedir [10].

SSRI'ların depresyona karşı etkin kullanımı kanıtlanmış olsa da, gebelikte SSRI maruziyetinin plasentaya etkileri literatürde hala tartışmalıdır.

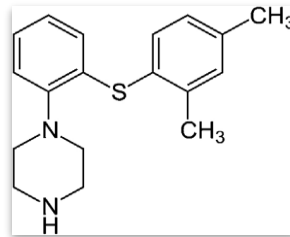
2.6. Brintelliks ve Etken Maddesi Vortiksetin

Brintelliks ilacı, antidepresan özelliğini daha etkili bir şekilde göstermesi amacıyla sentezlenen yeni bir ilaçtır. Geleneksel SSRI tipte ilaçlardan farklı olarak, sinaptik yarıktaki serotonin şiddetini arttırmak amacıyla, SSRI ve 5-HT_{1A} reseptör agonisti bir araya getirilerek serotonin (5-HT) geri alım taşıyıcısı inhibe edilmiş aynı zamanda 5-HT_{1A} reseptörü uyarılmıştır. Moleküle daha sonraki aşamada serotonin alımı dışında diğer nörotransmitter reseptörlerinin inhibisyonu ile 5-HT₃ reseptör antagonisti eklenmiştir. Bu sayede ilacın bilişsel işlevlerle nöron yolları güçlendirilmiştir. Çoklu etkiye sahip olan Brintelliks sentezlenmesi amacıyla 5-HT_{1A} agonisti, 5-HT₃ antagonisti, 5-HT_{1D} antagonisti, 5-HT_{1B} parsiyel antagonisti ve 5-HT₇ antagonist reseptörleri de moleküle ilave edilmiştir. İlaç hem serotonin geri alımının inhibisyonu hem de serotonin geri bildirim mekanizmasının etkisizleştirilmesiyle karakterize edilmektedir ve çoklu serotonerjik mekanizmayı modüle etmektedir. Rekombinant hücre hatları kullanılarak *in vitro* koşullarda reseptör bağlanma afinite çalışmaları

yapılmış ve bulunan afinite değerlerinin farklı sistemlerde (serotonerjik, dopaminerjik, noradrenerjik gibi) nörotransmisyonu düzenlediği gösterilmiştir [62–64].

Brintelliks'in etken maddesi olan Vortioksetin ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'dan onaylı olarak satışa sunulmuştur [65]. Vortioksetinin çoklu sistemlerde (serotonin, norepinefrin, dopamin, asetilkolin, histamin, glutamat ve gama-aminobütirik asit sistemleri) nörotransmisyonu modüle ederek antidepresan etki göstermesi Majör Depresif Bozukluk ile karakterize edilen duygu durum ve biliş ile ilgili bozukluklarda yer alan karmaşık sinir ağlarını düzenlemektedir [4].

Vortioksetinin farmakolojik aktivitesine katkısı çok az olan kan dolaşımındaki metabolitleri Lu AA34443 ve Lu AA39835'dir. Fakat serotonin reseptörlerine bağlanmadıklarından farmakolojik olarak inaktiftir [4]. Vortioksetin, Türkiye'de çok yakın bir zamana kadar reçetesiz olarak satılmış olduğundan ilaç maruziyetinin sonuçlarını araştırmak ve bu konudaki çalışmaların desteklenmesi özellikle ülkemiz için büyük önem taşımaktadır. Vortioksetin, bis-aril-sülfanil amin sınıfına dahil olup, 1-[2-(2,4-dimetilfenil-sülfanil-fenil)-piperazin] kimyasal yapısıyla Şekil 2.7.'de gösterilmektedir. 298,45 g/mol ağırlığında ve C₁₈H₂₂N₂S-Hbr molekül formüle sahiptir [65]. Vortioksetin plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanmakta (%99) ve metabolizmasında çoklu sitokrom P450 (CYP2D6) izoenzimleri rol almaktadırlar. Neredeyse tamamı karaciğerde metabolize edilen Vortioksetin oksidasyon yoluyla P450 enzimleri ve daha sonra idrar difosfat glukuronosiltransferaz ile gerçekleştirilmektedir. İlacın yarılanma ömrü 66 saat olarak belirlemiştir ve ortalama biyoyararlanımı %75 olarak bilinmektedir [4]. İlaç gebelikte C kategorisinde yer almaktadır. Gebelerde Vortioksetinin etkilerini içeren bir çalışma yapılamadığı için yeterli veri bulunmamaktadır ve yapılan az sayıda hayvan deneyleri ise fetüs üzerinde olumsuz etki yaratabileceği yönündedir. Tez çalışmasında sitotoksitenin *in vitro*da plasenta modeli ile araştırması amaçlanmaktadır.



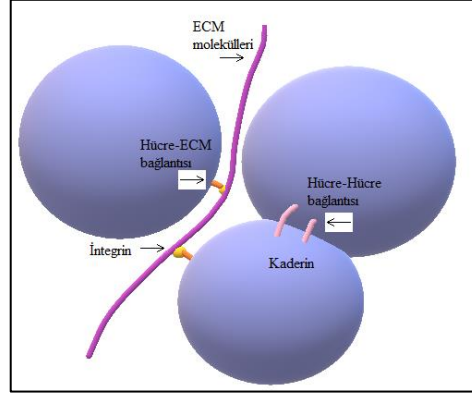
Şekil 2.7. Vortioksetin molekülünün kimyasal yapısı [4].

2.7. Epitelyal (E)-Kaderin

Hücrelerin üç boyutlu bir yapı kazanarak birarada bulunması ve HDM ile bir bütün halinde bulunabilmesi için birtakım bağlantılar oluşmaktadır. Hücreleri birbirlerine kenetlenmesini sağlayan bağlantı çeşitleri; sıkı bağlantılar (*Zonula occludens*), kemer bağlantılar (*Zonula adherens*), düğme desmozomu (*Macula adherens*)'dur. Sıkı bağlantılar, epitel hücrelerin lümene bakan apikal uçlarında en üst bölümünde yer almaktadır. Hücrenin apikalinden bazaline doğru inildiğinde sıkı bağlantıların hemen altında kemer bağlantılar bulunmaktadır. Kemer bağlantılar hücrelerin yaşadığı mekanik strese karşı hücreleri birarada tutmaya yarayan bağlantılardır. Kemer bağlantıların yapısında kaderinler olarak adlandırılan, kalsiyum bağımlı transmembran proteinleri bulunmaktadır. Sıkı bağlantıların aksine hücreler arasında 10-20 nm'lik boşluk bırakarak hücreleri birarada tutmaktadır. Hücre dışında hücre-hücre bağlantısını sağlayan kaderinler, hücre zarının sitosöle bakan yüzeyindeki hücre içi kenetlenme proteinlerine (katenin, vinkulin, α -aktinin) tutunmaktadır. Hücre içi uzantılarıyla kenetlenme proteinlerine tutunan bu yapı devamında hücre iskeleti elemanı olan aktin filamentlerine bağlanmaktadır. Bu sayede kasılabilir aktin filamentleri ve hücre zarının bütünlüğü sağlanmaktadır. Hücre göçü, proliferasyon ve farklılaşma gibi temel morfogenezin temel fonksiyonları bu tip bağlantılar ile desteklenmektedir. Kaderinler buldukları hücre tiplerine göre farklı şekilde isimlendirilmektedir. Epitel hücrelerinde kaderinler; epitel hücrelerinde E-kaderin, nöral hücrelerde N-kaderin ve plasenta dokusunda P-kaderin olarak ifade edilmektedir [66]. Nose ve Takeichi'nin 1986 yılında yaptığı çalışmayla fare plasentasında P-kaderinin varlığı gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada ektopik gebelik, düşük ve kürtaj ile sonlanan gebeliklerin plasenta örneklerinde P-kaderin varlığı kanıtlanmıştır. Özellikle düşük materyallerinde ifadenin anlamlı olması P-kaderinin gebelikte immün sistem ile ilgili olduğu fikrini ortaya atmıştır [67].

Mononükleer BeWo hücrelerinin forskolin uygulaması ile polinükleer hale getirilmesinde belirteç olarak kullanılan E-kaderin ifadesinin azalması farklılaşmayı kanıtlayıcı özelliktedir. Kaderinler, bu tip hücre farklılaşması durumlarında kilit rol oynamaları üzerine morforegülatör olarak da adlandırılmıştır. Forskolin maddesi ile hücre içinde farklılaşma sinyali alınıp hücre içi iskelet elemanlarının ve hücre adezyon moleküllerinin yeniden düzenlenmesi hücrede hem morfolojik hem de biyokimyasal değişiklikler meydana getirmektedir. E-kaderinler sinsityumlanma aşamasında hücreler

arasında yeniden düzenlenip hücre sınırlarını değiştirmektedir. Bu sebeple kaderinlerin hücre içerisindeki fonksiyonunu veya ifadesini değiştirecek herhangi bir etki ortamda hücre füzyonunu da olumsuz yönde etkilemektedir [68].



Şekil 2.8. Sferoid agregat oluşumunda hücre bağlantılarının lokalizasyonu [2].

E-kaderinler oluşturulan sferoidlerde de hücre-hücre etkileşimlerini arttırarak sferoid bütünlüğünün dolayısıyla doku bütünlüğünün korunmasında önemli rol almaktadır (Şekil 2.8.). Sferoid oluşturacak hücrelerde E-kaderin proteinlerini bloke edici uygulamalar yapıldığında hücre agregatlarında ise sferoid olamama görülmektedir. Sferoid hale gelmiş mikro dokularda E-kaderin bloklanması sonucu sferoid bütünlüğünün bozulduğu görülmektedir [71].

2.8. Fibröz (Filamentöz) Aktin (F-aktin)

Hücre iskeleti protein alt ünitelerinin non-kovalent bağlarla biraraya gelip polimerleşmesiyle oluşmaktadır. Hücre bölünmesi, hücre organellerinin hareketi, fagositoz ve sitoplazmik akım gibi hareket temelli faaliyetlerde rol almaktadır. Mikro filametler grubundaki aktinler kendilerine sıkıca ATP bağlayan polipeptit yapılı globüler proteinlerdir. Globüler aktinler arasındaki sıkı bağlantılar polimerizasyon geçirerek sarmal yapmaktadır ve bunun sonucunda aktin proteinlerinin aktin filamanlarına dönüşümü gerçekleşmektedir [72].

Hücre-hücre etkileşimli sferoid yapılarının oluşmasında aktin hücre iskeletinin etkisi olduğu bilinmektedir. Aktin filamentlerinin dağılışı hücrelerin sferoid oluşturduğu süre boyunca değişiklik göstermektedir. Sferoid oluşturacak hücrelerde F-aktin iskelet yapısını bozacak madde uygulaması yapıldığında mikro dokuların oluşmadığı yalnızca gevşek hücre bağlantıları kurmuş hücre agregatları olduğu görülmüştür. F-aktinler 3B

kültürlerde hücre-hücre temasını arttırarak oluşan sferoid hacminin kontrolünü sağlamaktadır. Bu sayede mikro dokularda bütünlük kazanılmaktadır [71].

2.9. Serotonin Geri Alım Reseptörleri (SERT)

SERT reseptörleri serotoninin hücreye geri alımını sağlayan ve hücre zarında bulunan proteinlerdir. Sonier ve arkadaşları 40 mM ve 20 mM'lik serotonin konsantrasyonunda BeWo hücrelerine uygulama yapıldığında hücre boyutu ve yapısının değişmediği ancak karsinom hücrelerde mitojenik etki yarattığı görülmüştür. Fetal kan dolaşımında 5-HT'nin azalması plasentayı önemli bir büyüme faktöründen mahrum bırakmaktadır [73]. Aslında, plasentanın 5-HT üretebileceği ve insan plasentasının sinsityotrofoblast, sitotrofoblast, stromal hücreler ve desidial hücrelerinde 5-HT için immünoreaktif boyamalar sonucu varlığı belirlenmiştir. Bununla birlikte SSRI'ların, plasentanın ana endokrin yapısı olan placentilla villusunu geçtiği gösterilmiştir. SSRI'ların plasentadan bu şekilde geçişleri placentilla üzerinde SERT reseptörlerinin varlığını göstermektedir. BeWo hücreleri de aynı zamanda 5-HT üretimi yapmakta ve SERT reseptörleri bulundurmaktadırlar [74]. Fetüsten de 5-HT aktarımı placentilla aracılığı ile maternal arayüze geçmektedir. Bu nedenle hem fetüsten gelen hem de plasentada üretilen ve hücre içine alınmayan fazla 5-HT plasental kusurlar yaratabilmektedir [75].

2.10. İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu (β -hCG)

Embriyonun endometriyuma tutunmasından itibaren farklılaşan trofoblast hücreleri tarafından üretilen hCG hormonu gebeliğin temel hormonudur. İnsan Koryonik Gonadotropin (hCG), iki farklı α (14.5 kDa) ve β (22.2 kDa) alt biriminden oluşan ve yük etkileşimleriyle kovalent olarak bağlı olmayan ve toplam 237 aminoasit içeren glikoprotein yapısında bir hormondur [76]. İnsan koryonik gonadotropin hormonunun asıl görevi korpus luteumu uyararak progesteron üretimini teşvik etmesidir. Embriyo ve yumurtalıklar arasında iletişimi sağlayan hormon bu sayede involüsyonu engellemektedir. Uterus vaskülatörünün anjiyogenezi, blastosistlerin implantasyondan önce endometriyuma yönlendirilmesi, sitotrofoblast farklılaşması, trofoblast hücrelerinin fagositoz edilmesinde immün baskılanma, rahim ve uterus büyümesi, fetal organların, göbek kordonunun büyümesi ve farklılaşması hCG hormonun görevleri olarak bilinmektedir [77].

2.11. Hücre Karakterizasyon Testleri

In vitro çalışmalarda kullanılan her bir hücre farklı karakteristik özelliklere sahiptir. Hücreler genel başlıklar altında; hat haline getirilenler, kök hücreler ve primer hücreler olarak sınıflandırılmaktadır. Bunun dışında hücreler kültür ortamındaki lokalizasyonlarına göre de süspanse ve adherent olarak iki ayrı başlıkta incelenebilir. Hücrelerin kaynakları ve kullanım şekilleri kadar büyüme ve farklılaşma özellikleri de çeşitlilik göstermektedir. Hücrelerin kaynağı olduğu dokunun özelliklerini *in vitro* ortamda daha başarılı bir şekilde stimüle edebilmeleri için fizyolojik süreçlerini doğru şekilde takip etmek gereklidir.

2.11.1. Üreme Eğrisi

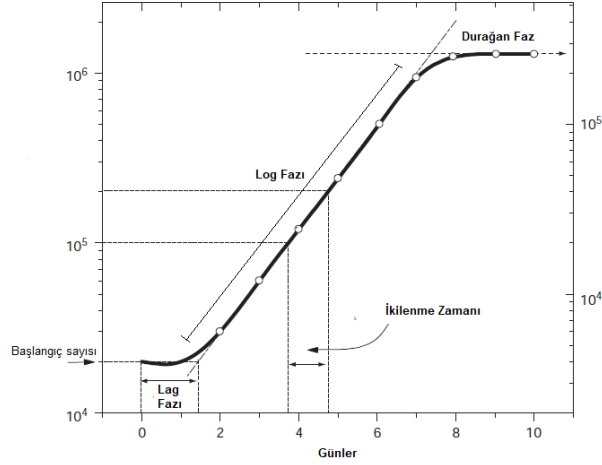
Hücrelerin *in vitro* koşullarda büyüme, gelişme ve ölüm süreçleri ikilenme testi ile belirlenmektedir. *In vitro* çalışmalarda kullanılan hücrelerin ikilenme zamanları (T2) literatür incelemelerinde elde edilse bile, bu süre laboratuvar koşulları, kullanılan ürün çeşitleriyle değişiklik gösterebilmektedir. İkilenme zamanı ele alınan hücrenin bir mitoz bölünme geçirip sayısını çift katına çıkarması için geçen süre anlamına gelmektedir. Bu test her hücre tipine özgü büyüme eğrisi adı verilen logaritmik bir grafik ortaya çıkarmaktadır (Şekil 2.9.) [78,79].

Popülasyon ikilenme zamanı (PİZ) ise şu formül ile hesaplanmaktadır:

$$PİZ = \frac{1}{\left[\frac{3,32 \times (\log T1 - \log T0)}{24} \right]}$$

Hücrelerin tripsin ile muamelesinden sonra büyüme ortamlarına bırakıldığı süreçte lag fazı görülmektedir. Bu süreçte bozulan hücre yüzey proteinleri, HDM elemanları ve hücre iskelet elemanları yeniden düzenlenmektedir. Hücre metabolik hızının da düzenlemesiyle log fazına (üssel) geçiş yapmaktadır. Log fazı içinde hücreler ikilenerek sayılarını iki katına çıkarmaktadır. *In vitro* çalışmalarda hücrelere uygulanan ve muhtemel sitotoksik yanıt beklenen ksenobiyotikler, metabolit indirgenmesi, farmasötik çalışmaların yanıtları bu dönemde alınmalıdır. Bu fazda hücrelerin miktarı flaskta %70-80 oranında kaplama göstermelidir. Sayıca çift katına çıkan hücreler buldukları ortamdaki substratları tükettikçe flaskta olmaması gereken yoğunluğa ulaşmaktadır.

Hücrelerin aşırı sıkışıp hareket edemedikleri durumda kontakt inhibisyon görülmektedir. Çok yoğun ortamda hücreler strese girip üreme hızlarını sıfıra düşürmektedir. Hücreler bazal metabolizmaya girdiği bu dönemde durgun (plato) faza geçiş yapmaktadır. Flasktaki hücreler tripsin yardımıyla kaldırılıp uygun yoğunluğa getirilmez ve besiyeri yenilenmezse ölüme gitmektedir [78,80].



Şekil 2.9. Hücre büyüme eğrisi [80].

2.11.2. Sterilite Testleri

Steril bir şekilde hazırlanmış ve hücre ile biraraya getirilmiş besiyerinde, üremesi istenmeyen herhangi bir mikroorganizmanın bulunması ve ardından hücreleri enfekte etmesi kontaminasyon anlamına gelmektedir. Kontaminasyon kaynakları; laboratuvarında çalışanlar, kıyafetleri, kullanılan ekipmanlar, biyogüvenlik kabini, etüv gibi bir laboratuvarın temel taşları olabilir. Kullanılan malzemelerin mutlaka aseptik ve güvenilir olması gerekmektedir. Bu kaynaklardan yayılan partiküller büyük miktarda bakteri, fungus, mikoplazma, maya ve virüs barındırmaktadır. Bunların haricinde birden fazla hücre ile çalışılan ortamlarda dikkat edilmediği sürece çapraz kontaminasyon da görülmektedir. Kontaminasyon, makroskobik veya mikroskobik gözlem ile ortaya çıkabilmektedir. Hücre kültürü ve laboratuvar ortamındaki mikroorganizmalar arasındaki bariyeri oluşturmak için alınabilecek çeşitli önlemler vardır. Kullanılan malzemelerin steril edilmesi için basınçlı buhar (otoklav), kuru ısı (pasteur), ışınlama (UV) sıklıkla tercih edilmektedir. Likit ürünlerin (serum ve diğer çözeltiler) sterilitesi için ise ultra filtreler yardımıyla mekanik olarak süzülmesi sağlanmaktadır [80].

Kontaminasyon yaşandığı belirlenip incelenen kültürlerin, %30'dan fazlasının *Mollicutes* sınıfı üyesi *Mikoplazma* kaynaklı olduğu bilinmektedir [81]. Mikoplazma, 0,3 ila 0,8 µm çap boyutuna sahip, oldukça küçük prokaryot hücrelerdir. Memeli hücrelerinde endozomda konakçı olarak bulunmaktadır. Enfekte ettikleri hücredeki arjinin aminoasidini enerji kaynağı olarak kullanarak konağı bu temel aminoasitten mahrum bırakır bunun sonucunda hücrede protein temelli sentezlenmelerde aksaklıklar yaşanmaktadır. Gram pozitif (+) grubuna dahil edilen bu bakterilerin hücre duvarları bulunmamaktadır. Bundan dolayı besiyerine eklenen penisilin/streptomisin gibi bakteri duvarını hedef alan antibiyotiklere karşı dirençlidirler [82]. Mikoplazmal enfeksiyon içerisindeki hücreler genellikle flaskta tek tabaka oluşumunda zorlanır ve ikilenme zamanlarında değişiklik göstermeye başlamaktadır. *In vitro* çalışmalarda mikoplazma kontaminasyonunun kontrolü için kullanılan yöntemleri içinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), floresan çekirdek boyama (DAPI veya Hoechst ile boyama), enzime bağlı immünosorbent analizleri (ELISA) bulunmaktadır. Düşük maliyetli ve kısa sürede sonuç veren DAPI (4', 6-diamidino-2 fenilindol) çekirdek boyama yöntemi laboratuvarlarda sıklıkla tercih edilmektedir. Hücre zarından giren DAPI nükleik asit dizisindeki adenin ve timin bazlarını floresan renkte boyamaktadır. Eğer hücre mikoplazma ile enfekte olmuş ise viral genomun nükleik asitlerinin boyanmasıyla ekstranükleer boyama görülmektedir [78,81]. Hücreyi enfekte etme durumunda hücre metabolizmasını değiştiren, kromozom anomalisi, nükleik asit baz yapısında bozulmalar meydana getiren mikoplazmanın varlığı deneylere başlamadan önce ve 10 pasajda bir düzenli olarak kontrol edilmelidir [82].

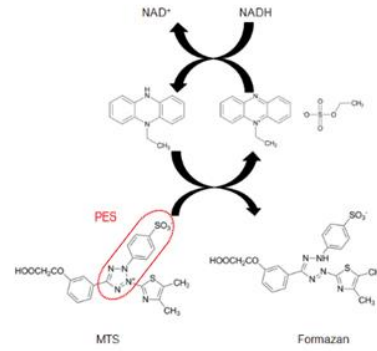
2.12. Hücre Canlılığı ve Sitotoksikite Testleri

In vitro çalışmalarda hücrelerin toksik maddelere verdiği yanıtlar proliferasyon miktarı ve canlı hücre sayısının nicel ölçümleri ile belirlenebilmektedir [83]. Hücrelerin sinyal yollarını inhibe ederek veya indükleyerek apoptoz veya nekroza götüren, metabolizmasını değiştirerek sahip olduğu karakteristik özelliklerini değiştiren ksenobiyotiklerin etki yolları çeşitli analizler ile belirlenmektedir. Hücrede DNA hasarı, mitokondriyal veya lizozomal aktivite, enzim veya protein miktarının ölçümleri farklı sitotoksikite testleri ile belirlenebilmektedir. Bu ölçümler kolorimetrik tetrazolium ajanlarıyla yapılan analizler, ATP miktarlarının ölçümü ve lüminesans temelli olabilmektedir. Ölçümler için renkli veya floresan özellikteki substratların mikro-plak

okuyuculu spektrofotometrede farklı dalga boylarına verdiği ışığa ve dönüştürüldüğü absorbans değerleri temel alınmaktadır. Tetrazolium tuzları heterosiklik halka yapısına sahip organik bileşiklerdir. Son yıllarda avantajlarından sıklıkla bahsedilen 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), yapısında bulunan ara elektron alıcı molekül (fenazin etil sülfat) aracılığıyla hücre zarından girmektedir. Tetrazolium tuzları mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi yardımıyla oluşan NADH veya indirgeme sağlayacak başka bir molekülden elektron alarak indirgenip formazan adlı mor/kırmızı renkli ürüne dönüşmektedir [84]. Heterosiklik yapıdaki halkanın hücre içinde kırılıp renk değiştirme reaksiyonunu gerçekleştirmesi ancak canlı hücrelerin mitokondri aktivitesi ile gerçekleşebilmektedir [83]. Yalnızca metabolizması aktif haldeki hücrelerde kolorimetrik değişimin görülmesi ölü/canlı hücre sayısı hakkında korele edilebilir sonuçlar vermektedir.

2.12.1. MTS Canlılık Analizi

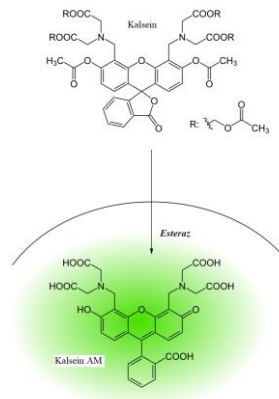
Son yıllarda çeşitli avantajlarıyla tercih edilen MTS'in 3B'lu hücre kültürü çalışmalarında sferoid oluşturan hücreler tarafından gerektiği gibi kullanıldığı toksisite ve proliferasyona verdiği yanıtların kabuledilir olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, A549 insan akciğer hücreleri 2B ve 3B'lu kültüre edildikten sonra hücreleri birbirlerinden ayırıp tekli hale gelmelerini sağlayan tripsin enzimi ile muamele edilmiştir. Burada karşılaştırılmak istenen sferoid yapısındaki hücreler ve 2B'lu olarak yüzeye tutunan hücrelerin MTS'i kullanma miktarını belirlemektir. Sferoid oluşturan hücrelerin kor bölgesindeki ve periferdeki lokasyonları, buldukları ortamdaki substratları kullanamamalarına sebep olabilmektedir. Bu durumu sferoidi oluşturan hücrelerin büyüklüğü ve sayısı dolayısıyla sferoidin çapından etkilenmektedir. Tripsin ile muamele edilen 3B ve 2B'lu hücrelerin MTS ile inkübe edildikten sonra tripsin ilave edilmemiş gruplarla canlılık yüzdesi olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir [85]. Bu sonuç MTS'in 3B'lu hücre kültürü sistemlerinde hücreler tarafından gerektiği gibi işlendiğini ve toksik cevabı doğru yansıttığını göstermektedir. Çoklu hücre kültürü plakalarında üretilen hücrelere doz uygulamasından sonra, ara elektron alıcı moleküller ile uygulanan MTS inkübe edilip sonra oluşan formazan ürünü çalkalayıcıda homojen hale getirildikten sonra direkt olarak mikro-plak okuyuculu spektrofotometrede okutulmaktadır. Elde edilen absorbans değeri hücre canlılığı ile doğru orantılı olarak sonuç vermektedir. Şekil 2.10.'da MTS reaktifinin kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 2.10. MTS tetrazolium tuzunun kimyasal yapısı ve indirgenerek renkli formazan kristallerine dönüşümü [84].

2.12.2. Kalsein AM- Propidium İyodit (PI)-DAPI Floresan Boyama ile Canlı ve Ölü Hücrelerin Tespiti

Kalsein AM-PI ve çekirdek boyası DAPI kullanılarak yapılan floresan boyama yöntemi 3B hücre kültürü sistemlerinde oluşturulan mikro dokuların çap hesaplaması ve canlılık analizinde kullanılmaktadır. Kalsein boyası hücre içerisine girip sitozolik esteraz enzimlerinin aktivitesiyle hidrolize olup floresan özellik kazanmaktadır. Hücrenin sitoplazmasında ışımaya yapmaktadır. Yeşil renkte floresan parlama yapan bu boya hücrenin enzimatik aktivitesiyle birlikte hücre canlılığı ile doğru orantıda ışımaya vermektedir (Şekil 2.11) [86].



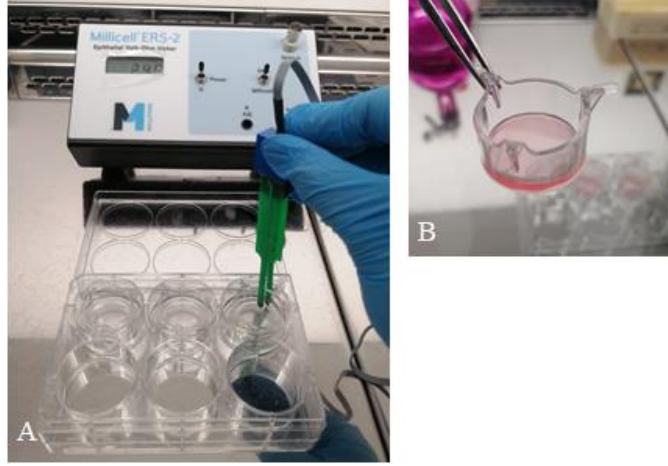
Şekil 2.11. Kalsein boyasının hücre içerisinde floresan boyaya dönüşümü [87].

Propidium iyodit boyası, yüksek polaritesinden dolayı canlı hücrelere giremeyen yalnızca hücre zarı bozulmuş hücrelere ulaşabilen floresan özellikte bir boyadır. Hücre çekirdeğinde nükleik asitlere bağlanarak kırmızı renkte floresan boya veren PI zar bütünlüğü bozuk hücrelerde ışınması sayesinde nekrotik hücreleri göstermektedir [88].

Kalsein AM ve PI boya solüsyonuyla birlikte DAPI çekirdek boyasının kullanılması toplam hücre miktarının belirlenebilmesi için gereklidir.

2.13. Bariyer Bütünlüğünün Ölçümü (Transepiteliyel Elektriksel Direnç-TEER) ve Sodyum Floresan Tuzu Akış Analizi (Na-F)

Transepiteliyel elektriksel direnç ölçümü, porlu bir membran üzerine kültüre edilen epitel hücrelerin bariyer oluşturma potansiyelini gösteren elektrofizyolojik bir yöntemdir. Hücrelerin tekli ifadesinden çok hücrelerin sıkı bağlantılarla biraraya gelmesinden temel alan ölçüm doku bütünlüğünü ifade etmektedir [89]. Hücrelerle oluşturulan doku modellerinin bariyer oluşumu ve paraselüler madde akışı hücre kültürü plakalarına koyulmuş insertlerin (transwell) apikal ve bazal bölümüne yerleştirilen iki elektrot yardımıyla ölçülmektedir [90]. Hücrelere minimum düzeyde voltaj verilerek hücrelerin gösterdikleri akım dirençleri ölçülmektedir. TEER ölçümü ksenobiyotik kullanılarak hücrelere verilen hasardan sonra yapılacağı gibi hücrelerin müdahale olmadan bariyer oluşturmadaki profillerini nicel bir şekilde ortaya çıkartmaktadır. Epiteliyal sıkı bağlantıların güçlü olduğu modellerde yüksek elektriksel direnç görülürken, hücrelerinde hasar oluşan bariyer modellerinde düşük elektriksel direnç görünmektedir [91]. Şekil 2.12.'de (A) TEER cihazı aracılığı ile mono ve ortak kültürlerin (B) insert üzerine ekildikten sonra bariyer direnç ölçümünün yapılışı gösterilmektedir.



Şekil 2.12. (A) TEER cihazı ile hücre ekimi yapılmış (B) insertler üzerinde direnç ölçümü.

Sodyum floresan tuzu kullanılarak yapılan akış analizi, TEER analizi ile birbirini tamamlayan bir metottur. Hücre ekilen insertlerin apikal bölgesinden bırakılan floresan işaretli tuz hücrelerin oluşturduğu bariyeri geçerek bazal kuyucuğa inmektedir. Bu sayede TEER değerinin yüksek olduğu bariyer yapısında Na-F geçişinin az olması beklenir. Tam tersi olarak bariyer bütünlüğünün tamamlanamadığı ve yapısının bozulduğu durumlarda ise Na-F tuzu hücrelerin arasından kolaylıkla geçip bazal kuyucuğa inmektedir. Bu akış sonrasında bazal kuyucuktan örnekler alınıp floresan miktarı okuyucuda uygun dalga boyunda ölçülmektedir. Na-F değerlerinin büyük ve TEER değerlerinin yüksek olduğu karşılaştırmalarda bariyer oluşumundan bahsedilmektedir [11].

TEER değeri = [deneysel oyukların ortalama direnci - boş oyukların ortalama direnci] × 4,5 cm² (transwell membran alanı) [92].

2.14. İmmünfloresan Boyama

İmmünfloresan boyama, *in vitro* çalışmalarda lokalizasyonu ve miktarı belirlenmesi gereken protein için saptama yapılan bir tekniktir. Bu teknikte ilgilenilen proteinin barındırdığı antijene özgü birincil antikor (primer) ve tercih edilen tekniğe bağlı olarak birincil antikorun sabit koluna özgü ikincil antikor (sekonder) bağlanmaktadır. Direkt

yöntem olarak adlandırılan teknikte sadece birincil antikor ve lüminesans özellikteki florokrom bulunmaktadır. Birincil antikor, ikincil antikor ve florokromların bulunduğu yöntem ise dolaylı yoldan immünfloresan boyama olarak adlandırılmaktadır. Florokromlar, antijen-antikor uyumunun devamında hücre içine girip hedef proteini belirlemede rol almaktadır. Florasan izotiyosiyanat (FITC), tetrametil rodamin izotiyosiyanat (TRITC) gibi farklı renkteki boyalar antikorlarla konjüge edilir ve uygun dalga boylarında ışımaya yapmaktadır. Işımanın miktarı spektrofotometre kullanılarak ölçülüp nicel hale getirilebileceği gibi, floresan ataşmanlı inverted mikroskopta da görüntüleme yapılabilmektedir [93,94].

2.15. ELISA Yöntemi İle Hormon Miktarının Belirlenmesi

In vitro çalışmalarda incelenecek moleküllerin varlığı ve konsantrasyonlarının kantitatif olarak belirlenmesini sağlayan enzime bağlı immünosorban testinin çalışma prensibi, antijen-antikor reaksiyonlarıyla meydana gelen kolorimetrik değişikliklere dayanmaktadır. Enzime Bağlı İmmünosorban Testi (ELISA) 1971'de Peter Perlmann ve Eva Engvall tarafından İsveç'in Stockholm Üniversitesi'nde kavram olarak literatüre kazandırılmıştır [95,96] Hormonlar, vitaminler, ilaçlar ve proteinler gibi biyolojik moleküller, kendileri için geliştirilen antikorlara veya antijenlere karşı özgünlük içermektedir [97]. Bu teknik; aşı geliştirme, immünoloji, hastalık tanısı, toksikoloji, ilaç endüstrisi ve transplantasyon alanlarında sıklıkla tercih edilmektedir [95,98].

Deneyler, tekrar sayısını olabildiğince fazla tutmak ve sonuçlarda tutarlılığı sağlamak için çok kuyucuklu hücre kültürü plakalarında gerçekleştirilmektedir. Uygulama protokolleri karşılaştırıldığında, deneyin amacına, incelenecek örneklerin tipine ve kullanılacak solüsyonların saflığına bağlı olarak dört farklı ELISA çalışma prensibi olduğu görülür. Bunlar; direkt, indirekt, sandviç ve çift sandviç olmak üzere farklı protokollerdir [99]. Hormon konsantrasyonu ölçümüne dayalı ELISA testlerinde sıklıkla sandviç tip protokol tercih edilmektedir. Analiz edilecek örneğin her iki taraftan antikor ile muamele edilmesinden dolayı bu şekilde isimlendirilmiştir. Sandviç ELISA çalışma protokolünde, öncelikle çalışılan antijen, başka bir antikor (yakalama antikoru) tarafından katı bir substrat üzerinde immobilize edilmektedir. Sonrasında özgül olmayan bağlanmaların olasılığını en aza indirmek için bloke edici bir ajan ile örnekler muamele edilmektedir. Daha sonra, enzim bağlı ikinci bir antikor (belirleme antikoru)

eklenir ve yakalama antikoruna bağlanmış antijene farklı bir epitoptan bağlanmaktadır. Enzim bağlı antikor, kovalent yöntemle enzime bağlanabilir (direkt) veya ikincil bir antikor ile (indirekt) ayrıca saptanabilir. Yine bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması için yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkanmaktadır. Daha sonra absorpsiyon miktarına bağlı olarak renk değişimine sebep olan enzimatik reaksiyonu başlatacak kromojen kuyucuklara eklenir ve uygun dalga boyunda ölçüm yapılır [95]. Enzim-substrat reaksiyonuyla ortaya çıkan kolorimetrik renk oluşan ürünler doğrudan orantı göstermektedir. Sandviç ELISA çalışma prensibinin diğer üç ELISA yöntemine kıyasla 2-5 kat daha duyarlı olduğu yapılan çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır [97].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez çalışmasında kullanılan madde ve malzemeler aşağıda belirtilmiştir.

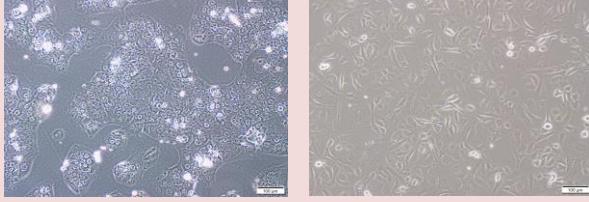
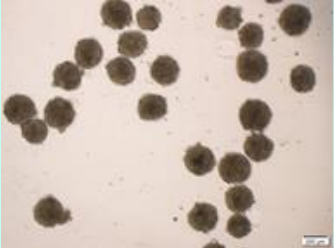
Hücrelerin üretiminde 75 cm² filtrelili (658175, Greiner Bio-One) ve 25 cm² filtrelili flasklar (Greiner Bio-One, 690175), hücre sayımı için Trypsin-EDTA (%0.25) (Thermo Fisher, 25200056) ve Tripan mavisi (Biochrome, L6323), 48 kuyucuklu (Greiner Bio-One, 677180) ve 6 kuyucuklu hücre kültürü plakları (Greiner Bio-One, 657160), 0,4 µm por ölçekli insertler (Greiner Bio-One, 657641), immünfloresan boyamalar için 8 kuyucuklu plakalar (Millipore, EZ Slide, PEZGS0816), toksisitesi araştırılan Vortiooksetin-hidrobromid (Cayman, 23695), Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Appllichem, 01A3672, 0100), fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (Thermo Fisher, 003002) ve kalsiyum & magnezyumsuz PBS (Cegrogen biotech, H0500-540), forskolin (Abcam, Ab120058), Petri Dish® (Sigma, Z764019-6EA), Agaroz (Sigma A9539-500), sodyum klorür (Sigma S5886-500), CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, G3580), kalsein boyası (Biotium, 30002), Propidyum iyodit (Appllichem, 01A2261, 0025) ve DAPI (Sigma, D9542), hidrojen peroksit (Sigma, 18312, %30 saflıkta), CellTracker boyalar (Thermo Fisher; C2925 yeşil ve C34552 kırmızı), Sodyum floresan akış analizi için sodyum tuzu (Sigma, F6377-100) ve fenol redsiz DMEM F-12 besiyeri (Thermo Fisher, 21041), Floresan boyalarda DAPI'li kapatma solüsyonu (Abcam, Ab104139), Triton-X (Merck, 108603) ve Tween-20 (Thermo Fisher, BP337-100), methanol (Sigma, M10609), glacial asetik asit (Carlo Erba, 64-19-7) ve paraformaldehit (Merck, 104005), İnsan koryonik gonadotropin hormonu (β-hCG) miktar ölçümü için ise ELISA kit (DRG, EIA 1911) temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. IF boyamalarda kullanılan solüsyonlar ve malzeme bilgileri.

| Ürün adı | Katalog numarası, Marka | Yöntem | Dilüsyon |
|--|----------------------------|----------|--------------|
| Anti-E-Kaderin <i>primer antikor</i> | PA585088, Thermo Fisher | İndirekt | 1.12 mg/mL |
| Anti-SERT <i>primer antikor</i> | 702076, Thermo Fisher | İndirekt | 0.5 mg/mL |
| Keçide tavşana karşı geliştirilen, Alexa Fluor® 488 işaretli <i>seconder antikor</i> | A27034, Thermo Fisher | Konjuge | 1 mg/mL |
| Falloidin, Alexa Fluor® 555 işaretli <i>primer antikor</i> | A34055, Thermo Fisher | Direkt | 2000 test/mL |
| Ultra Saf BSA™ | AM2618, Thermo Fisher | Blokaj | 50 mg/mL |
| BSA Fraction V | 15260037 Thermo Fisher | Blokaj | % 7,5 |

Deneyisel çalışmalarda boyut ve hücre gruplarının yazımı için aşağıdaki kısaltmalar kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Deney gruplarında kullanılan kısaltmalar (- Vortioksetin uygulaması olmayan, + Vortioksetin uygulaması olan gruplar).

| | | | |
|--|-----------|---|--------------------------------|
| 1. 48 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında yapılan deneyler | 2B |  | Vortioksetin Uygulaması |
| 1.1. Mono kültür | 2B | BeWo hücreleri ve HUVEC hücreleri kültür kaplarında ayrı ayrı üretilmiştir. | -/+ |
| 1.2. Ortak kültür oran grubu | 2B | BeWo hücreleri ve HUVEC hücreleri kültür kaplarında belirli oranlarda bir arada üretilmiştir. | -/+ |
| 2. Petri Dish®'lerde agar içerisinde yapılan sferoidler | 3B |  | -/+ |
| 2.1. Mono kültür | 3B | BeWo hücreleri ve HUVEC hücreleri sferoidler içinde ayrı ayrı üretilmiştir. | -/+ |
| 2.2. Ortak kültür oran grubu | 3B | BeWo hücreleri ve HUVEC hücreleri sferoidler içinde belirli oranlarda bir arada üretilmiştir. | -/+ |

3.1. Hücre Kültürü Koşulları

Çalışmada iki farklı hücre tipi kullanılarak ortak kültür yapılmıştır.

BeWo (CCL-98TM) ve HUVEC (CRL-1730, HUV-EC-C) hücreleri Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC®, Manassas, Virginia Eyaleti, Amerika Birleşik Devletleri) temin edilmiştir. Çalışmalar BeWo hücreleri için 15-25, HUVEC hücreleri için 13-20 pasaj aralığında gerçekleştirilmiştir. Deneylerin tamamı laminar akımlı kabin Esco, Laminar Kabin Plus II BSC'de ve aseptik koşullar altında yapılmıştır.

3.1.1. BeWo ve HUVEC Hücrelerinin Üretimi ve Pasajlanması

BeWo hücreleri Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Ham's F-12 (1:1) (DMEM F-12) besiyerinde (Biochrom GmbH, Berlin, Almanya), % 10 fetal sığır serum premiyum (FSS) (Cegrogen Biotech GmbH, Stadtallendorf, Almanya), % 1 pensilin-streptomisin antibiyotik (Capricorn, Scientific) kullanılarak üretilmiştir.

HUVEC hücreleri Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Ham's (1:1) (DMEM) besiyerinde (Biochrom GmbH, Berlin, Almanya), % 10 fetal sığır serum premiyum (FSS) (Cegrogen Biotech GmbH, Stadtallendorf, Almanya), % 1 pensilin-streptomisin antibiyotik (Capricorn, Scientific) kullanılarak üretilmiştir. İnkübe edilen BeWo ve HUVEC hücreleri Olympus CKX18 inverted mikroskop altında incelenmiştir.

Hücrelerin ortak kültüre edildikleri besiyerinin içeriği hazırlanırken bazal besiyerlerinin barındırdığı bileşenler göz önüne alınmıştır. Besiyerleri içerisindeki büyüme faktörleri, aminoasitler, vitaminler, tuzlar ve hormon gibi bileşenler karşılaştırıldığında DMEM F-12 besiyeri daha zengin içeriğe sahiptir. HUVEC hücreleri ilk birkaç pasajdan sonra DMEM ve DMEM F-12 besiyeri içerisinde üretilmiş ve hücrelerin sağlıklı bir şekilde uyum sağladıkları görüldükten sonra tamamiyle DMEM F-12 besiyerine geçiş yapılmıştır. Daha zengin içerikli besiyerine kolaylıkla uyum sağlayan ve ikilenme zamanında, morfolojilerinde herhangi bir değişiklik göstermeyen HUVEC hücreleri tez çalışması boyunca DMEM F-12 besiyerinde üretilmiştir. Bu sayede ortak kültürü yapılan BeWo ve HUVEC hücreleri aynı besiyerinde kültüre edilmiştir.

Hücreler buldukları flaskta %70-80 oranında kaplama gösterdiklerinde tripsinizasyon işlemi yapılmıştır. Hücrelerin ürettiği flasktan besiyerleri aspire edilmiştir. Kalan

besiyerini ve FSS'i uzaklaştırmak amacıyla Tripsin/Etilendiaminotetraasetik asit (EDTA) uygulaması yapılmıştır. Bu sayede adherent özellik gösteren BeWo ve HUVEC hücreleri üretildikleri flaskın yüzeyinden kaldırılmaktadır. Hücreler 25 cm²'lik flasklarda üretildikten sonra 1 mL Tripsin/EDTA ile 2 kez yıkanmıştır. Son yıkamada Tripsin/EDTA'nın 0,5 mL'si flask içerisinde bırakılıp etüvde yaklaşık 2 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda flasklar etüvden çıkartılmış ve mikroskopta süspansiyon hale gelip gelmedikleri kontrol edilmiştir. Süspansiyon hale gelen hücreler önceden hazırlanmış ve su banyosunda (Nüve, nb9, Türkiye) 37 °C' de ısıtılmış besiyeri ile biraraya getirilmiştir. Hazırlanan hücre süspansiyonları yeni flasklarda etüve kaldırılmış ve deneylerde kullanılmak üzere üretimleri sağlanmıştır.

3.1.2. BeWo ve HUVEC Hücrelerinin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Sıvı azot tankı (-195 °C) hücrelerin saklanması için sıklıkla tercih edilmektedir. Hücreler dondurulurken dondurma vasatı olarak adlandırılan bir solüsyona ihtiyaç duymaktadır. Dondurma vasatı içeriğinde DMSO ve FSS bulunmaktadır. DMSO gibi kriyoprotektanlar lizofilizasyonu kontrol altında tutmaktadır. Donma sürecinde sitoplazmadaki suyun kristallenip hücre içerisinde oluşturacağı mekanik hasarı engellemekte ve elektrolit seviyesini optimal değerlerde tutmaktadır.

Dondurulacak hücrelerin üreme dinamiğindeki lagoritmik (aktif) fazda olmaları gerekmektedir. Hücreler üretildikleri flasktan tripsinizasyon uygulaması ile kaldırılmıştır. Süspansiyon hale gelen hücreler 800 rpm hızla 5 dakika (Eppendorf Centrifuge, 5810R) santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında hücre pelletini elde etmek için süpernatant uzaklaştırılmıştır. Dondurma vasatı ile biraraya getirilen hücreler pipetaj yapıldıktan sonra kriyotüplere dağıtılmıştır. Kriyotüplerin üzerine hücre ile ilgili gerekli bilgiler yazılmıştır. Kriyotüp içindeki hücreler dereceli soğutularak azot tankından önce -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Hücreler iki gün sonra azot tankına transfer edilmiştir.

Çalışmada kullanılmak üzere azot tankından alınan hücreler su banyosunda 2-3 dakika 37 °C 'de ısıtılmış ve buzdan sıvı faza geçmesi sağlanmıştır. Çözülme işleminden sonra hücreler 800 rpm hızla 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre pelleti önceden hazırlanmış ve su banyosunda ısıtılmış besiyeri ile biraraya getirilmiş ve

pipetajın ardından içinde bir miktar besiyeri bulunan flaska alınmıştır. İnkübasyonlar, her iki hücre tipi için de % 5 CO₂ ve 37 °C koşullar altındaki etüvde (Sanyo, MCO18AC) gerçekleşmiştir.

3.2. Mikoplazma Testi

Hücrelerin tekli kültürlerinde herhangi bir kontaminasyon baskılanmasının olup olmadığının belirlenebilmesi için hücreler 3 pasaj boyunca antibiyotiksiz besiyeri kullanılarak üretilmiştir.

1. BeWo ve HUVEC hücreleri 8-9 cm²'lik (35mm) petri kaplarına (Nunc™ Delta) hücre sayısı sırasıyla 5x10⁵ hücre/mL ve 5x10⁴ hücre/mL olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler 48 saat boyunca etüvde inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyon sonunda hücrelerin besiyerleri aspire edilmiş ve sonrasında fiksasyon işlemi için hazırlanan metanol/asetik asit (3/1) solüsyonu (Carnoy's fiksatif) petrielerde oda sıcaklığında 3 dakika bekletilmiştir.
3. Metanol/asetik asit uzaklaştırıldıktan sonra fosfat tamponu (PBS) ile hücreler 2 dakika boyunca 1 kere yıkanmıştır.
4. Yıkamanın ardından hücrelere 300 nM DAPI boyası eklenerek 15 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Boyamanın ardından DAPI uzaklaştırılmış ve PBS ile 3 kez yıkanmıştır.
5. İşlemler sonunda DAPI'li Mounting Medium ile kapama işlemi yapılmıştır.
6. BeWo ve HUVEC hücreleri floresan eklentili inverted mikroskopta (Olympus CKX41, Japan), Dp Manager programı yardımıyla incelenmiştir.

3.3. Hücrelerin İkilenme Zamanlarının Belirlenmesi

BeWo ve HUVEC hücrelerinin tekli kültürasyonlarıyla üreme eğrileri çıkartılarak ikilenme süreleri hesaplanmıştır.

1. BeWo ve HUVEC hücreleri, hücre sayısı 5x10⁴ hücre /mL olacak şekilde 6 gözlü hücre kültürü plaklarına kuyucuk başına 2 mL hücre süspansiyonu olarak dağıtılmış ve 10 gün boyunca 2 tekrarlı olacak şekilde sayım yapılmıştır.
2. Ekilen hücrelerden t0 olarak kabul edilecek grup 4 saat boyunca etüvde inkübe edilmiştir. Ardından sayım için etüvden alınmıştır. Kalan gruplar ise

sayılacakları güne kadar 2 günde 1 besiyerleri değiştirilerek inkübasyona bırakılmıştır.

3. Besiyeri aspire edildikten sonra tripsinizasyon için kuyucuk başına 1 mL Tripsin/EDTA kullanılmıştır. Hücreler süspansiyon halinde geldiklerinde önceden hazırlanmış besiyeri eklenmiştir ve Bürker lamında Tripkan Mavisi kullanılarak sayım yapılmıştır. Yapılan 2 tekrarın ortalaması alınarak t₀ değeri elde edilmiştir. Takip eden günlerde kalan gruplar aynı saatlerde ve aynı yöntemle sayılmıştır. Değerler t₁, t₂, t₃... olarak kaydedilmiştir.

3.4. Vortioxetin Stok Çözeltisinin Hazırlanması ve Uygulanması

Çalışmada kullanılmak üzere, toz halindeki Vortioxetin etken maddesinin 5 mg'lık ana stoğu 1 mL DMSO içerisinde çözülürken elde edilmiştir. Yapılan ön çalışmalar sonucunda Vortioxetin için 24, 48 ve 72 saat uygulamaları için seçilen dozlar ana stoktan hazırlanan 1. Ara stok çözeltiden serumsuz besiyeri ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Doz uygulamaları hücrelerin ikilenme zamanlarına uygun olarak iki boyutlu hücre kültür deneylerinde BeWo ve oran grupları için 48 saat, HUVEC hücrelerinin ise 24 saat inkübasyonundan sonra yapılmıştır. Üç boyutlu hücre kültür deneylerinde ise hücrelerin agregat haline gelip sferoid oluşturmaları için 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Hücrelerin mono ve ortak kültürlerinde verdikleri orta toksik ve az toksik cevaba göre, uygulamada kullanılacak dozlar 2B ve 3B sistemlerde 7,5 µM, 15 µM ve 30 µM olarak seçilirken 3B sistemlerde Kalsein-PI-DAPI deneyi için bu doz gruplarına ek olarak 45 µM'lık Vortioxetin uygulama grubu eklenmiştir. Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun besiyerindeki son konsantrasyonu en fazla % 0,1 olacak şekilde belirlenmiştir.

3.5. MTS Canlılık Analizi

Satın alınan, CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit 48 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında ve 3B Petri Dish®'lerde sferoid hale getirilen hücrelerde canlılık oranının belirlenmesi için kullanılmıştır [100].

İki ve üç boyutlu deneyler için inkübasyon süresi sonunda 400 µL süpernatant bırakılan kuyucuk ve agarlar için 40 µL MTS reaktifi eklenerek 3 saat etüvde inkübasyon

gerçekleştirilmiştir. Sonrasında tetrazolium tuzlarının homojen hale gelmesi için hücreler çalkalayıcıda 10 dakika bekletilmiştir. Spektrofotometrede (BIO-TEK μ Quant, BIO-TEK Instruments, Inc, Amerika) 490 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedilmiştir.

Tez önerisinde canlılık analizlerinin Alamar Mavisi ile ölçüleceği belirtilmiştir. Ancak 3B mikro dokularda MTS canlılık analizlerinin sonuçları Alamar Mavisi analizlerine göre daha tutarlı yanıt verdiği için deneylere MTS analizi kullanılarak devam edilmiştir.

3.5.1. Mono ve Ortak Kültür Gruplarında MTS Analizi

Öncelikli olarak, HUVEC hücreleri DMEM ve DMEM F-12 olmak üzere iki farklı besiyerinde kültüre edildikten sonra 48 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına kuyucuk başına 2×10^4 hücre olacak şekilde 400 μ L hacimde ekim yapılmıştır. Hücrelerin 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca MTS canlılık analizleri yapılmıştır.

İki boyutlu kültüre edilen hücreler için, BeWo hücreleri için 2×10^5 hücre/mL, HUVEC hücreleri için ise 1×10^5 hücre/mL yoğunlukta hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Tekli kültürlerde BeWo hücreleri 400 μ L/kuyucuk (8×10^4 hücre), HUVEC hücreleri 200 μ L/kuyucuk (2×10^4 hücre) olacak şekilde ekim yapılmıştır. HUVEC hücreleri için süspansiyondan sonra üzerilerine 200 μ L besiyeri eklenerek toplam hacim 400 μ L'ye tamamlanmıştır. Oran grupları için 1:1, 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 olmak üzere farklı hücre oranlarıyla gruplar hazırlanmıştır. Hücrelerin 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca MTS canlılık analizleri değerlendirilmiştir.

Üç boyutlu kültüre edilen hücreler için, BeWo ve HUVEC hücrelerinin 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Tekli kültürler için polimerleşen agarların üzerine 100 μ L süspansiyon eklenmiştir. Oran grupları için 2:1, 3:1 ve 4:1 olmak üzere farklı hücre süspansiyonlarının ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücre ekiminden 3 gün sonra 24, 48 ve 72 saat boyunca MTS canlılık analizi yapılmıştır.

3.5.2. Vortiksetin Uygulama Gruplarında MTS Analizi

İki boyutlu kültüre edilen hücreler için, BeWo hücreleri için 8×10^4 hücre/kuyucuk HUVEC hücreleri 2×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Oran (3:1) grubu için ise her iki hücre süspansiyonundan belirli miktarlarda alınarak kuyucuk

başına toplam hücre sayısı 8×10^4 olacak şekilde hücre dağıtımı yapılmıştır. İnkübasyon sonunda hücrelere $7,5 \mu\text{M}$, $15 \mu\text{M}$ ve $30 \mu\text{M}$ Vortiooksetin uygulaması $400 \mu\text{L}$ /kuyucuk olacak şekilde yapılmıştır. Dozla inkübasyondan 24, 48 ve 72 saat sonra MTS canlılık analizi yapılmıştır.

Üç boyutlu kültüre edilen hücreler için, BeWo ve HUVEC hücrelerinin 1×10^5 hücre/agar olacak şekilde hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Oran (3:1) grubu içinse her iki hücre süspansiyonundan belirli miktarlarda alınarak agar başına toplam hücre sayısı 1×10^5 olacak şekilde hücre dağıtımı yapılmıştır. Agarlarda 3 gün boyunca inkübe edilmesi sonucu sferoid hale gelen mikro dokulara 12 kuyucuklu plakalarda uygulama yapılmıştır. Doz uygulaması için serumsuz besiyerinde hazırlanan $7,5 \mu\text{M}$, $15 \mu\text{M}$ ve $30 \mu\text{M}$ Vortiooksetin çözeltileri $1,5 \text{ mL}$ /agar olacak şekilde uygulanmıştır. Dozların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarından sonra mikro dokular üzerine MTS reaktifi eklenerek canlılık analizleri yapılmıştır.

Deney gruplarındaki canlılık miktarı bu şekilde hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Uygulama grubu OD}}{\text{Kontrol grubu OD}} \times 100$$

3.6. Forskolin Uygulaması

BeWo hücrelerinin sinsityotrofoblast hücre tipine farklılaştırılması için forskolin maddesi DMSO içerisinde 12 mM konsantrasyonda ana stok çözeltisi olarak hazırlanmıştır ve -20°C 'de saklanmıştır. BeWo hücreleri 8 kuyucuklu plakalarda ekildikten sonra iki gün inkübe edilmiştir. İki gün sonunda hücrelerin besiyerleri aspire edilmiştir. Hazırlanan ana stok forskolin çözeltisi serumsuz DMEM F-12 besiyerinde $100 \mu\text{M}$ konstantrasyona dilüe edilerek ara stok hazırlanmıştır. Sonrasında ara stoktan $20 \mu\text{M}$ 'lık çalışma solüsyonu hazırlanmış ve sitotrofoblastik BeWo hücreleri üzerilerine eklenmiştir. DMSO'da çözdürülen forskolin maddesinin negatif kontrol grubu olarak kullanılan DMSO besiyerindeki son konsantrasyonu en fazla $\%0,1$ olacak şekilde belirlenmiştir.

3.7. Sferoidlerin (Mikro dokuların) Oluşturulması

3.7.1 Agar Jellerin Hazırlanması

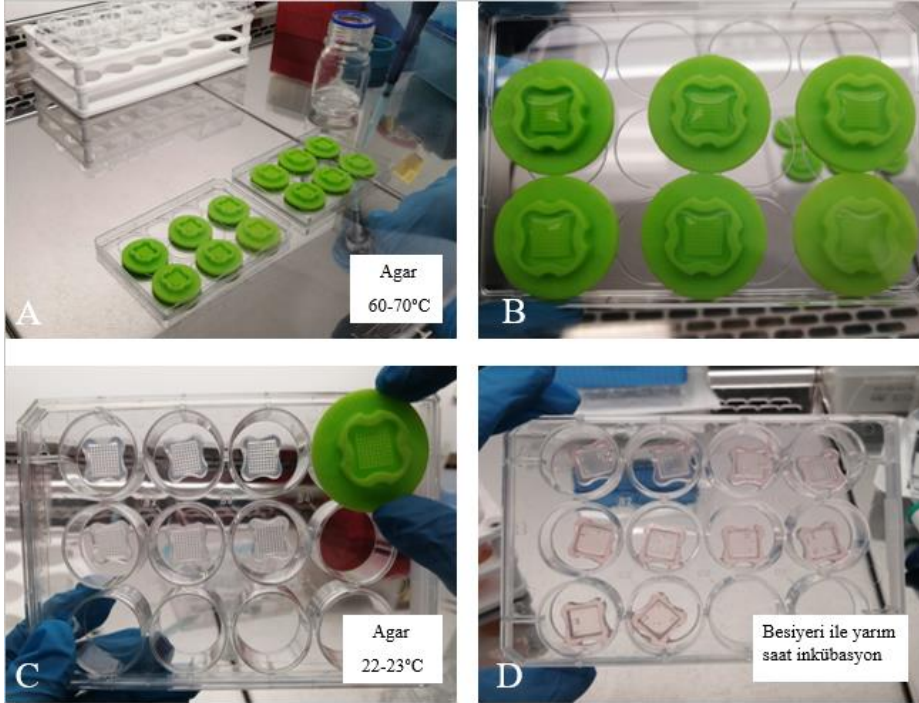
Üç boyutlu Petri Dish® kalıplarında mikro doku üretimi için öncelikle kalıplara konulacak agaroz jellerin hazırlanması gerekmektedir. Hazırlanan agar solüsyonunun katılaşp kalıplardan çıkartıldıktan sonra üzerine hücreler ekilmektedir. Agar jellerin üzerindeki homojen boşluklarda hücrelerin kendiliğinden kümelenmesiyle sferoid mikro dokular oluşmaktadır.

Üç boyutlu Petri Dish® kalıpları sterilizasyon için öncelikle distile suda çalkalanmıştır. Ardından %70'lik etanolde 15 dakika bekletilmiştir. Kuruduktan sonra uygun cam kaplara alınıp otoklavlanmıştır. Steril hale getirilen kalıpların herbiri için 500 µL hacimde agaroz solüsyonu hazırlanmıştır.

Agar solüsyonunun hazırlanması için, öncelikle 1 gram agaroz toz cam şişe içerisinde alınmıştır. Diğer yandan 50 ml salin (Distile suda hazırlanan %0,9'luk NaCl) agaroz tozun içine eklenmiştir. Agaroz tozu ve eklenen salin (%2'lik (g/ml) agaroz) iyice karıştırılmış ardından otoklavlanmıştır. Agar solüsyonu oda sıcaklığında 60-70°C'ye kadar soğutulmuş ardından alkollenip biyogüvenlik kabininde daha önce aseptik hale getirilmiş Petri Dish® kalıplarına mikro pipet yardımıyla aktarılmıştır. Agar solüsyonu oda sıcaklığında polimerleştikten sonra Petri Dish® kalıpları esnetilerek agar jeller çıkartılmıştır. Steril küt uçlu bir pens yardımıyla 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına yerleştirilen agar jeller hücre ekiminden önce yukarıda bahsedilen besiyerlerinin serumsuz hali (2,5 mL/kuyucuk) ile etüvde 15-30 dakika inkübe edilmiştir.

Öncelikli olarak BeWo hücreleri kullanılarak agar jeller üzerinde oluşturulacak sferoidler için hücre sayısı kalibre edilmiştir. Bu deneyde, 8×10^4 hücre/agar ve 1×10^5 hücre/agar olacak şekilde 2 farklı hücre konsantrasyonu kullanılmıştır. Hücre ekimi 100 µL hücre süspansiyonu/agar olarak gerçekleştirilmiştir. Ekimden 1 saat sonra agarların üzerine 2,5 mL besiyeri eklenmiştir. Hücreler bu şekilde etüve kaldırılmış ve 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda BeWo hücreleri 2 gruba ayrılmıştır. Gruplardan birinin besiyeri değiştirilmiş, diğerinin ise üzerindeki besiyeri aspire edildikten sonra 20 µM konsantrasyondaki forskolin maddesi 2,5 mL/agar eklenerek sinsityotrofblast hücre tipine farklılaşması sağlanmıştır. Forskolin maddesi 48 saat boyunca uygulandığında farklılaşma gerçekleşmektedir. Farklılaşma tamamlandıktan

sonra agaroz içindeki sferoid gruplarına 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyonlarda MTS canlılık analizi ve 8 gün boyunca çap ölçümü yapılmıştır. Bu deneyde sferoid gruplarını oluşturmak için kullanılması gereken hücre sayısı belirlenmiştir.



Şekil 3.1. A. Petri Dish® kalıpları üzerine ısıtılmış ve steril agaroz dökülmesi, B. Agarozların oda sıcaklığında soğuması, C. Katılaştıran agarozu kalıplardan çıkartılması, D. Agarozların hücre ekiminden önce serumsuz besiyeri ile inkübasyonu gösterilmiştir.

3.8. Canlı Hücre Boyama (CellTracker™)

Hücrelerin mono kültür ve ortak kültürde lokalizasyonlarının belirlenmesi için floresan özellikteki CellTracker™ boyaları kullanılmıştır. CellTracker boyalar özellikle 3B hücre kültürü ve ortak kültür yapılan çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir. Hücelere toksik etkisi bulunmayan bu boyalar ışığa etkisini 4-5 gün kadar korumaktadır. Ayrıca hücreler büyüme ortamlarında ikilenirken de floresan problemleri mitoz bölünme sırasında sonraki kuşağa aktarmaktadır.

CellTracker™ boyalar hücre içerisinde tiyol (-SH) gruplarıyla reaksiyona giren klorometil veya bromometil grupları içermektedir. Bu sayede tiyol gruplarına bağlanarak detoksifikasyonda rol alan Glutasyon S-transferaz (GST) aracılı enzim ile reaksiyona girmekte ve detoksifiye edilmektedir [101].

Çizelge 3.2. CellTracker™ boya bilgileri.

| Hücre | Moleküler Ağırlık (g/mol) | Solüsyon Konsant. | Uyarma (Ex nm) | Emisyon (Em nm) |
|----------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------|--------------------|
| BeWo (Yeşil) | 464.9 | 15 µM | 492 | 517 |
| HUVEC (Kırmızı) | 686.3 | 15 µM | 577 | 602 |

Satın alınan toz halindeki CellTracker™ boyalar -20°C’de saklanmıştır. CellTracker™ çalışma solüsyonlarının hazırlanması için oda ısısına getirilmiştir. Ürün ana stok 10 mM konstantrasyonda olacak şekilde DMSO’da çözdürülmüştür. Daha sonra ana stok serumsuz besiyerinde BeWo ve HUVEC hücreleri için 15 µM konsantrasyonda dilüe edilmiştir. Boya kullanılmadan önce su banyosunda 37°C’de ısıtılmıştır. CellTracker™ boyalar ile inkübe edilecek hücrelerin flaska ekilip önceden konfluent olması sağlanmıştır. Konfluensi %70-80’e ulaştığında hücrelerin besiyeri aspire edilmiştir. Hücrelerin boyayı zardan alımını kolaylaştırmak için steril PBS solüsyonu içerisinde hazırlanmış % 0,2’lik Tween-20 ile hücreler etüvde 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücrelerin üzerinden Tween-20 solüsyonu aspire edilmiştir ve flasklar için tripsinizasyon gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımından sonra BeWo ve HUVEC süspansiyonları ayrı ayrı steril 15 mL’lik falkonlara alınmıştır. Hücreler 800 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu sırada her hücre için 500 µL hacimde ve 15 µm konsantrasyonda CellTracker™ boyalar serumsuz besiyerinde hazırlanmıştır. Santrifüjden sonra hücrelerin süpernatantları dökülerek yerine hazırlanan 500 µL CellTracker™ boya eklenmiştir. Falkon içerisindeki hücreler etüvde 45 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler 800 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Boyalı süpernatant döküldükten sonra hücrelerin üzerine deney için gerekli miktarda serumlu besiyeri eklenmiştir.

Hücre ekimi 2B sistemler için, 48 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında gerçekleştirilmiştir. Tekli ve ortak kültürler için kuyucuk başına 6×10^4 hücre/400 µL süspansiyon olarak eklenmiştir. Hücrelerin kuyucuklara ekiminden sonra alüminyum

kaplı plakalar etüve kaldırılmıştır. İki boyutlu sistemde BeWo ve HUVEC ortak kültüründe kullanılacak oranı belirlemek için BeWo:HUVEC ortak kültür gruplarında 3:1, 4:1 ve 5:1 hücre oranları denenmiştir. CellTracker™ boya ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilen hücrelerin görüntüleme ve floresan ölçümleri öncesinde besiyerleri çekilerek 2 kere PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Bu sayede hücrelerin içerisine giremeyen boyaların fazla ışması ortadan kaldırılmıştır.

Petri Dish 3B sistemlerde CellTracker™ boyama protokolü 2B sistemlerde bahsedildiği şekilde boyanmıştır. BeWo ve HUVEC hücreleri için 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan agarlara 1×10^5 hücre/100 µL süspansiyon eklenmiştir. Üç boyutlu sistemde BeWo ve HUVEC ortak kültürlerinde kullanılacak oranı belirlemek için BeWo:HUVEC ortak kültür gruplarında 2:1, 3:1 ve 4:1 hücre oranları denenmiştir. Hücreler agarlara ekildikten yarım saat sonra 2,5 mL/agar olacak şekilde besiyeri eklenmiştir. İnkübasyon için etüve kaldırılan 12 kuyucuklu hücre kültürü plakaları karanlıkta inkübe edilmiştir. Hücreler 24, 48, 72, 96 ve 120 saat inkübe edilmiştir. Hücrelerin lokalizasyonları, oluşturdukları sferoidlerin bütünlüğü ve büyüklüğü 5 gün boyunca floresan görüntüleri Cellsens Master Software V1.12 programı kullanılarak çekilmiştir.

İki ve üç boyutlu sistemlerde belirtilen inkübasyon süreleri boyunca hücre lokalizasyon ve miktarlarının belirlenebilmesi için EVOS Hücre Görüntüleme Sistemi (Life technologies, Thermofisher) ile görüntüler alınmıştır ve 2B grupları için Ensight multimode plate plaka okuyucuda (Perkin Elmer) absorbanları ölçülmüştür. Görüntüler ImageJ programı ile düzenlenmiştir.

3.9. Kalsein AM-PI-DAPI Floresan Boyama ile Sferoidlerde Canlılık Analizi

Sferoidlerdeki canlı hücreleri yeşil, ölü hücreleri kırmızı ve çekirdekleri mavi renge boyamak üzere bir boya karışımı hazırlanmıştır. PI 50 µg/mL ara stoktan PBS ile seyreltilme yapılarak 10 µg/mL konsantrasyonda boya hazırlanmıştır. Hazırlanan PI boyası üzerine son konsantrasyonunu 300 nM olacak şekilde DAPI çekirdek boyası eklemiştir. Son olarak 4 mM ana stok kalsein boyasından son konsantrasyonu 2 µM olacak şekilde boya karışımına eklenmiştir. Hazırlanan boya karışımında PI 10 µg/mL, DAPI 300 nM, kalsein ise 2 µM konsantrasyonda kullanılmıştır. BeWo, HUVEC ve

Oran (3:1) gruplarının 1×10^5 hücre/agar olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Agarlarda 3 gün boyunca inkübe edilen mikro dokulara 30 μM ve 45 μM Vortioksetin çözeltileri 1,5 mL/agar olacak şekilde uygulanmıştır. Dozların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarından sonra mikro dokular üzerindeki Vortioksetin aspire edilmiş ve agar başına 100 μL hacimde boya karışımı konmuştur. Pozitif kontrol grubu için 1 mM konsantrasyonda Hidrojen Peroksit kullanılmıştır. Hücreler yarım saat etüvde inkübe edildikten sonra Cellsens Master Software V1.12 programında uygun floresan filtrelerde görüntülenmiştir. Alınan görüntüler ImageJ programı kullanılarak birleştirilmiştir.

3.10. Bariyer Bütünlüğünün Ölçümü (Transepiteliyel Elektriksel Direnç-TEER) ve Na-F Akış Analizi

BeWo hücreleri için 9×10^5 hücre/mL, HUVEC hücreleri için 4×10^5 hücre/mL yoğunlukta hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Hücreler floresan okutma uygunluğu için fenol redsiz DMEM F-12 serumlu besiyerinde süspanse hale getirilmiştir. Her iki hücre 500 μL /insert olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültürü plakaları içerisine yerleştirilen 0,4 μm por ölçekli insertlere ekilmiştir. Hücre ekilecek insertler hücre ekiminden 1 saat önce serumlu besiyeri ile inkübe edilmiştir. Mono kültürlerle birlikte 3:1 oran grubu için BeWo hücre süspansiyonundan 337 μL , HUVEC hücre süspansiyonundan ise 280 μL alınarak süspansiyonu hazırlanmıştır. Bazal bölüme 1,5 mL serumlu besiyeri eklenmiştir. TEER ölçümü ve sodyum floresan tuz akış miktarının belirlenebilmesi için aynı hücre sayıları ile eş zamanlı olarak iki deney de başlatılmıştır. Hücrelerin TEER direnci ve Na-F miktarı her gün ölçülmüştür ayrıca hücrelerin 2 günde bir besiyerleri tazelenmiştir. TEER ölçümlerinin sabitlendiği gün 15 μM ve 30 μM Vortioksetin uygulaması yapılmıştır. Na-F ölçümü için ölçümden 1 saat önce hücrelerin apikal bölmeden besiyeri çekilmiştir. Onun yerine 5 μM konsantrasyondaki sodyum tuzu 500 μL /insert olacak şekilde eklenmiştir. Bir saat inkübasyondan sonra bazal bölmeye geçen miktarın belirlenebilmesi için 50 μL hacimde örnek toplanmıştır. Örnekler floresan okutmaya uygun olarak siyah 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında Excitation/Emission 460/580 dalga boylarında okutulmuştur. TEER ve Na-F deneyleri eş zamanlı olarak doz uygulamasından itibaren 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlarda gerçekleştirilmiştir.

3.11. E-kaderin ve F-aktinin İmmüfloresan Boyaması

E-kaderin immüfloresan boyaması, BeWo hücreleri başlangıç sayısı 5×10^5 olacak şekilde 8 kuyucuklu plaklarda ekilmiştir. Hem forskolin maddesinin uygulanmasından sonra hücre farklılaşması markörü olarak hem de hücrelerin bağlantı noktalarını Vortiooksetinden önce ve sonraki görüntülerini elde etmek için kullanılan E-kaderin boyama aşağıda maddelenen şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Hücreler besiyeri dökülerek %4'lük paraformaldehit ile oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.
2. Fikse edilen hücreler absol alkolde 20 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur. Kuyucuklardaki absol alkol aspire edildikten sonra %0,3'lük Triton-X'li PBS ile 3 kez 2'şer dakika yıkama yapılmıştır.
3. Fikse edilen hücrelerin permeabilizasyonu için %0,1'lik Triton-X ile 10 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Ardından %0,3'lük Triton-X'li PBS ile 3 kez 2'şer dakika yıkama yapılmıştır.
4. Hücreler boyanırken spesifik olmayan bölgelerdeki ışımanın önlenmesi için %3'lük BSA'da 30 dakika bekletilmiştir.
5. Primer antikor tavşanda geliştirilmiş insana karşı poliklonal E-kaderin %3'lük BSA'da 1:100 dilüe edilmiş ve hücrelerle nemli ortamda 1 gece boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir.
6. Hücreler PBS ile 3 kez 2'şer dakika yıkanmıştır.
7. Keçide tavşana karşı geliştirilen ve Alexa Fluor® 488 (yeşil) işaretli sekonder antikor %3'lük BSA'da 1:2000 dilüsyonda hazırlanmış ve 45 dakika boyunca oda sıcaklığında ışık almayacak şekilde bekletilmiştir.
8. Sekonder antikor uygulamasından sonra hücreler PBS ile 3 kez 2'şer dakika yıkanmıştır.
9. Sekiz kuyucuklu plakalar çıkartılıp DAPI'li kapatma ortamı kullanılarak lamel ile kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar -20°C 'de ve karanlıkta saklanmıştır. Görüntüler Olympus CKX18 inverted mikroskop altında incelenmiştir.

F-aktin immüfloresan boyaması, BeWo hücreleri başlangıç sayısı 5×10^5 olacak şekilde 8 kuyucuklu plaklarda ekilmiştir. Vortiooksetinin uygulanmasından önce ve

son hücre iskeletindeki hasarların belirlenmesi için yapılan bu boyamanın protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Hücrelerin besiyeri dökülerek %4'lük paraformaldehit ile oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir.
2. Fiksatif aspire edildikten sonra %0,3'lük Triton-X'li PBS ile 3 kez 2'şer dakika yıkama yapılmıştır.
3. Hücrelerin blokajı için %3'lük BSA'da 45 dakika bekletilmiştir.
4. DMSO ile dilüe edilen 66 µM'lık (400X) Phalloidin Alexa Fluor 555 (Kırmızı) ana stoğu, %0,1'lik BSA/PBS ile (0,5 µL ana stok/200 µL BSA/PBS) seyreltilmiş ve çalışma solüsyonu olarak uygulanmıştır. Oda sıcaklığında 1 saat boyunca bekletilmiştir.
5. Florokrom bağlı phalloidin direkt uygulanmasından sonra hücreler PBS ile 3 kez 2'şer dakika yıkanmıştır.
6. Sekiz kuyucuklu plakalar çıkartılıp DAPI'li kapatma ortamı kullanılarak lamel ile kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar -20°C'de ve karanlıkta saklanmıştır. Görüntüler Olympus CKX18 inverted mikroskop altında incelenmiştir.

3.12. Serotonin Geri Alım (SERT) Reseptörlerinin İmmü Floresan Boyaması

SERT reseptörlerinin buldukları hücredeki lokalizasyonundan dolayı yapılarının korunması ve immü floresan görüntülerinin doğru bir şekilde alınması için hücrelerin üretildiği flasklardan hasatı tripsin enzimi değil kazııcıyı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu sayede hücreler biyokimyasal reaksiyona maruz kalmayıp yalnızca mekanik kuvvet ile toplanmış ve hücre zarına bağlı SERT reseptörlerinin yapısal bütünlüğü korunmuştur [73]. Hücreler başlangıç sayısı 5×10^5 olacak şekilde 4 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Hücreler 48 saat etüvde inkübe edildikten sonra immü floresan boyama basamakları aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

1. Hücrelerin besiyeri aspire edildikten sonra %4'lük paraformaldehit ile 10 dakika boyunca fiksasyonu gerçekleştirilmiştir.
2. Hücrelere PBS ile 3 kez 2'şer dakika yıkama yapılmıştır.

3. Permeabilizasyon için 10 dakika boyunca %0,1'lik Triton-X ile hücreler bekletilmiştir.
4. Hücelere PBS ile 3 kez 2'şer dakika yıkama yapılmıştır.
5. Spesifik olmayan antikor bağlanmalarının önlenmesi için hücreler %1'lik BSA'da 1 saat bekletilmiştir.
6. Hücreler 1 gece boyunca 4°C'de %1'lik BSA'da 2 µg/mL konsantrasyona getirilen SLC6A4 Rekombinant Tavşan Monoklonal Antikor ile bekletilmiştir.
7. Hücelere PBS ile 3 kez 2'şer dakika yıkama yapılmıştır.
8. Keçide tavşana karşı geliştirilen ve Alexa Fluor® 488 (yeşil) işaretli sekonder antikor %1'lük BSA'da 1:2000 dilüsyonda hazırlanmış ve 45 dakika boyunca oda sıcaklığında ışık almayacak şekilde bekletilmiştir.
9. Hücelere PBS ile 3 kez 2'şer dakika yıkama yapılmıştır.
10. Dört kuyucuklu plakalar çıkartılıp DAPI'li kapatma ortamı kullanılarak lamel ile kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar -20°C'de ve karanlıkta saklanmıştır. İmmünfloresan görüntüler Olympus CKX18 inverted mikroskop altında Cellsens Master Software V1.12 programı kullanılarak incelenmiştir.

3.13. β -HCG Hormon Seviyesinin ELISA ile Ölçülmesi

ELISA β -hCG hormon miktarı ölçüm deneyleri için, 2B gruplarında BeWo, HUVEC ve 3:1 oran grubu 48 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekilmiştir. Hücre sayıları BeWo hücreleri için 2×10^5 hücre/mL, HUVEC hücreleri için 1×10^5 hücre/mL hazırlanmıştır. Kuyucuk başına BeWo süspansiyonundan 400 μ L ekilmiştir. HUVEC hücreleri için 200 μ L süspansiyon koyulmuş üzerine 200 μ L serumlu besiyeri eklenmiştir. Ortak kültür grubu için hazırlanan BeWo hücre süspansiyonundan 300 μ L, HUVEC hücre süspansiyonundan 200 μ L eklenmiştir. BeWo ve 3:1 oran grupları 2 gün inkübe edildikten sonra, HUVEC hücrelerine 24 saat sonunda 7,5 μ M, 15 μ M ve 30 μ M Vortiooksetin uygulaması yapılmıştır.

3B gruplarında BeWo, HUVEC ve 3:1 oran grubu agarlara ekilmiştir. Hücre sayıları BeWo ve HUVEC hücreleri için 1×10^6 hücre/mL olarak hazırlanmıştır. Agar başına süspansiyonlardan 100 μ L ekilmiştir. Ortak kültür grubu için hazırlanan BeWo hücre süspansiyonundan 75 μ L, HUVEC hücre süspansiyonundan 25 μ L eklenmiştir. Hücreler 1 saat etüvde inkübe edildikten sonra üzerlerine 2,5 mL serumlu besiyeri eklenmiştir ve 3 gün sonra 7,5 μ M, 15 μ M ve 30 μ M Vortiooksetin uygulaması yapılmıştır.

2B ve 3B sistemlerde BeWo, HUVEC ve 3:1 oran gruplarının kontrol, 7,5 μ M, 15 μ M ve 30 μ M Vortiooksetin ile inkübe edilmiş kültürlerinden süpernatantlar alınarak alikotlanmış ve -20°C 'de saklanmıştır.

Hormon kitleri için standart eğri grafiği çıkartılmıştır. Örneklerdeki hormon miktarlarının belirlenmesi için aşağıdaki prosedür uygulanmıştır.

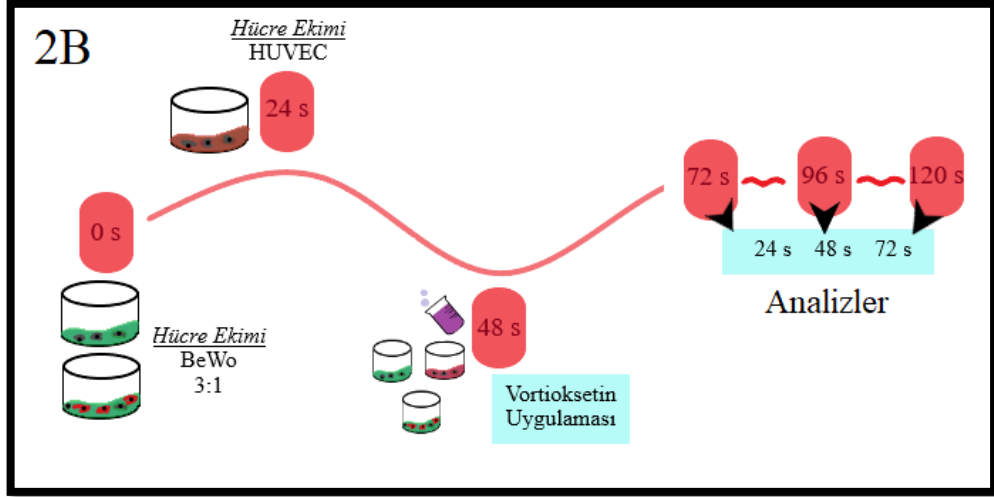
1. Alikotlanan süpernatant örnekleri ve kit solüsyonları oda sıcaklığına getirilmiştir.
2. Örnekler 5 dk boyunca, 5000 rpm hızda ve 22°C 'de santrifüj edilmiştir (Hettich, Mikro 22R, Zentrifüjgen, Almanya).
3. Dilüe edilen örneklerden 25 μ L alınarak kit içerisinde bulunan antijen kaplı 96 kuyucuklu ELISA plakalarına konulmuştur. Üzerlerine 100 μ L enzim konjugat eklendikten sonra çalkalayıcıda 10-15 sn çalkalanmıştır. Örnekler ve konjugat 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.
4. Kuyucukların içerisindekiler dökülmüş ve 5 kez 300 μ L distile su ile yıkama yapılmıştır.

5. Her bir örnek üzerine 100 µL substrat solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir.
6. Kuyucuklarda gerçekleşen antijen-antikor reaksiyonunu durdurmak için durdurma solüsyonundan 50 µL/kuyucuk olacak şekilde eklenmiştir.
7. ELISA cihazında 450 nm dalga boyunca okutma yapılmıştır. Standart örneklerinin konsantrasyon-absorbans (OD) değerlerinin belirlenebilmesi için 4-parametre grafik seçilmiştir.

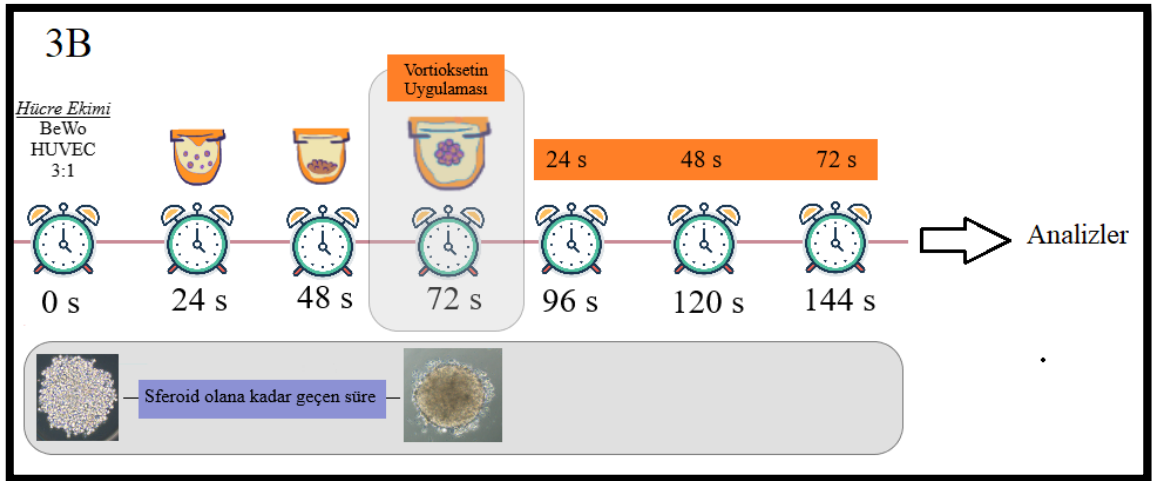
3.14. İstatistiksel Yöntemler

Çalışmanın istatistiksel analizleri STATISTICA 13 ve IBM SPSS Statistics 23 istatistik programı kullanılarak önem kontrolü $P \leq 0,05$ düzeyinde incelenmiştir. Statistica programında, uygulanan Vortioksetinin analizi için varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Deneylerde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar incelendiğinden varyans analiz modeli oluşturulurken her parametre için “Vortioksetin konsantrasyonu” ve “inkübasyon süresi” olmak üzere iki değişken seçilmiş, dolayısıyla çok-yönlü varyans analizi (Factorial ANOVA) kullanılmıştır. Verilerin anlamlılıklarına bağlı olarak ileri (post hoc) testler uygulanmış ve eşit örneklem büyüklüğüne dayalı Tukey testi kullanılmıştır. SPSS programı içinse konsantrasyon değişkeni olmayan deneylerde tek-yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) kullanılmıştır.

Şekil 3.2 ve Şekil 3.3.'te 2B ve 3B deneyler için inkübasyon saatleri ve Vortiooksetin uygulamalarının gösterildiği deney planları verilmiştir.



Şekil 3.2. 2B sistemde deney planı.



Şekil 3.3. 3B sistemlerde deney planı.

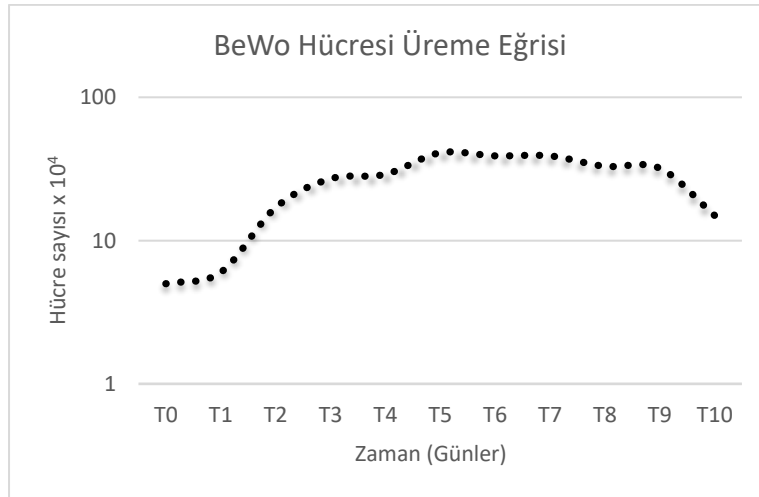
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Sterilite Testi

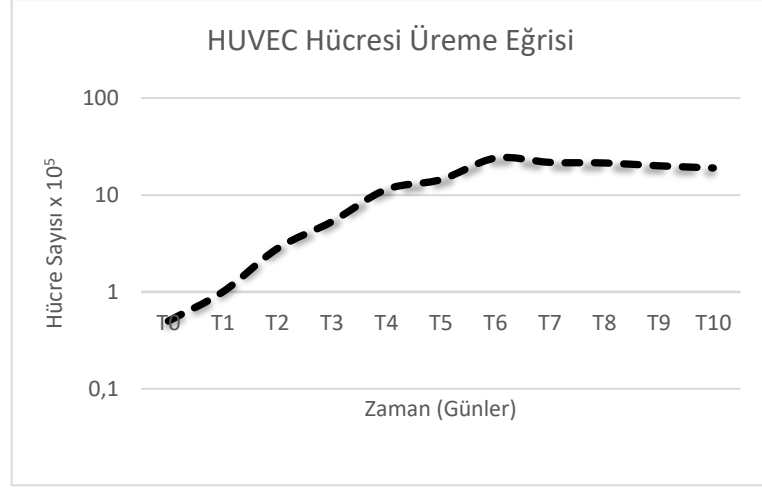
BeWo ve HUVEC hücrelerinde DAPI çekirdek boyaması yapılarak mikoplazma varlığı test edilmiştir. Boyama sonucunda ekstrasükleer ışına görülmemiş ve sağlıklı hücreler ile tez deneylerine başlanmıştır.

4.2. Hücrelerin Üreme Eğrileri ve Morfolojisi

BeWo ve HUVEC hücrelerinin üreme karakterlerinin belirlenebilmesi için 10 gün boyunca yapılan hücre sayımının grafikleri oluşturularak ikilenme zamanları hesaplanmıştır. BeWo hücrelerinin üreme eğrisi (Şekil 4.1.) sonuçlarına göre hücre sayısındaki artış T2'de başlayarak T5'e kadar devam etmiştir. İkilenme zamanının elde edilebilmesi için logaritmik grafik verileri kullanılarak hesaplama yapılmıştır. BeWo hücreleri için ikilenme süresi PDT=39 saat olarak belirlenmiştir. HUVEC hücrelerinin sayım sonuçları kullanılarak elde edilen logaritmik üreme eğrisine göre (Şekil 4.2.) en yüksek hücre sayısı T6'da görülmektedir. Çizilen grafiğe göre HUVEC hücrelerinin ikilenme zamanı PDT=25 saat olarak belirlenmiştir.

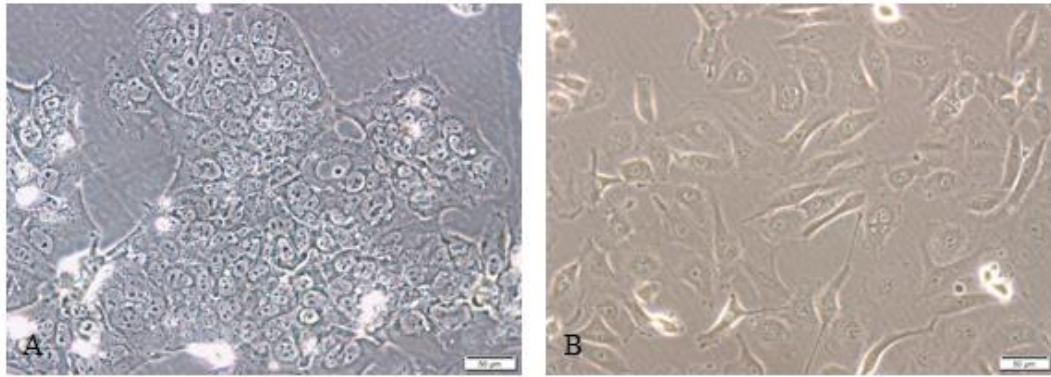


Şekil 4.1. BeWo hücrelerinin üreme eğrisi.



Şekil 4.2. HUVEC hücrelerinin üreme eğrisi.

BeWo ve HUVEC hücrelerinin (Şekil 4.3.) morfolojileri ışık mikroskopunda incelenmiştir. İki hücre tipi de adherent olarak üremektedir ve epitel tipte hücrelerdir. BeWo hücreleri kümeli olarak proliferer olurken, HUVEC hücreleri tek tabakalı olarak çoğalmaktadır.



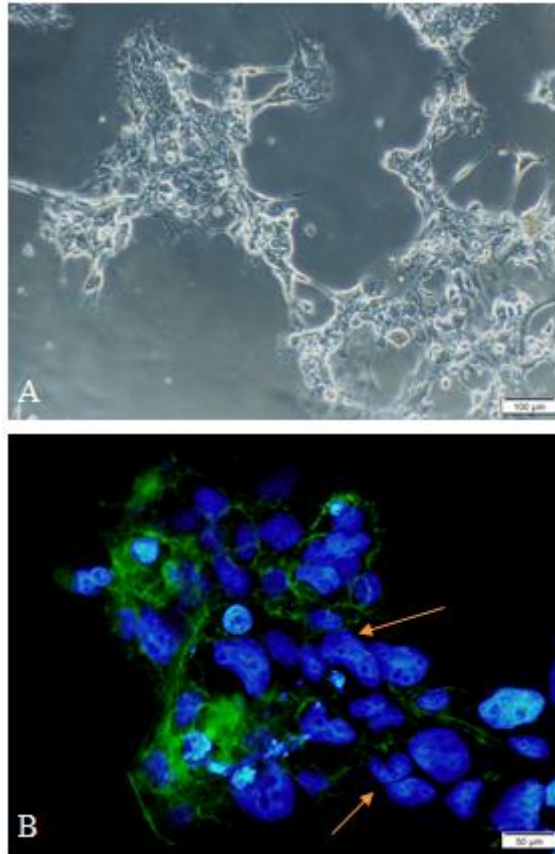
Şekil 4.3. Hücrelerin inverted mikroskop görüntüleri. A. BeWo, B. HUVEC hücreleri.

4.3. İki Boyutlu BeWo Hücrelerinde Forskolin Uygulaması ve E-Kaderin IF Görüntüsü

Hücrelerin forskolin maddesiyle muamelesinden sonra sinsityum hale gelerek sinsityotrofoblast hale farklılaştığı E-kaderin ve DAPI immünfloresan boyası yapılarak kanıtlanmıştır. Kullanılan forskolin maddesinin 20 μM 'lık çalışma solüsyonu aynı inkübasyon sürelerinde BeWo hücrelerine uygulanmış ve MTS testi ile hücrelerde toksik etki yaratmadığı görülmüştür.

Forskolinle BeWo hücrelerini sinsitleştirmenin belirteci olarak kullanılan E-kaderin boyama, polinükleer çekirdekli sinsityotrofoblastlarda hücre zarında pozitif boyanmasıyla belirlenmektedir (Şekil 4.4.). In vitro plasantal model oluşturulması amaçlanan 2020 yılında yayınlanan bir çalışmada, BeWo tabakasının sinsityal füzyonunu karakterize etmek için hücreler arasındaki plazma zarı sınırlarını görselleştiren E-kaderinin immüno Floresan boyama yapılmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre E-kaderin ifadesi BeWo hücrelerinin çekirdekleri arasında azalma göstermiştir. Ayrıca çekirdekler daha büyük ve daha az olarak gözlenmiştir. Sonuçta, oksijene bağımlı bir şekilde olan sinsityal füzyon yüzdesinin önemli ölçüde arttığı ortaya çıkarılmıştır [102].

Forskolin uygulamasıyla BeWo hücrelerinin farklılaşmasından sonra HUVEC hücreleriyle ortak kültürleri inkübasyon süresi farklılığından dolayı gerçekleştirilememiştir. BeWo hücrelerinin agarlara ekiminden 2 gün sonra uygulama yapılması ve uygulamadan 2 gün sonra farklılaşmanın gerçekleşmesi HUVEC hücrelerinin üreme profillerine uygun değildir.



Şekil 4.4. Sinsityotrofoblast (SynBeWo) hücre görüntüsü, A. İverted mikroskop görüntüsü, B. E-Kaderin-DAPI floresan görüntüsü, (→) polinükleer hücreler.

Ortak kültüre edilen hücrelerin inkübasyonlarında 4 günlük zaman farkı canlılık analizlerinde ve hormon ölçümlerine doğru yanıt vermeyeceği düşünüldüğünden ortak kültür deneylerine sitotrofoblast hücrelerini yansıtan BeWo hücreleri kullanılarak tez deneylerine devam edilmiştir. Bu sayede gebeliğin ilk 3 ayındaki plasentanın yapısı yansıtılmış ve Vortioxetine verdiği yanıt incelenmiştir.

4.4. İki Boyutlu Sistemlerde Hücre Canlılık Analizi Sonuçları

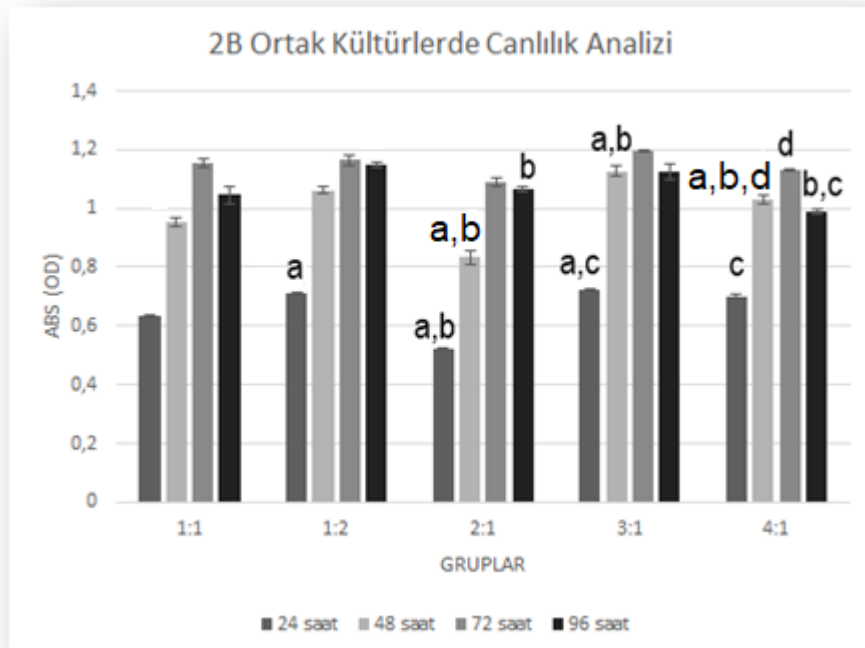
4.4.1. Ortak Kültür Gruplarının Belirlenmesinde MTS Analizi

*In vivo*ya yakın anlamlı sonuçlar elde edebilmek için insan plasentasını taklit eden modellere ihtiyaç duyulmaktadır, çünkü plasenta diğer dokular göz önüne alındığında türe özgü farklılık gösteren bir dokudur. Yapılan *in vitro* modellerde çoğunlukla BeWo transfer modelleri kullanılmasına rağmen plasenta bariyerinin çok katmanlı yapısı, yüksek dinamik çevreye sahip bir fizyolojik ortam içermesi noktaları gözönünde bulundurulduğunda tek başına kullanımının yetersiz olduğu düşünülmektedir [103]. Plasental bariyerleri oluşturmak için kullanılan modellerinin çoğunda fetal endotel tabakası sıklıkla ihmal edilmektedir. Oysa ki endotel hücreleri plasenta bariyerinde ilave bir geçirgen tabaka oluşturduğundan önemli bir yere sahiptir ve yeni modellere dahil edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, amniyon zarı üzerine insan trofoblast ve endotel hücre hattı (HUVEC) ekilerek gösterdikleri fetoplasental uyumluluk kanıtlanmıştır [104]. Bir diğer çalışmada, tek hücreli (HTR8) modele kıyasla ikili hücreli (HTR8 ve HUVEC) plasenta modelinde glukoz geçişinin daha az, geçiş direncinin daha fazla olduğu gösterilmiştir [105]. Son yıllarda yapılmış bir çalışmada, BeWo hücreleri ve primer insan plasental villus endotel hücreleri kullanılarak çip üzerinde bir plasenta modeli oluşturulmuştur. Bu modelde, glukoz transfer hızının (% 34,8), *ex vivo* perfüzyonlu plasentaya (% 26,5-38,3) yakın bir değerde olduğu gösterilmiştir [106]. Gebelikte plasentanın anjiyogenezinde morfolojileri ve fonksiyonlarının ifadesi için iki temel hücre grubu bulunmaktadır. Bunlardan birisi HUVEC (insan göbek kordun veni makrovasküler endotel hücresi) diğeri ise HPEC (insan plasenta mikrovasküler endotel hücresi)'dir. Plasental vasküler ağ oluşumunu HPEC hücrelerine

dayandırılmaktadır ve *in vivo* anjiyogenezin öncelikle bu mikro çevrede meydana geldiği bilinmektedir. HPEC hücreleri primer kaynaklı olduklarından pasajlanma imkanının kısıtlı olması, alındığı donöre göre farklılıklar göstermesi sebebiyle ve en önemlisi uzun süreli deneylerde canlılıklarını koruyamamaları nedeniyle tez çalışmasında tercih edilmemiştir. HPEC ve HUVEC hücrelerinin plasental anjiyogenezini yansıtmada en uygun hücrenin HUVEC hattı olduğu belirtilmiştir [107].

Ortak kültür grupları oluşturulurken iki boyutlu deneylerde farklı hücre oranları kullanılarak canlılık analizi yapılmıştır.

Farklı hücre oranları ile yapılan MTS canlılık analizinde, tüm gruplarda 96 saat sonunda canlılığın 72 saate göre düştüğü görülmektedir. 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda 3:1 grubunun canlılığı en yüksek değerde görülmüştür. Canlılığı 24 saat için 1:1 ve 2:1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. 48 saat içinse 1:1 ve 1:2 grubundan anlamlı olarak canlılığı yüksek bulunmuştur. Canlılık analizi sonuçları şekil 4.5'te verilmiştir.

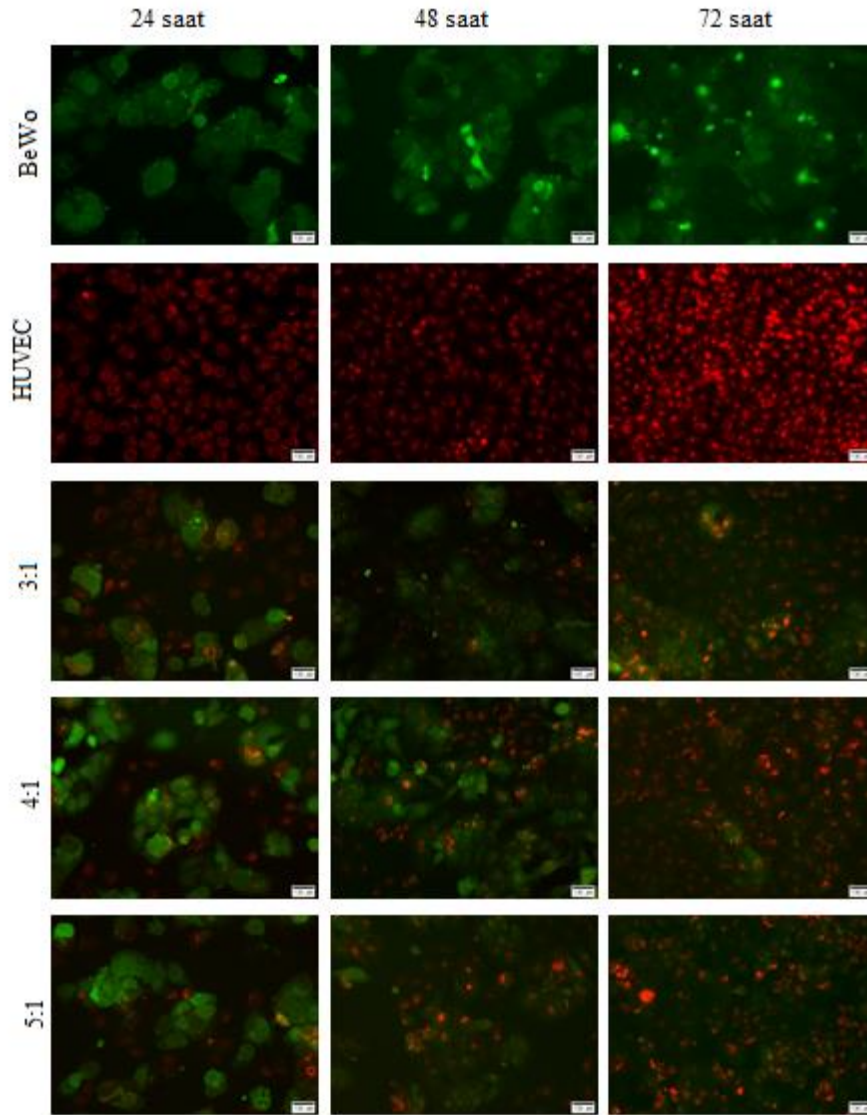


Şekil 4.5. BeWo ve HUVEC 2B ortak kültür gruplarında 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyon sonrası MTS canlılık analizi.

^a 1:1 grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b 1:2 grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c 2:1 grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^d 3:1 grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^e 4:1 grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

4.4.2. Mono ve Ortak Kùltùrlerde CellTracker Canlı Hùcre Boyama Gùrùntùleri ve Floresan Òlçümü

2B oran gruplarının MTS analizlerinden sonra 3:1, 4:1 ve 5:1 gruplarında ve mono kùltùrlerde CellTracker boyama yapılmıştır (şekil 4.6.). Hùcrelerin MTS analizinde verdikleri canlılık değerleri (OD) BeWo ve HUVEC hùcrelerinin birlikte verdikleri yanıt olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle mono kùltùrlerle birlikte hùcrelerin ortak kùltürü yapıldığında hùcrelerin morfolojilerini izlemek, ikilendiklerinde toplam hùcre sayısı içerisindeki oranları floresan boyama ile gùrùntülenmektedir.



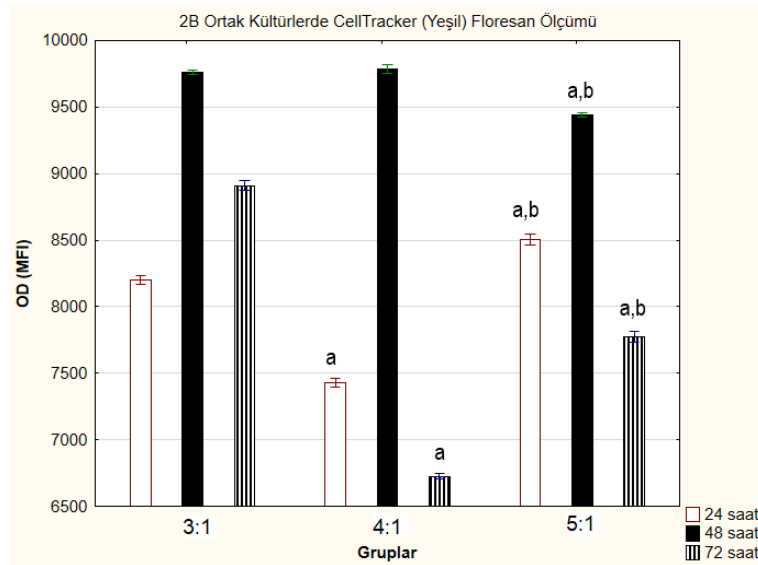
şekil 4.6. 2B mono ve ortak kùltùrlerde CellTracker boyama floresan gùrùntùleri. Yeşil renkte BeWo ve kırmızı renkte HUVEC hùcreleri (100 μ M òlek).

Oran gruplarında ise 4:1 ve 5:1 grubu plasenta dokusunu temsil edecek BeWo ve HUVEC hücrelerinin ortak kültürü için BeWo hücre miktarının fazla olduğu sonucuna varılmıştır. 3:1 oran grubu BeWo ve HUVEC hücreleri için uygun miktarda yoğunluk göstermiştir.

CellTracker boyama floresan mikroskopta görüntülenebildiği gibi floresan okuyucu ile floresan ışımalarının ortalama yoğunluğunu vermektedir. Alınan sonuçlara göre, yeşil renk CellTracker boyasının floresan ölçümlerinde (Şekil 4.7.), 4:1 hücre grubu 3:1 hücre grubuna göre 24 ve 72 saat inkübasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır.

5:1 hücre grubu ise 24 saatte 3:1 ve 4:1 grubundan anlamlı derecede yüksek floresan ışımaları verirken, 48 saat inkübasyonda 3:1 ve 4:1 hücre grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede azalmıştır. 72 saat inkübasyon süresi sonunda ışımaları 3:1'e göre azalmış, 4:1'e göre anlamlı derecede artmıştır.

72 saatlik inkübasyon incelendiğinde 3:1 oran grubunun floresan ışımaları en yüksek değerde ölçülmüştür.



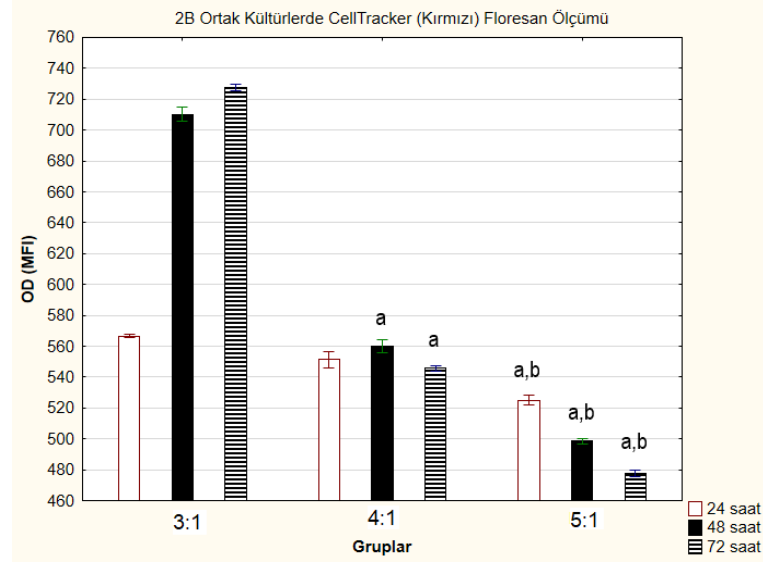
Şekil 4.7. 2B ortak kültürlerde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası CellTracker BeWo hücrelerine ait yeşil boyama floresan ölçümleri.

^a 3:1 grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b 4:1 grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c 5:1 grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kırmızı renkte CellTracker floresan boyasının ölçümlerinde (Şekil 4.8.) 4:1 oran grubu 3:1 hücre grubuna göre 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda istatistiksel olarak önemli

derecede azalmıştır. 5:1 hücre grubunda ise tüm inkübasyon sürelerinde 3:1 ve 4:1 oran gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma görülmüştür.

3:1 oran grubu incelendiğinde 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda diğer gruplara göre floresan ışımının daha yüksek olduğu görülmüştür.



Şekil 4.8. 2B ortak kültürlerde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası CellTracker HUVEC hücrelerine ait kırmızı boyama floresan ölçümleri.

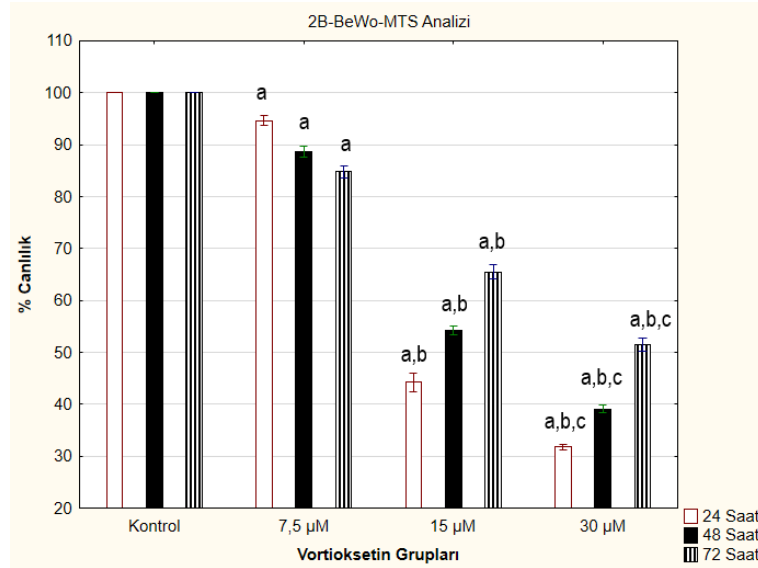
^a 3:1 grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b 4:1 grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c 5:1 grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Özellikle 3B ortak kültür modellerinin oluşturulmasında CellTracker boyalarının kullanılması hücrelerin lokalizasyonu ve sferoid oluşturma potansiyelleri hakkında nitel sonuçlar vermektedir [48,108].

4.4.3. Mono ve Ortak Kültürlerde Vortiooksetin Uygulamasında Canlılık Analizleri

BeWo, HUVEC tekli ve 3:1 oranında ortak kültürdeki hücrelere Vortiooksetin uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkileri MTS hücre canlılık testi ile incelenmiştir. Vortiooksetin uygulanan mono kültür ve ortak kültürdeki hücrelerin % canlılık grafikleri ayrı olarak verilmiştir. Kontrol ve DMSO grupları arasında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır ve grafiklerde sadece kontrol grubuna yer verilmiştir. BeWo hücresine ait canlılık grafiği Şekil 4.9.'da verilmiştir. 7,5 μ M Vortiooksetin uygulanan BeWo hücresinin canlılık yüzdesi inkübasyon süresine bağlı olarak kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalma göstermiştir. 15 μ M Vortiooksetin doz grubunun BeWo

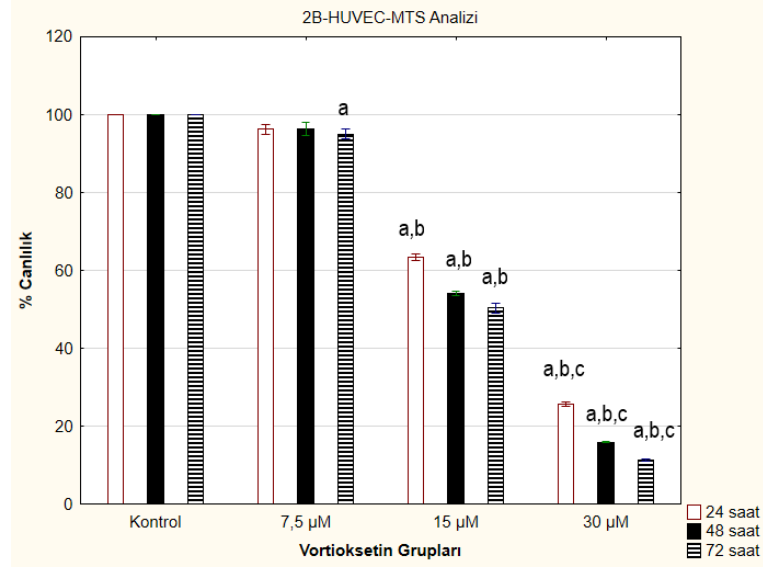
hücredeki canlılık yüzdesi kontrol grubuna ve 7,5 µM doz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. 30 µM Vortioksetin doz grubunun BeWo hücredeki canlılık yüzdesi ise kontrol grubuna, 7,5 µM ve 15 µM doz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. 7,5 µM Vortioksetin grubunda inkübasyon sürelerine göre canlılık azalırken, 15 µM ve 30 µM grubunda canlılık inkübasyona göre artış göstermiştir.



Şekil 4.9. BeWo hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat Vortioksetin uygulaması sonrası hücre canlılık yüzde değişim grafiği.

^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b 7,5 µM Vortioksetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c 15 µM Vortioksetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

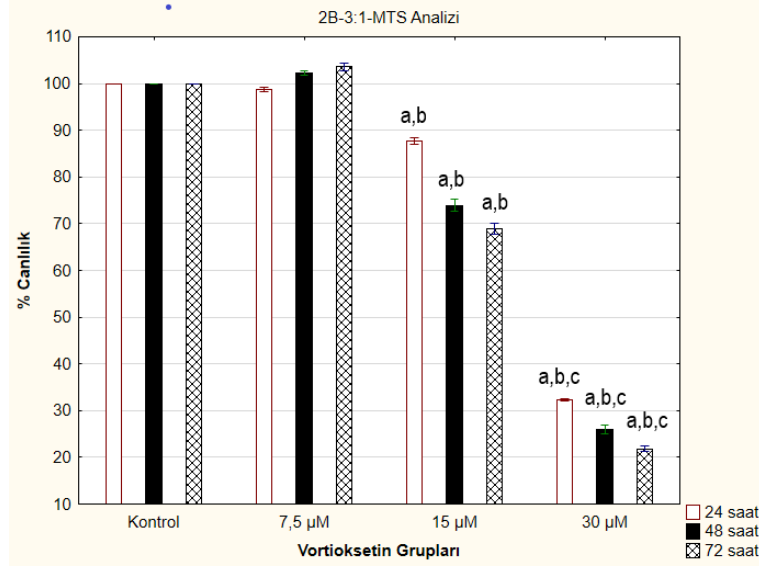
HUVEC hücrelerine ait canlılık grafiği Şekil 4.10.'da verilmiştir. 7,5 µM Vortioksetin uygulanan HUVEC hücrelerinin 72 saat sonrası hücre canlılık yüzdesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalmıştır. 15 µM ve 30 µM Vortioksetin gruplarının HUVEC hücredeki canlılık yüzdesi inkübasyon sürelerine bağlı olarak kontrol grubu ve 7,5 µM doz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derece azalmıştır. 30 µM Vortioksetin doz grubunun canlılık yüzdesi ise 15 µM doz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. 7,5 µM Vortioksetin grubunda inkübasyon saatlerine göre anlamlı bir farklılık gözlenmezken, 15 µM ve 30 µM grubunda inkübasyon saatlerine bağlı olarak canlılıkta düşüş görülmektedir.



Şekil 4.10. HUVEC hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat Vortioxetin uygulaması sonrası hücre canlılık yüzde değişim grafiği.

^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b 7,5 µM Vortioxetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c 15 µM Vortioxetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

3:1 ortak kültür grubuna ait canlılık grafiği Şekil 4.11.'de verilmiştir. 7,5 µM Vortioxetin uygulanan 3:1 grubunun 48 ve 72 saat sonrası hücre canlılık yüzdesinde kontrol grubuna göre artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir. 15 µM doz grubunun 3:1 hücre oranı üzerindeki canlılık yüzdesi kontrol grubuna ve 7,5 µM dozuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir. 3:1 hücre oranına 30 µM Vortioxetin uygulanması inkübasyon sürelerine bağlı olarak canlılık yüzdesini 7,5 µM ve 15 µM doz gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır. 7,5 µM Vortioxetin grubunda canlılık kontrol grubundan yüksek çıkmasıyla birlikte 15 µM ve 30 µM Vortioxetin gruplarında canlılık inkübasyon süresine bağlı olarak düşüş göstermiştir.



Şekil 4.11. 3:1 BeWo ve HUVEC ortak kültürlerinde 24, 48 ve 72 saat Vortioxetin uygulaması sonrası hücre canlılık yüzde değişim grafiği.

^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b 7,5 µM Vortioxetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c 15 µM Vortioxetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

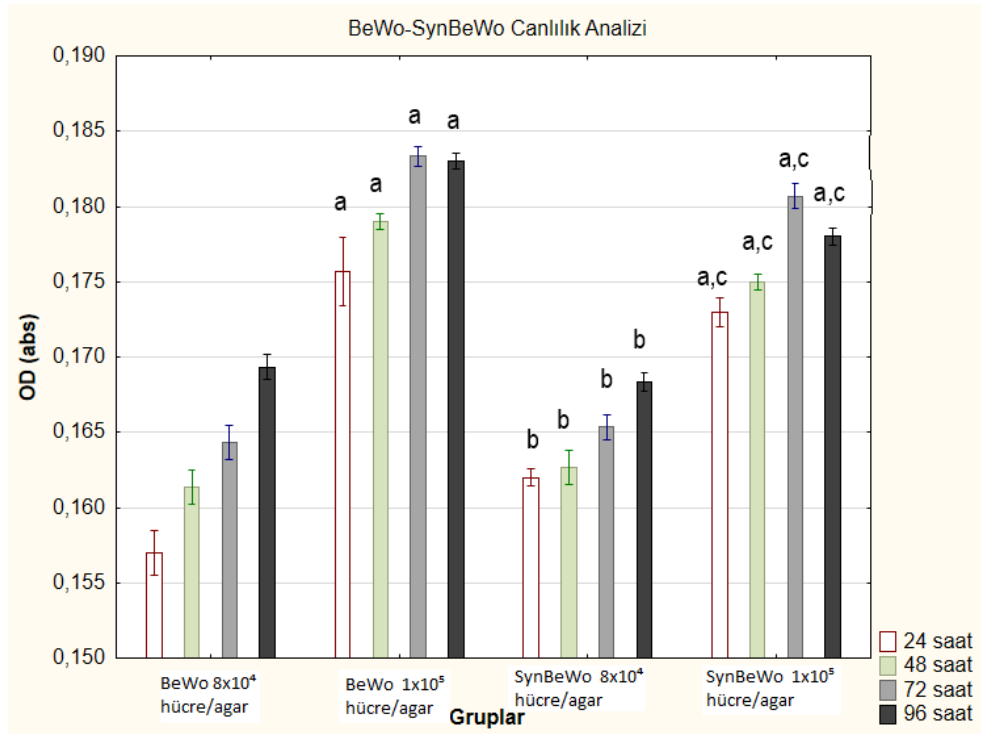
Vortioxetin'in literatürde *in vitro* çalışmalarda toksisite kaynağı olmamakla birlikte 2020 yılında yapılan bir çalışmada primer insan monositleri üzerinde 1 nM-10 µM aralığında Vortioxetin uygulaması yapıp MTT ile canlılık analizleri yapılmıştır. Bu doz aralıklarının hücrelerin canlılığında kontrol grubundan farklı olarak anlamlı derecede bir düşüş görülmediği belirtilmiştir [109]. Primer hücrelerin hassasiyeti göz önünde bulundurulduğunda tez kapsamında hücre hatları üzerinde Vortioxetin'in farklı konsantrasyondaki toksisiteyi incelenmiştir. BeWo ve HUVEC hücrelerinin Vortioxetin uygulamasından sonraki 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlar için IC_{50} konsantrasyonları Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Hesaplamalar SPSS programı kullanılarak probit analizi ile yapılmıştır.

Çizelge 4.1. BeWo ve HUVEC hücrelerinin Vortioxetin maruziyeti ile IC_{50} konsantrasyonları.

| IC_{50} konsantrasyonları (µM) | 24 saat | 48 saat | 72 saat |
|----------------------------------|---------|---------|---------|
| BeWo | 17,3 | 16,9 | 26,3 |
| HUVEC | 17,5 | 14,4 | 14 |

4.5. Üç Boyutlu Sistemlerde BeWo ve SynBeWo Gruplarında Canlılık ve Çap Ölçüm Sonuçları

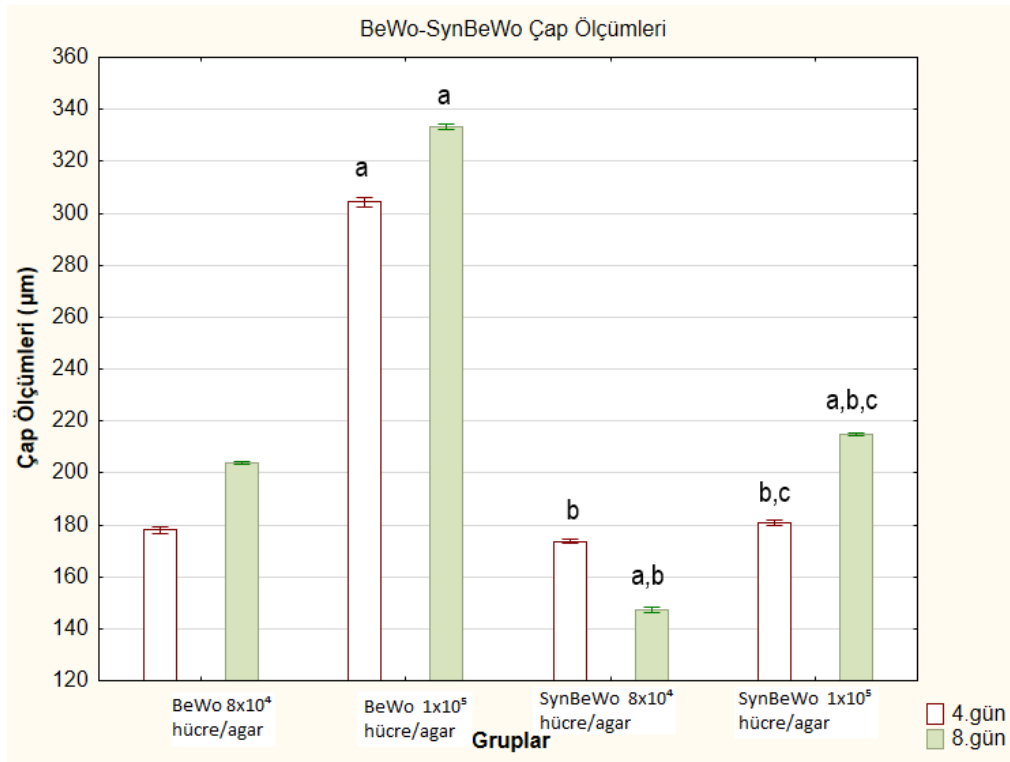
BeWo ve SynBeWo hücreleri hücre farklılaşması tamamlandıktan sonra (96 saat) MTS uygulaması yapıp absorbans sonuçlarına göre hücrelerde canlılık karşılaştırması yapılmıştır. BeWo ve SynBeWo 8×10^4 hücre/agar gruplarında canlılık diğer gruplara kıyasla düşük çıkmıştır. Kullanılan hücre sayısı sferoid oluşumu için ve doku bütünlüğünün sağlanması için yeterli kalmamıştır. Bu durumda deneyler 1×10^5 hücre/agar konsantrasyondaki hücre süspansiyonlarıyla gerçekleştirilmiştir. BeWo 1×10^5 hücre/agar grubunun tüm inkübasyonlarda BeWo 8×10^4 hücre/agar grubuna göre anlamlı derecede canlılığı yüksek görülmüştür. SynBeWo 1×10^5 hücre/agar grubunun ise tüm inkübasyonlarda SynBeWo 8×10^4 hücre/agar grubuna göre anlamlı derecede canlılığının yüksek olduğu belirlenmiştir. Canlılık analizi sonuçları şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. BeWo ve SynBeWo hücrelerinde 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyon sonrası MTS canlılık analizi.

^a BeWo 8×10^4 hücre/agar grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b BeWo 1×10^5 hücre/agar grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c SynBeWo 8×10^4 hücre/agar grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

BeWo ve SynBeWo hücre grubunda MTS analizinden sonra sferoidlerin çap uzunlukları ölçülmüştür. BeWo 1×10^5 hücre/agar grubunun 4. ve 8. gün ölçülen çapı BeWo 8×10^4 hücre/agar grubuna göre anlamlı derecede fazla görülmüştür. SynBeWo 1×10^5 hücre/agar grubunun çap uzunluğu ise SynBeWo 8×10^4 hücre/agar grubunun 8.gün ölçülen çap uzunluğuna göre anlamlı derecede fazla olduğu belirlenmiştir. 8×10^4 hücre/agar gruplarında MTS canlılık analizi sonuçlarına uygun olarak çap uzunluklarında diğer gruplara göre daha düşük değerler elde edilmiştir. Bu da sferoid oluşturmada hücre sayısının yetersiz olmasıyla doku bütünlüğünün sağlanmadığını ve hücrelerin canlılıklarında düşüş olduğunu göstermektedir. Çap ölçümleri sonuçları şekil 4.13'te verilmiştir.



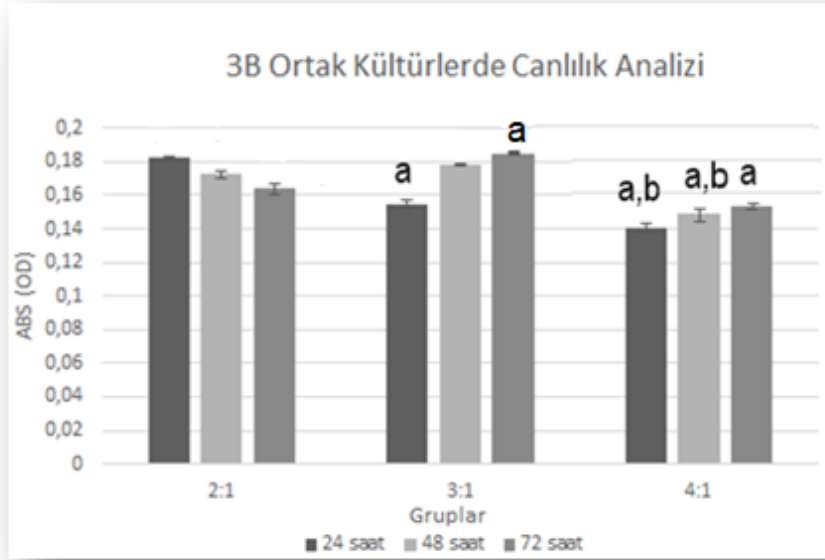
Şekil 4.13. BeWo ve SynBeWo hücrelerinde 4. ve 8. gün inkübasyon sonrası çap ölçümü.

^a BeWo 8×10^4 hücre/agar grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b BeWo 1×10^5 hücre/agar grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c SynBeWo 8×10^4 hücre/agar grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

4.6. Üç Boyutlu Sistemlerde Hücre Canlılık Analizi Sonuçları

4.6.1. Ortak Kültür Gruplarının Belirlenmesinde MTS Analizi

Ortak kültür grubu sferoidlerde BeWo ve HUVEC hücre miktarlarının belirlenebilmesi için farklı hücre miktarlarında gruplar oluşturularak 24, 48 ve 72 saat boyunca MTS canlılık analizi yapılmıştır. Çıkan sonuçlara göre, 4:1 oran grubu 2:1 ve 3:1 grubuna göre 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda anlamlı derecede düşüş göstermiştir. 2:1 oran grubu inkübasyon saatlerine göre azalış gösterirken 3:1 oran grubunun 24, 48 ve 72 saat boyunca canlılığı artmıştır. Canlılık analizi sonuçları şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.14. Sferoid ortak kültür gruplarında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası MTS canlılık analizi.

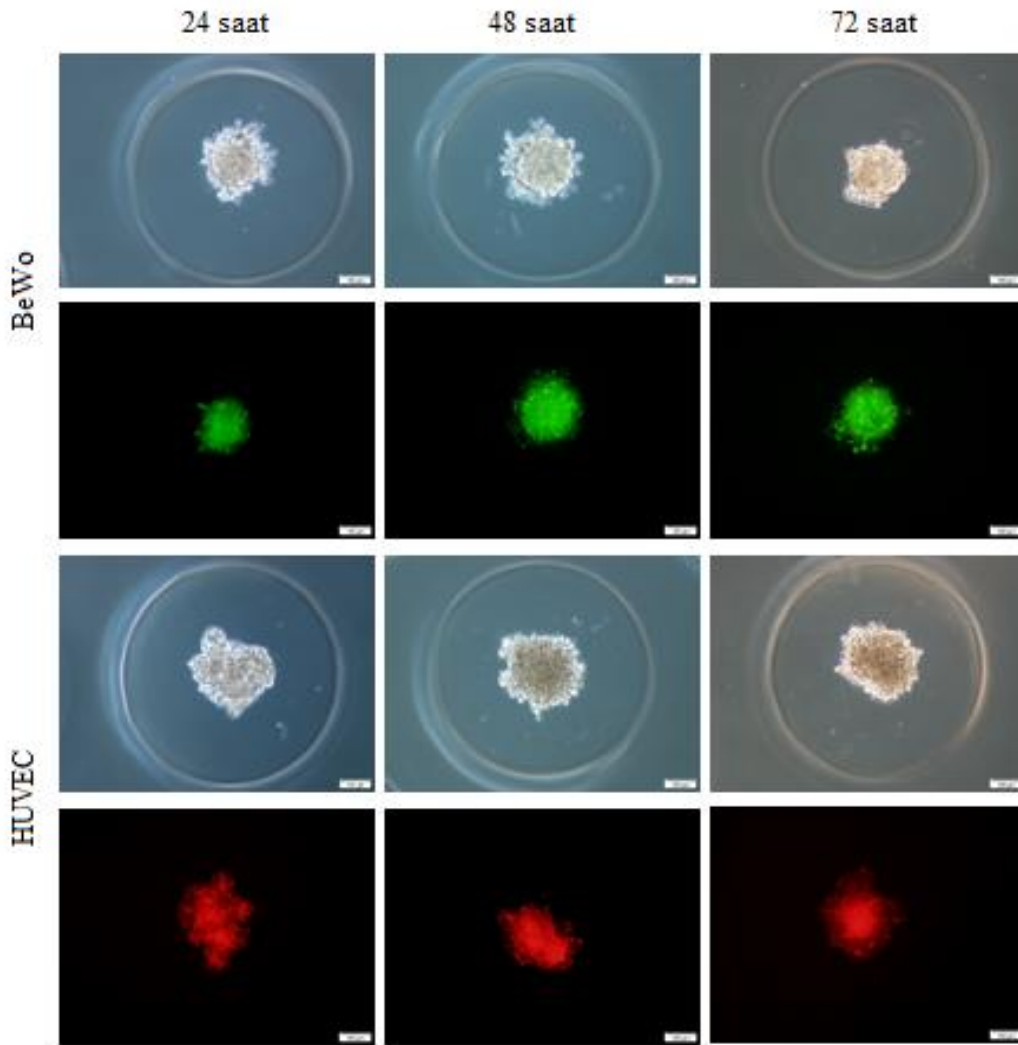
^a 2:1 grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b 3:1 grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c 4:1 grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

BeWo ve insan villus mezenşimal fibroblastlar ile mikro doku oluşturulan bir çalışmada, öncelikle fibroblastların sferoid olması için 3 günlük inkübasyonları sağlanmıştır. Sferoid oluşumu tamamlandıktan sonra BeWo hücreleri ile inkübasyonu devam ettirilmiş ve 5. günde mikro doku oluşumu tamamlanmıştır [110]. BeWo ve HUVEC hücrelerinin birlikte kültüre edilmesinden 3 gün sonra sferoid oluşturması tez kapmasında oluşturulan modelin inkübasyon süresi bakımından avantajını

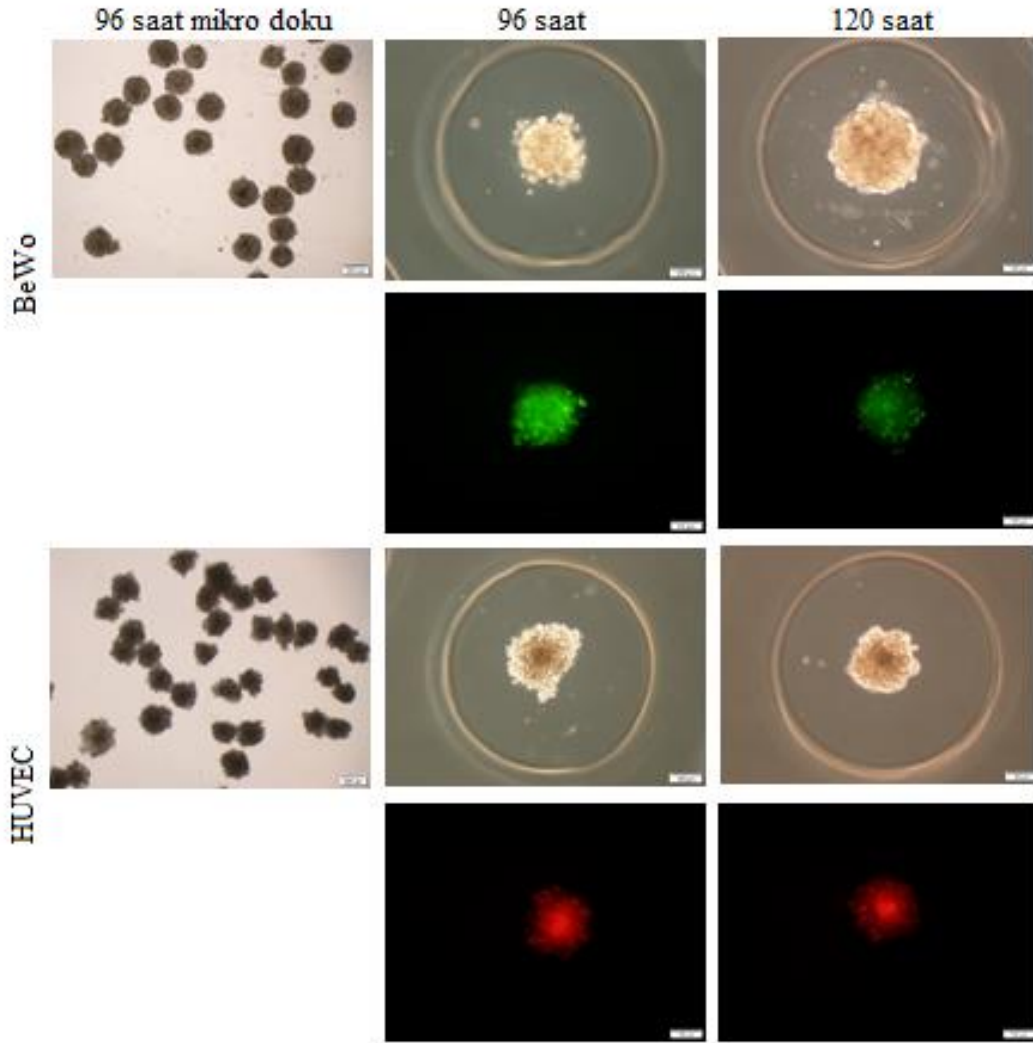
göstermektedir. Bu durumun sebebinin hızlı proliferasyon olan ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarıyla çalışılması olarak öngörülmektedir.

4.6.2. Mono ve Ortak Kültürlerde CellTracker Canlı Hücre Boyama Görüntüleri

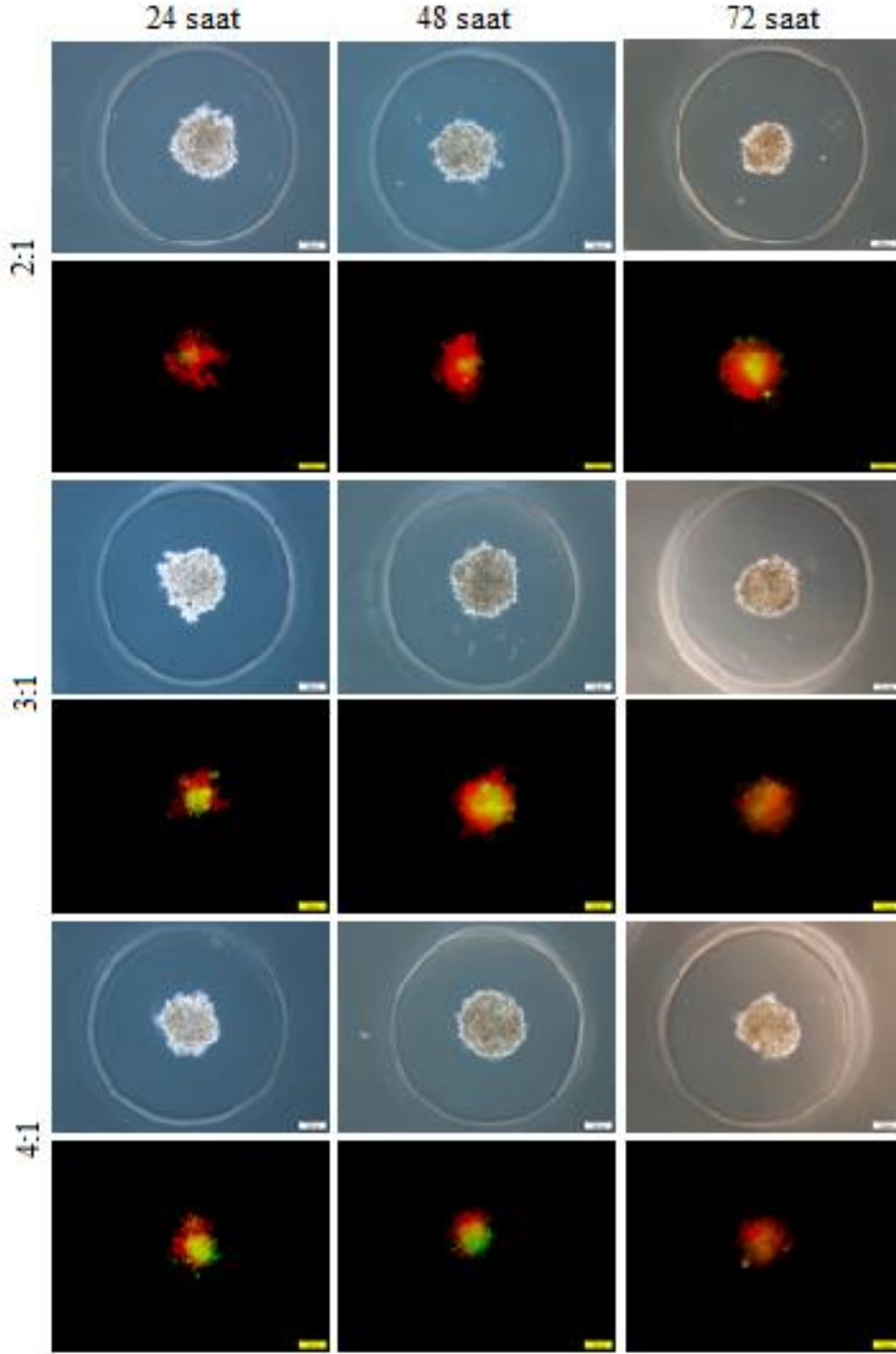
BeWo, HUVEC ve 3:1 oran gruplarında sferoid oluşum süreci ve hücrelerin lokalizasyonunu belirlemek amacıyla 120 saat boyunca görüntüleme yapılmıştır (Şekil 4.15/16/17/18.). Mono kültürlerde 120 saatin sonunda CellTracker boyamalarında ışımının azalması görülmektedir. İnkübasyon sürelerine bağlı olarak hücrelerde sferoid oluşumu 72. saatten itibaren görülmektedir. 2:1, 3:1 oran gruplarında HUVEC hücreleri sferoidin periferinde, BeWo hücreleri ise kor bölgesinde görülmektedir (Şekil 4.23.). 4:1 oran grubunda hücreler 72 saate kadar rastgele dağılım göstermektedir. İnkübasyon süresinin devamında sferoidlerin bütünlüğü tamamlanmıştır. 120 saatin sonunda mikro dokularda bozulma görülmemiştir.



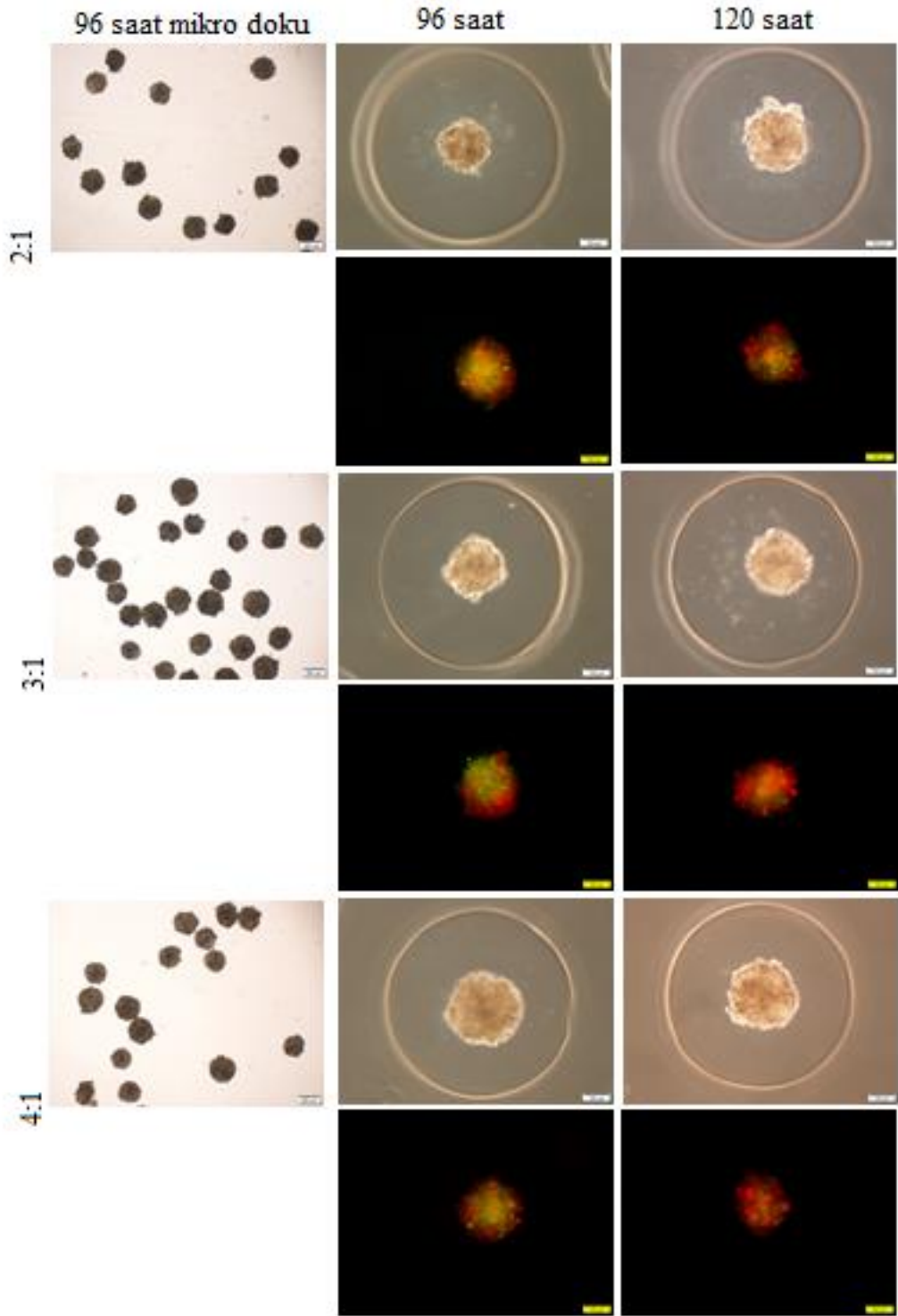
Şekil 4.15. 3B BeWo ve HUVEC mono kültürlerde 24, 48 ve 72 saat CellTracker boyama floresan görüntüleri (Agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 µM ölçektedir).



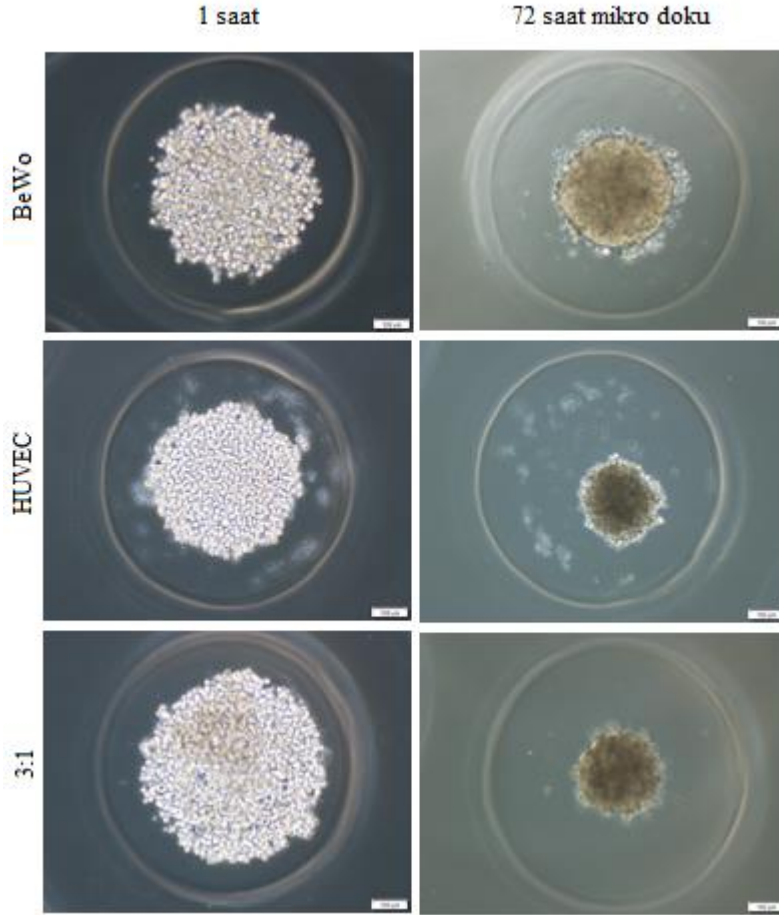
Şekil 4.16. 3B BeWo ve HUVEC mono kültürlerde 96 ve 120 saat CellTracker boyama floresan görüntüleri (Mikro doku görüntüleri 200 µM, agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 µM ölçektedir).



Şekil 4.17. 3B 2:1, 3:1 ve 4:1 ortak kültürlerde 24, 48 ve 72 saat CellTracker boyama floresan görüntüleri. Yeşil renk BeWo hücreler, kırmızı renk HUVEC hücreleri (Agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 μ M ölçektedir).

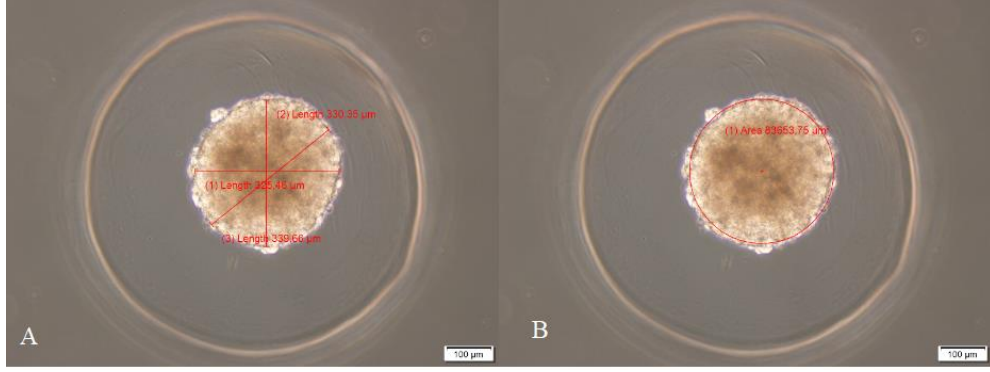


Şekil 4.18. 3B 2:1, 3:1 ve 4:1 ortak kültürlerde 96 ve 120 saat CellTracker boyama floresan görüntüleri (Mikro doku görüntüleri 200 μ M, agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 μ M ölçektir).

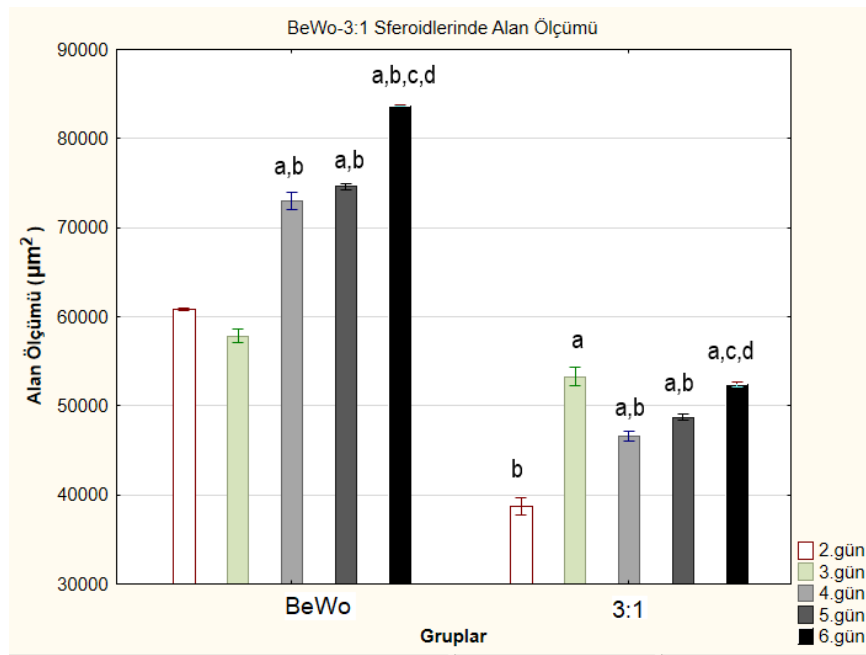


Şekil 4.19. BeWo, HUVEC ve 3:1 oran grubunda agarlara hücre ekiminden 1 saat sonra ve 72 saat sonra agregatlar oluşup Vortiooksetin uygulaması yapılmaya başlanan inkübasyon süresi görüntüleri (Agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 µM ölçektedir).

BeWo mono kültürü ve 3:1 oran grubunun hücre ekiminden sonra 6 gün boyunca çap ve alan ölçümleri yapılmıştır. Çap ölçümleri CellSense programı kullanılarak sferoidlerin 3 farklı noktasından değerler alınarak belirlenmiştir (Şekil 4.20.). BeWo grubunun alanı ve çap uzunluğu 4. günden itibaren inkübasyon süresine bağlı olarak anlamlı olarak artmaktadır. 3:1 oran grubu ise üçüncü günde alan ve çap uzunluğu artış göstermiştir. Dördüncü günde hücrelerarası bağlantıların artması ile çap ve alan büyüklüğünde üçüncü güne göre azalma görülmektedir. İnkübasyonun devamında hücrelerin proliferasyonu ile çap ve alan miktarında gün bazında anlamlı artış görülmektedir (Şekil 4.21, Şekil 4.22.). 3:1 grubunun BeWo sferoidlerine göre çap ve alan ölçümleri bakımından birim olarak daha az değerde oluşu HUVEC hücreleriyle BeWo hücrelerinin sıkı etkileşime girerek kompleks mikro doku oluşturduğu ve fiziksel uyumda başarılı olduklarını göstermektedir.



Şekil 4.20. BeWo mono kültürlerinin hücre ekiminden 72 saat sonra sferoid çap ve alan ölçümü.

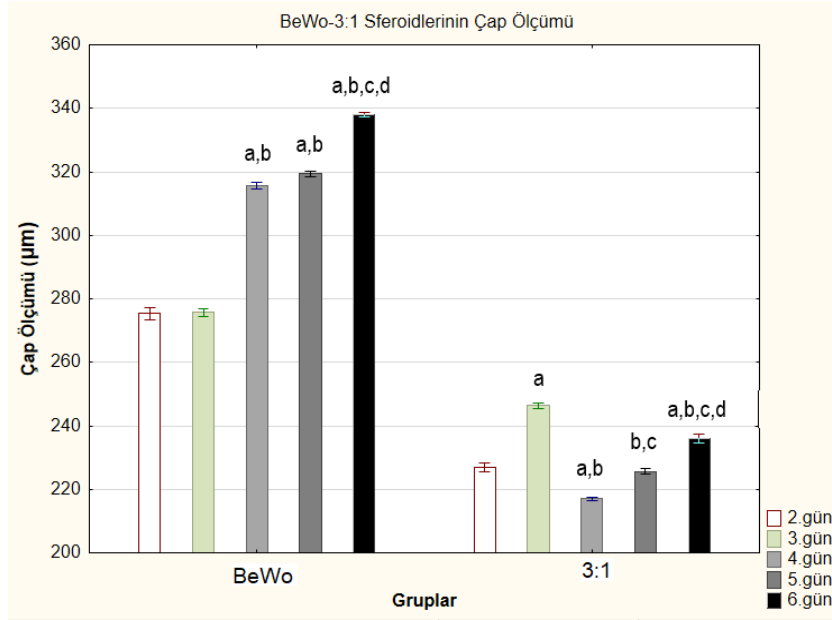


Şekil 4.21. 3B BeWo ve 3:1 oran grubunun 6 gün boyunca sferoid alan ölçümü.

^a 2 gün inkübasyon süresine göre istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b 3 gün inkübasyon süresine göre istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c 4 gün inkübasyon süresine göre istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^d 5 gün inkübasyon süresine göre istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Yapılan bir çalışmada, iki ayrı altklon hücre hattı SH-SY5Y (kemik iliği orjinli nöroblastom hücresi) ve SK-N-AS (kemik iliği orjinli nöroblastom hücresi) kullanılarak 3B Petri Dish® yöntemi ile mikro doku oluşturma kapasiteleri karşılaştırılmıştır. SH-SY5Y sferoidlerinin $5 \times 10^5 / 75 \mu\text{L}$ ortalama hücre sayısında, çapları 1. günden 2. güne kadar gözle görülür şekilde azalmıştır ancak 5. güne kadar çap boyutlarında belirgin bir azalma gözlenmemiştir. 1. ve 2. günlerde çaplardaki azalmanın sebebinin hücre-hücre

arası etkileşimlerin artması ve hücrelerdeki sıkı bağlantı bölgelerinin artması olarak açıklanmıştır [111]. Tez kapsamında yapılan çap ölçümleri sonuçlarına göre, 6. güne kadar artan çap boyutları ve sferoid alanı hücrelerin canlılıklarını koruyarak proliferasyona devam ettiklerini göstermektedir.



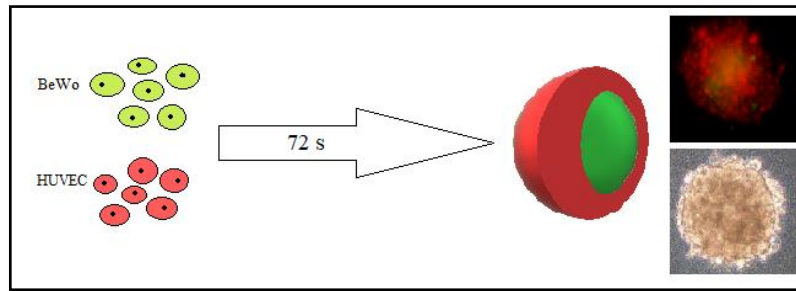
Şekil 4.22. 3B BeWo ve 3:1 oran grubunun 6 gün boyunca sferoid çap ölçümü.

^a 2 gün inkübasyon süresine göre istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b 3 gün inkübasyon süresine göre istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c 4 gün inkübasyon süresine göre istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^d 5 gün inkübasyon süresine göre istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Yapılan bir çalışmada BeWo ve İnsan Villus Mezenşimal Fibroblast (HVMF) hücrelerinin iskele kullanılmadan biraraya geldiği ve sferoid yapı oluşturduğu gösterilmiştir [110]. HVMF hücreleri kor yapısının dışında, BeWo hücreleri ise içeride konumlanmıştır. Tez çalışması kapsamında BeWo hücrelerinin kor bölgesinde HUVEC hücrelerinin periferde konumlandığı görülmektedir. Oluşturulan modelde hücrelerin ekimi aynı anda gerçekleştirilmektedir. Hücre lokalizasyonlarının değiştirilmesi için hücre ekim süreleri farklı zamanlarda gerçekleştirilebilir. Fakat hücrelerin ekimden sonra salgıladıkları sitokinler ve çeşitli büyüme faktörleri sonradan ekilen hücrenin karakterizasyonunu değiştirmede etkili olabileceği düşünülerek tez çalışması kapsamında aynı anda ekim gerçekleştirilmiştir. DAH hipotezine göre HUVEC hücrelerinin BeWo hücrelerine göre hücrelerarası adhezyon ve kohezyon kuvvetlerinin

daha güçlü olduğu söylenebilir. Oluşturulan 3B hücre sistemi plasenta dokusunun bariyer özellikleri üzerinde çalışmalar yapılması için kullanılabilir.

Yapılan bir çalışmada HUVEC hücreleri ve dental pulpa kök hücrelerinin oluşturduğu sferoidlerin bağışıklık sistemi baskılanmış farelerin diş kökü ve deri altına implante edilmesinden 4 hafta sonra incelenmiş ve histolojik açıdan HUVEC'lerin vasküler oluşum gösterdiği, damar sistemini başarılı bir şekilde gerçekleştirdiği ve transplantasyon çalışmaları için kullanımının uygun olacağı gösterilmiştir [112].



Şekil 4.23. 3B sferoidlerde Celltracker boyama görüntüsü.

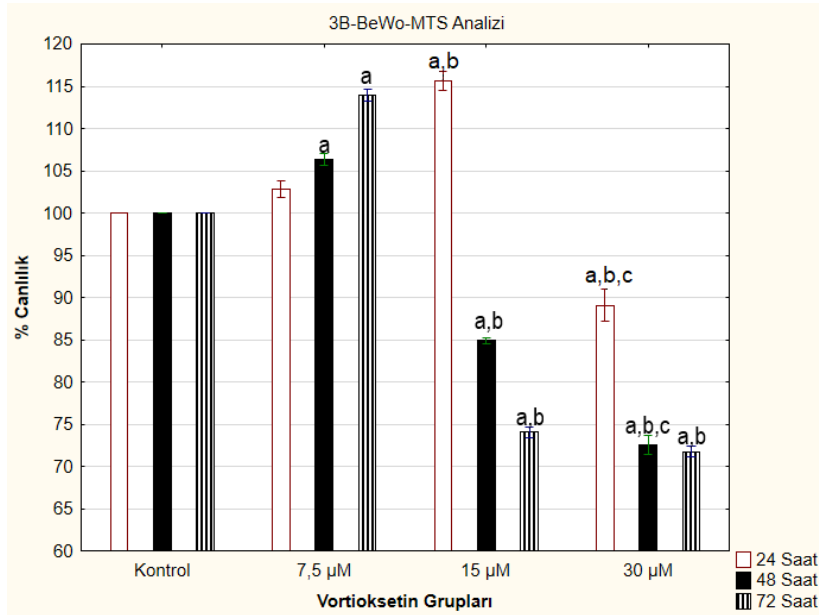
4.6.3. Mono ve Ortak Kültürlerde Vortiooksetin Uygulamasında Canlılık Analizleri

Üç boyutlu hücre kültürlerinde iki boyutlu kültürlerle göre heterojen doz alımı görülmektedir. İki boyutlu kültürlerde hücrelerin homojen şekilde maruz kaldığı doz hücrelerde toksisiteyi doğru oranda arttırmaktadır. Sferoidlere madde uygulanmasında ise düşük doz konsantrasyonlarında canlılık kontrol gruplarından daha yüksek çıkmaktadır. Düşük doz sferoidin periferindeki hücrelere toksik etki yaratıp canlılıklarını düşürmektedir. Bu sayede kor bölgesindeki hücrelerin oksijen ve besin alımı artmaktadır. Yüksek dozda uygulamalarında ise ancak uygulanan madde sferoidin kor bölgesine erişerek toksisite yaratmaktadır. Bu durumda mikro dokulara doz uygulaması yapılırken periferdeki hücrelerin doku için bir bariyer olarak görev yaptığı ve *in vivo* doku bütünlüğünü yansıtarak toksisite açısından iki boyutlu kültürlerle kıyasla daha yakın cevaplar vermektedir. Bu sferoidlere uygulanan canlılık analizleri sferoidin çapı ve alanı ile doğrudan ilişkilidir. Sferoidlerin çapı iskemi yaşanmaması, besin ve atıkların difüze edilmesi, nekroz yaşanmaması için 200-400 µm uzunluğu geçmemelidir [113]. *In vivo* sistemlerde vasküler organlar ise ihtiyaç duydukları oksijen miktarının

fazlalığından dolayı *in vitro* sistemlerde modellenecekleri zaman daha düşük çap sferoid oluşturulmalıdır [114].

BeWo, HUVEC tekli ve 3:1 oranında ortak kültürdeki hücelere Vortioksetin uygulanmasının hücre canlılığı üzerine etkileri MTS hücre canlılık testi ile incelenmiştir. Vortioksetin uygulanan mono kültür ve ortak kültürdeki hücrelerin % canlılık grafikleri ayrı olarak verilmiştir. Kontrol ve DMSO grupları arasında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak incelenmiştir. Anlamlı bir farklılık bulunmamıştır

BeWo hücresine ait canlılık grafiği Şekil 4.24'te verilmiştir. 7,5 µM Vortioksetin uygulanan BeWo hücresinin canlılık yüzdesi inkübasyon süresine bağlı olarak kontrol grubuna göre 48 ve 72 saatte istatistiksel olarak artış göstermiştir. 15 µM Vortioksetin doz grubunun BeWo hücresindeki canlılık yüzdesi kontrol grubuna ve 7,5 µM doz grubuna göre 24 saat inkübasyonda anlamlı bir artış gösterirken, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda istatistiksel olarak azalmıştır. 30 µM Vortioksetin doz grubunun BeWo hücresindeki canlılık yüzdesi ise kontrol grubuna, 7,5 µM ve 15 µM doz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır.

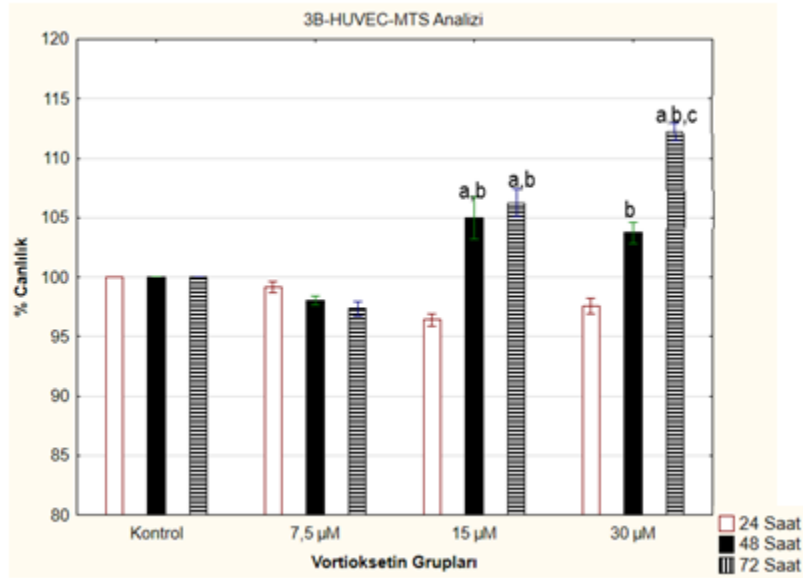


Şekil 4.24. 3B BeWo sferoidlerinde 24, 48 ve 72 saat Vortioksetin uygulaması sonrası hücre canlılık yüzde değişim grafiği.

^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b 7,5 µM Vortioksetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c 15 µM Vortioksetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

HUVEC hücresine ait canlılık grafiği Şekil 4.25'te verilmiştir. 7,5 µM Vortioksetin uygulanan HUVEC hücresinin canlılık yüzdesi inkübasyon süresine bağlı olarak kontrol grubuna göre azalma göstermiştir fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir. 15 µM Vortioksetin doz grubunun HUVEC hücresindeki canlılık yüzdesi kontrol grubuna ve 7,5 µM doz grubuna göre 24 saatlik inkübasyonda azalırken 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda istatistiksel olarak artış göstermiştir. 30 µM Vortioksetin doz grubunun HUVEC hücresindeki canlılık yüzdesi ise 72 saatte 15 µM doz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır.

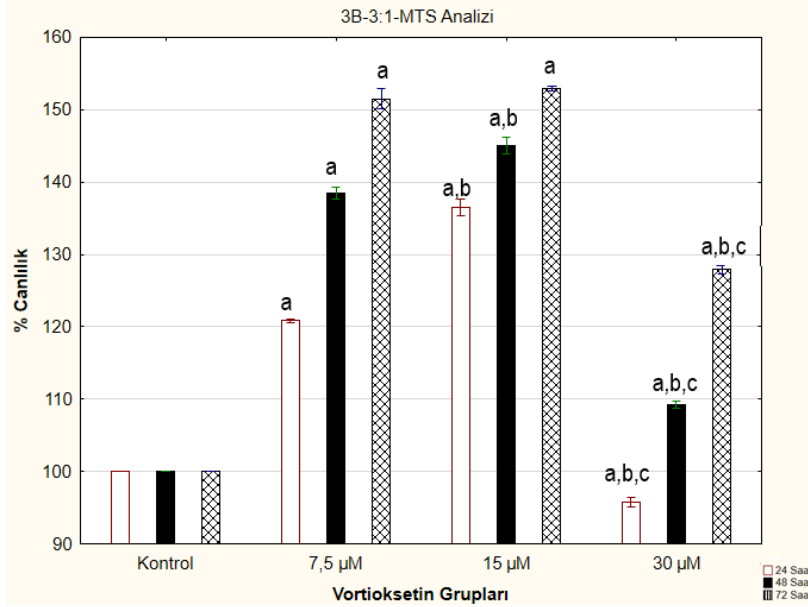
3:1 oran grubunun canlılık grafiği Şekil 4.26'te verilmiştir. 7,5 µM Vortioksetin uygulanan 3:1 oran grubunun canlılık yüzdesi inkübasyon süresine bağlı olarak kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış göstermiştir. 15 µM Vortioksetin doz grubunda 3:1 oran grubunun canlılık yüzdesi kontrol grubuna ve 7,5 µM doz grubuna göre 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda istatistiksel olarak artış göstermiştir. 30 µM Vortioksetin doz grubunda 3:1 oran grubunun canlılık yüzdesi inkübasyon süresi arttıkça yükselse de, kontrol grubuna göre 24 saatlik inkübasyonda canlılık düşmüştür.



Şekil 4.25. 3B HUVEC sferoidlerinde 24, 48 ve 72 saat Vortioksetin uygulaması sonrası hücre canlılık yüzde değişim grafiği.

^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$) ^b 7,5 µM Vortioksetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$) ^c 15 µM Vortioksetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

30 μM Vortioksetin doz grubunda 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda 7,5 μM ve 15 μM doz grubuna göre ise istatistiksel olarak azalmıştır. HUVEC ve 3:1 gruplarında Vortioksetin uygulaması inkübasyon saatlerine göre canlılığı düşürmemiştir.



Şekil 4.26. 3B 3:1 oran grubunda 24, 48 ve 72 saat Vortioksetin uygulaması sonrası hücre canlılık yüzde değişim grafiği.

^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b 7,5 μM Vortioksetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c 15 μM Vortioksetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Aşağıda mono ve ortak kültürlerde Vortioksetin uygulamasından sonra sferoidlerin inverted mikroskop görüntüleri verilmiştir.

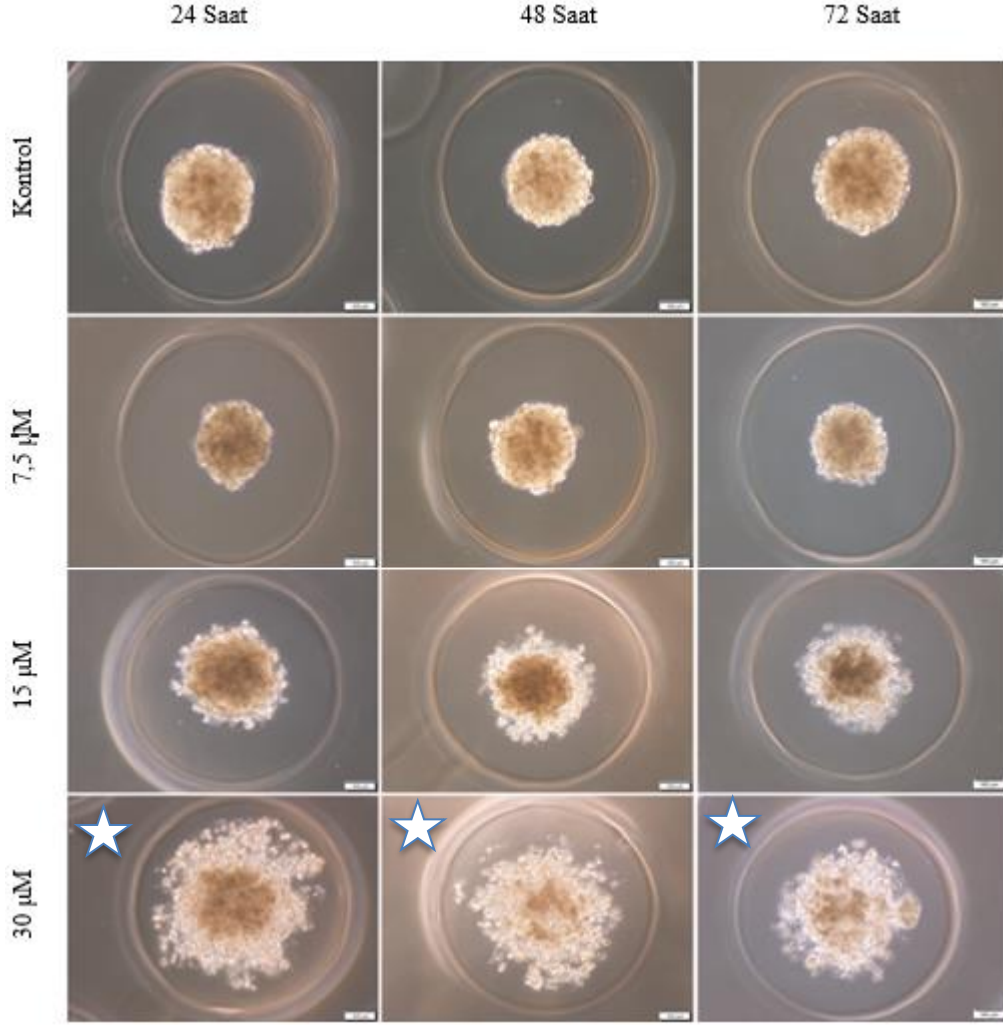
Üç grup için de hücre ekiminden 3 gün sonra sferoid oluşumu tamamlanmıştır. Sferoid oluşumundan itibaren 24, 48 ve 72 saat boyunca 7,5, 15 ve 30 μM Vortioksetin uygulaması yapılmıştır.

BeWo hücrelerinde 7,5 μM uygulamalarda sferoid yapısında herhangi bozulma görülmezken, 15 μM ve 30 μM Vortioksetin uygulamalarında her inkübasyonda bozulma görülmüştür (Şekil 4.27.).

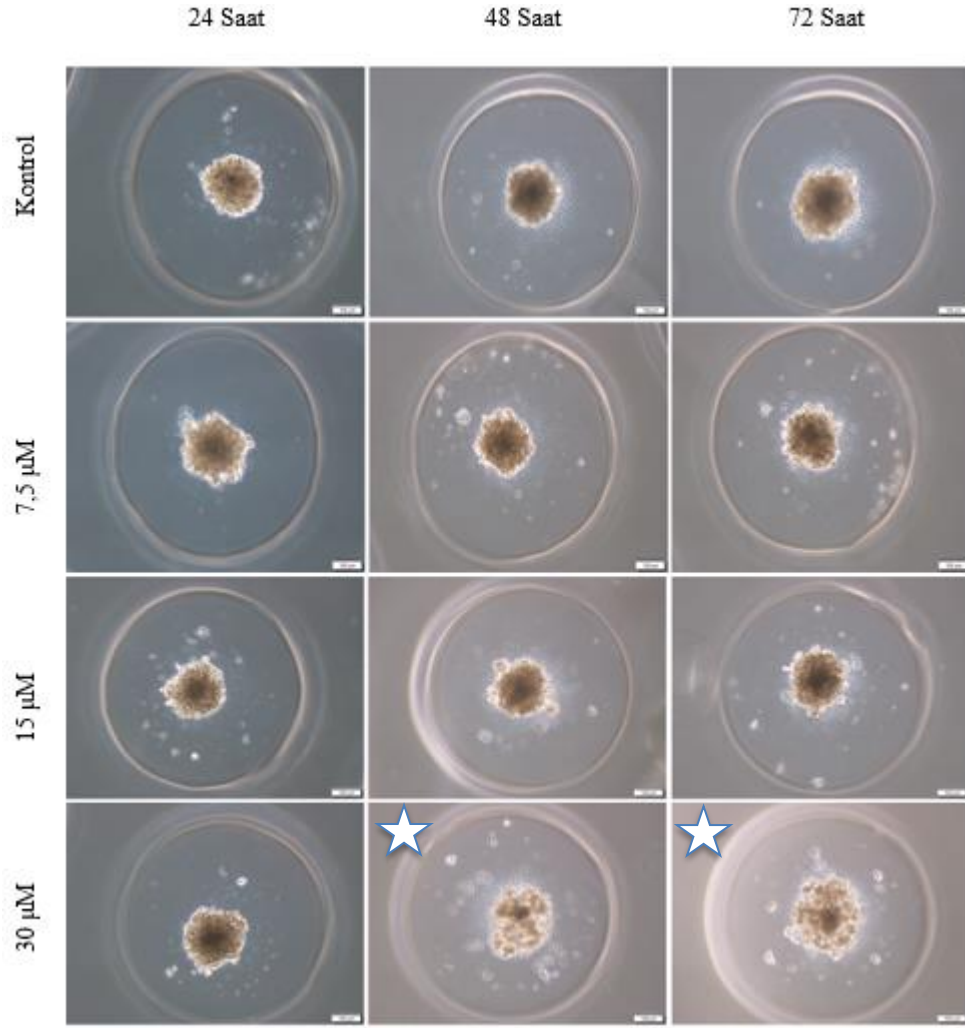
HUVEC hücrelerinde, yalnızca 30 μM Vortioksetin uygulamasının 48 saat inkübasyonundan itibaren sferoid yapısında bozulmaların başladığı görülmüştür (Şekil 4.28.).

3:1 oran grubunda ise 7,5 μM uygulamasının 72 saatinde periferdeki hücreler sferoid yapısından kopmaya başlamıştır. (Şekil 4.29.).

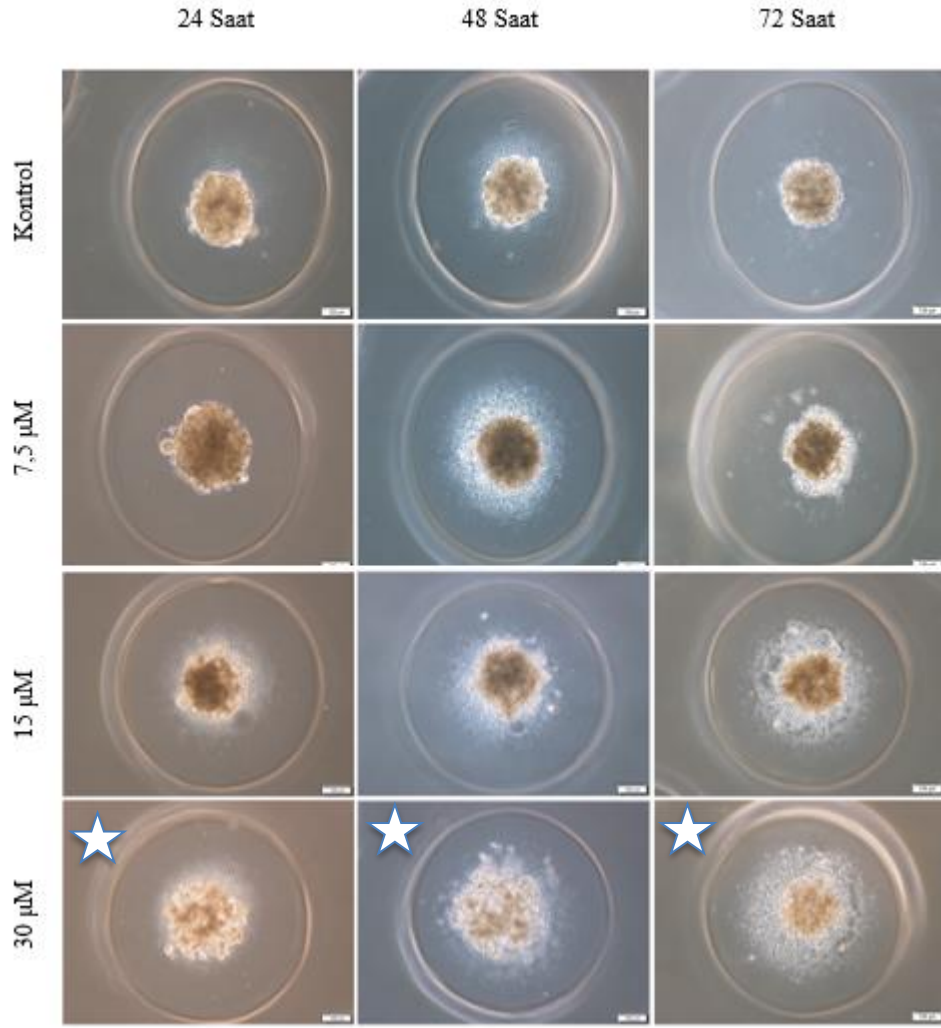
15 μM Vortioksetin uygulamasında ise hücrelerin 48 saat inkübasyonundan itibaren sferoid yapısının bozulduğu gözlemlenirken, 30 μM uygulamasında 24 saatlik inkübasyonda mikro dokuların bütünlüğünün bozulduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.27. 3B BeWo sferoidlerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca 7,5 μM , 15 μM ve 30 μM Vortioksetin uygulamasının inverted mikroskop görüntüleri (Agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 μM ölçektedir). , doku bütünlüğü bozulmuş sferoid görüntüsü.



Şekil 4.28. 3B HUVEC sferoidlerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca 7,5 µM, 15 µM ve 30 µM Vortioxetin uygulamasının inverted mikroskop görüntüleri (Agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 µM ölçektedir). ☆ , doku bütünlüğü bozulmuş sferoid görüntüsü.



Şekil 4.29. 3B ortak kültür oran grubu sferoidlerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca 7,5 µM, 15 µM ve 30 µM Vortiooksetin uygulamasının inverted mikroskop görüntüleri (Agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 µM ölçektedir). ☆ , doku bütünlüğü bozulmuş sferoid görüntüsü.

4.6.4. Mono ve Ortak Kültürlerde Kalsein-PI-DAPI Görüntüleri

BeWo, HUVEC ve 3:1 hücre oranı ile oluşturulan mikro dokulara Vortiooksetin uygulanmasının hücre canlılığı ve mikro dokuların bütünlüğü üzerine etkileri Kalsein (yeşil, canlı hücre) ve Propidyum iyodit (kırmızı, ölü hücre) ile boyanmış ve floresan mikroskopta incelenmiştir.

BeWo hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat sonraki negatif kontrol mikro dokularındaki kalsein ile boyanan canlı hücre sayısının fazla, ölü hücresi sayısının az oranda olduğu görülmektedir (Şekil 4.30/31/32.). Pozitif kontrolde ise propidyum iyodit ile boyanan

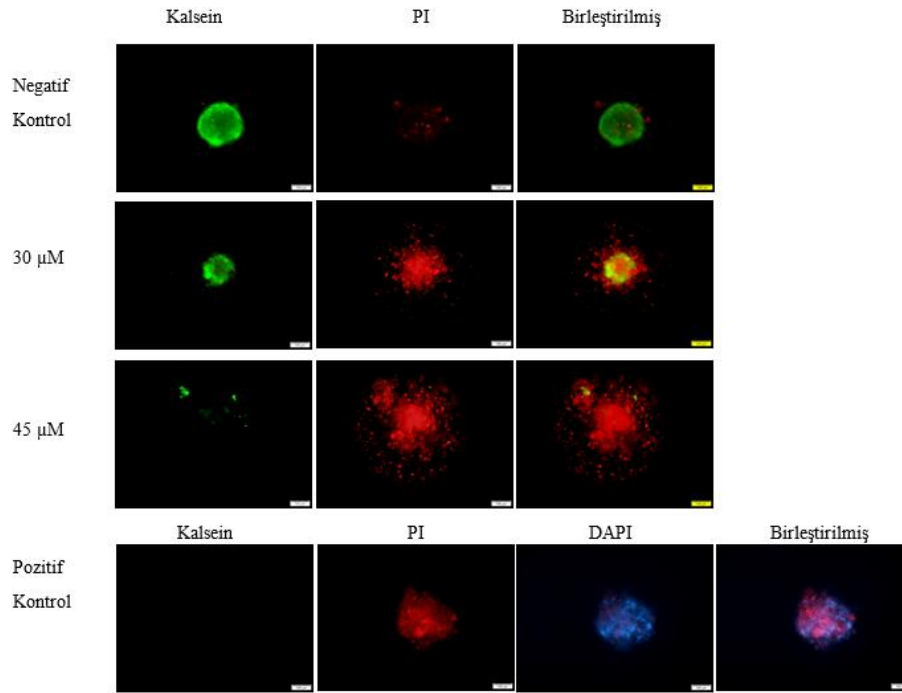
ölü hücre sayısının fazla oranda olduğu görülmüştür. Kontrol ve DMSO grupları arasında 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası hücre canlılığı açısından istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır ve görsellerde sadece kontrol grubuna yer verilmiştir. Kontrol gruplarında hücrelerarası bağlantıların artarak mikro doku bütünlüğünün korunduğu görülmektedir. 30 μ M Vortioksetin uygulanmasıyla 24 ve 48 saat sonraki mikro dokuların canlı hücre sayılarında azalma olmadığı ve sferoid yapısının korunduğu görülmektedir. 72 saat sonra ise hücrelerin birbirleri ile etkileşimlerinin azaldığı ve sferoid yapısının korunamadığı görülmüştür. BeWo hücresi mikro dokularına 45 μ M Vortioksetin uygulanmasıyla 24, 48 ve 72 saat sonraki hücrelerarası bağlantılarda azalma olduğu ve ölü hücre sayısının arttığı görülmüştür.

HUVEC hücresinin 24, 48 ve 72 saat sonraki negatif kontrol mikro dokularındaki kalsein ile boyanan canlı hücre sayısı fazla oranda görülmektedir (Şekil 4.33/34/35.). Pozitif kontrolde ise propidyum iyodit ile boyanan ölü hücre sayısının fazla oranda olduğu görülmüştür. HUVEC hücresi kontrol gruplarındaki mikro dokuların küçülmesi hücrelerarası bağlantıların arttığını ve mikro doku bütünlüğünün korunduğunu göstermiştir. 30 μ M Vortioksetin uygulanmasıyla 24, 48 ve 72 saat sonraki canlı hücre sayısının fazla, ölü hücre sayısının az olduğu görülmüştür. Hücrelerarası etkileşim ve mikro doku bütünlüğü korunmuştur. 45 μ M Vortioksetin uygulanmasıyla 24, 48 ve 72 saat sonraki HUVEC hücresi mikro dokularındaki hücrelerarası bağlantı azalmış ve sferoid yapısı bozulmuştur.

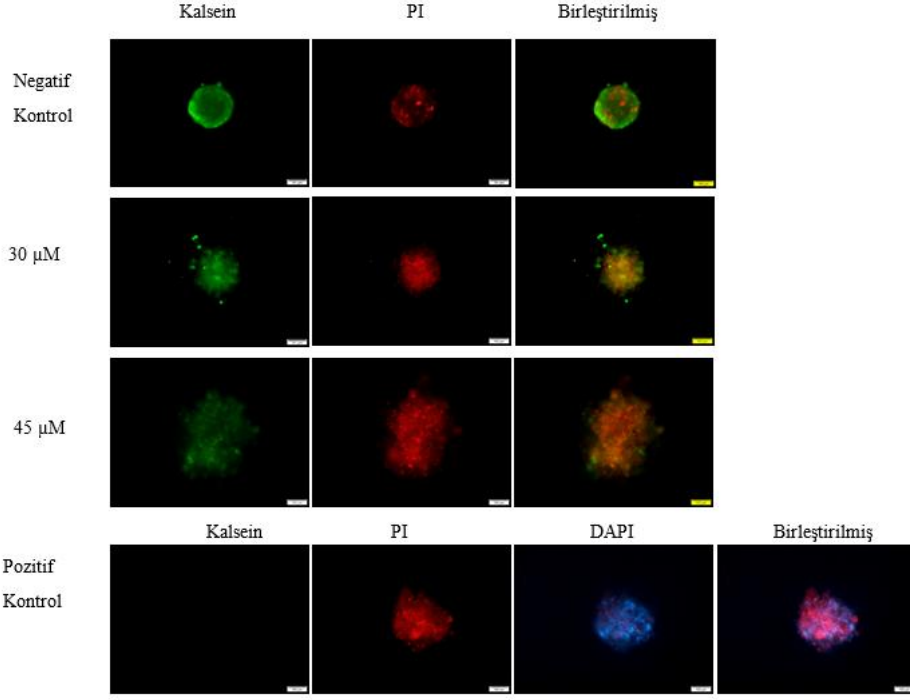
3:1 ortak kültür gruplarında 24, 48 ve 72 saat sonra negatif kontrol mikro dokularındaki kalsein ile boyanan canlı hücre sayısının fazla, pozitif kontrolde propidyum iyodit ile boyanan ölü hücre sayısının fazla oranda olduğu görülmüştür (Şekil 4.36/37/38.). Kontrol gruplarında hücreler birbirleri ile olan etkileşimlerini korumuştur ve sferoid yapısı bozulmamıştır. 3:1 oranı mikro dokularına 30 μ M Vortioksetin uygulanmasıyla 24 saat sonra canlı hücre sayısının fazla oranda olduğu ve mikro doku bütünlüğünün korunduğu görülmektedir. 30 μ M doz grubunun 48 ve 72 saat sonraki mikro doku bütünlüğünün korunamadığı görülmüştür. Aynı zamanda ölü hücre sayısında herhangi bir artış görülmemiştir. 45 μ M Vortioksetin uygulanmasıyla 24, 48 ve 72 saat sonraki hücrelerarası bağlantıların sağlanamadığı ve sferoid yapısının bozulduğu ve 30 μ M'lık uygulamalara göre canlılıkta düşüş olduğu görülmüştür.

Genel olarak, tüm gruplarda 45 μ M Vortioksetin uygulamasının 24 saat içerisinde hücrelerde canlılığı düşürdüğü, 48 ve 72 saatlerde canlı hücre sayılarında bir artış

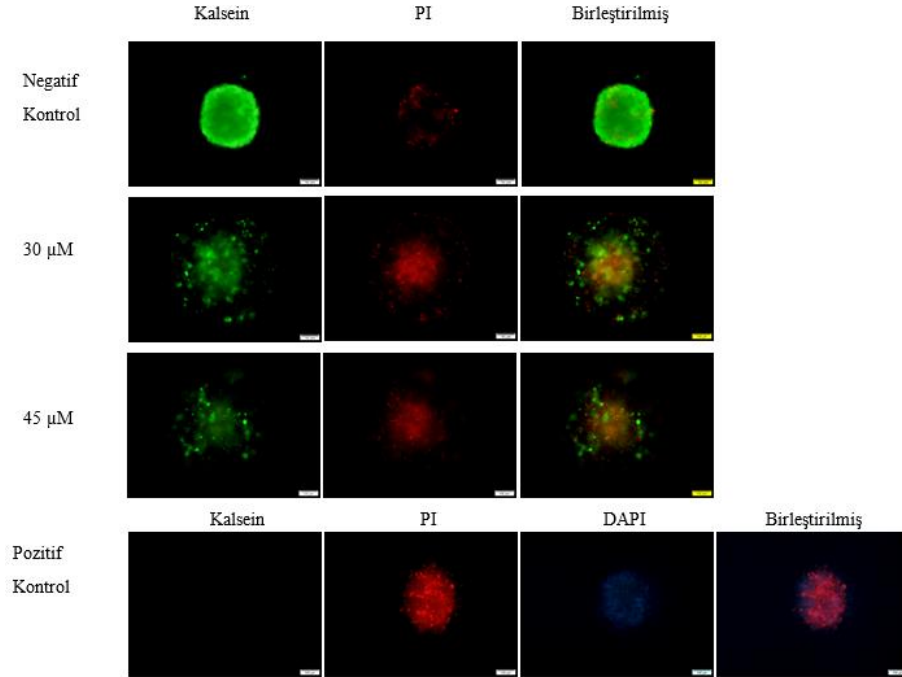
olduğu görülmektedir. Ayrıca sferoidlerin yapısı bozulsa bile canlılığın korunduğu kalsein boyasının miktarı ile hücrelerarası bağlantılar ve dolayısıyla mikro doku bütünlüğü bozulması halinde hücrelerin üç boyutlu ortamda canlılıklarını koruması toksisite çalışmalarında doz belirlemede büyük avantaj sağlamaktadır. 3:1 ortak kültür grubunda 72 saatlik inkübasyondan kırmızı renkteki ölü hücre sayının miktarı mono kültürlerle karşılaştırıldığında daha az olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde ortak kültür gruplarının Vortioksetine karşı daha dirençli olduğu söylenebilir.



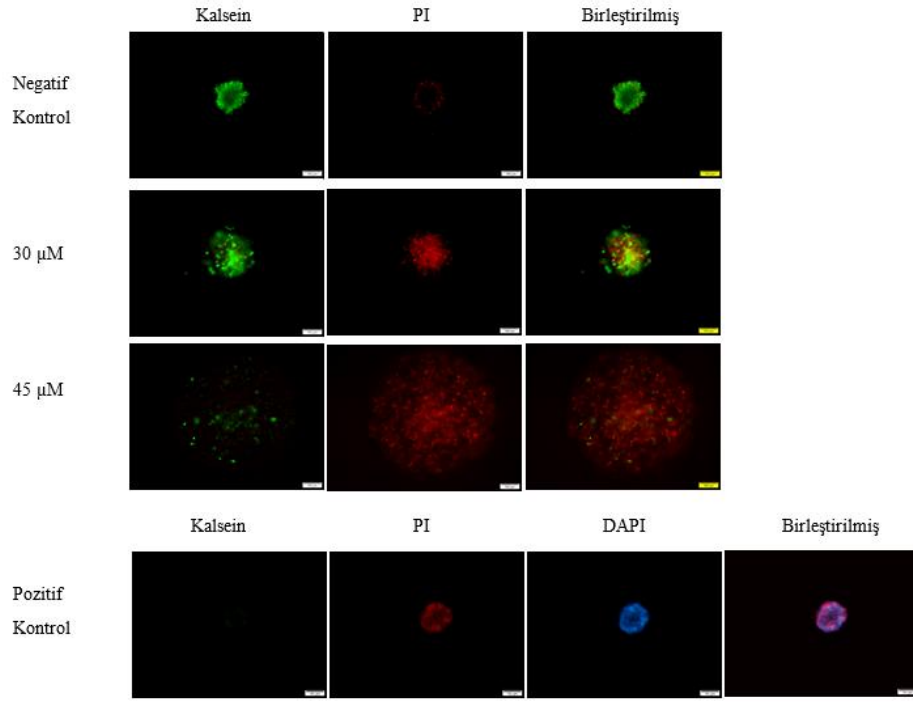
Şekil 4.30. BeWo hücreleri 24 saat 30 μM ve 45 μM Vortioksetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri (Agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 μM ölçektedir).



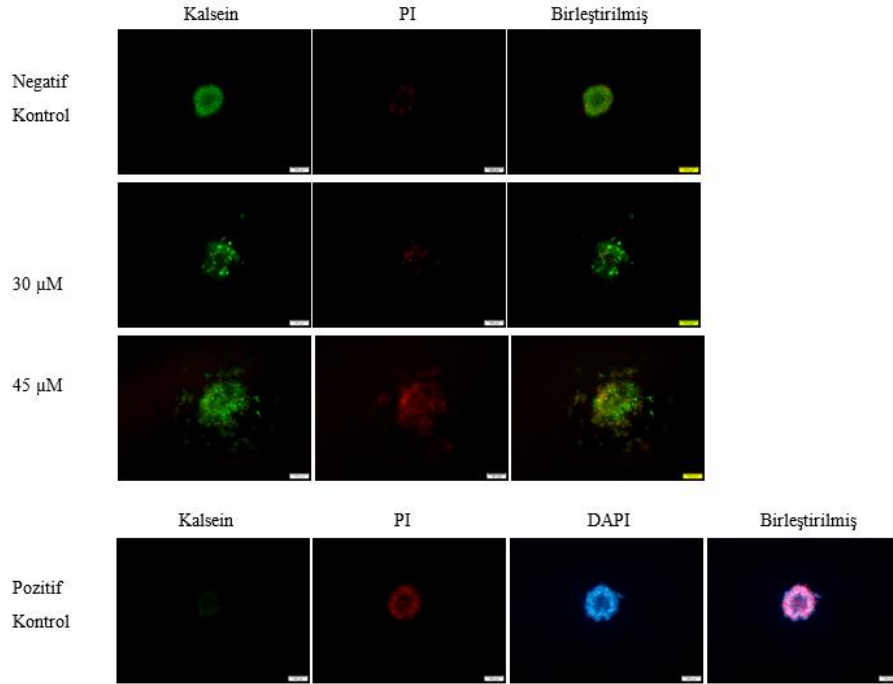
Şekil 4.31. BeWo hücreleri 48 saat 30 µM ve 45 µM Vortioxetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri (Agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 µM ölçektedir).



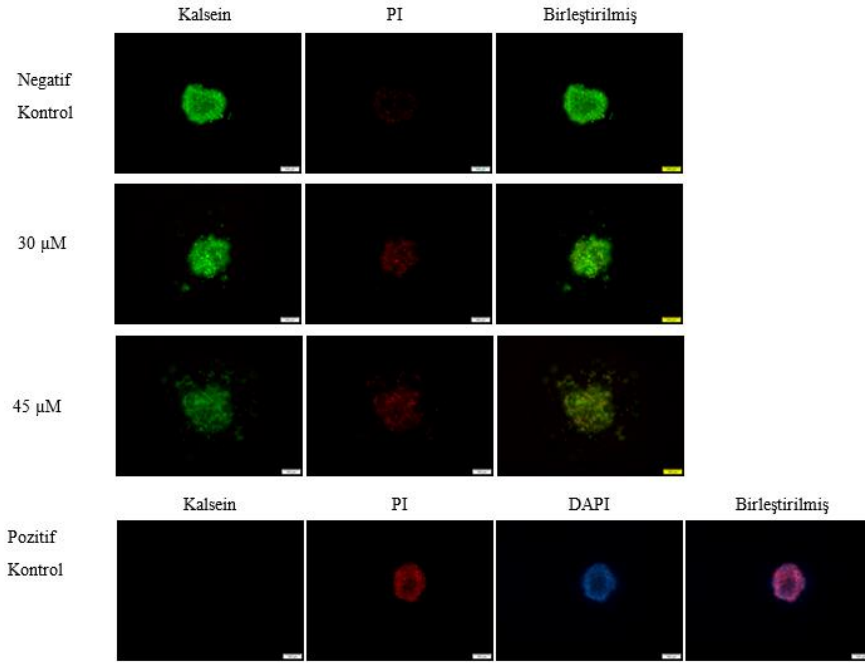
Şekil 4.32. BeWo hücreleri 72 saat 30 µM ve 45 µM Vortioxetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri (Agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 µM ölçektedir).



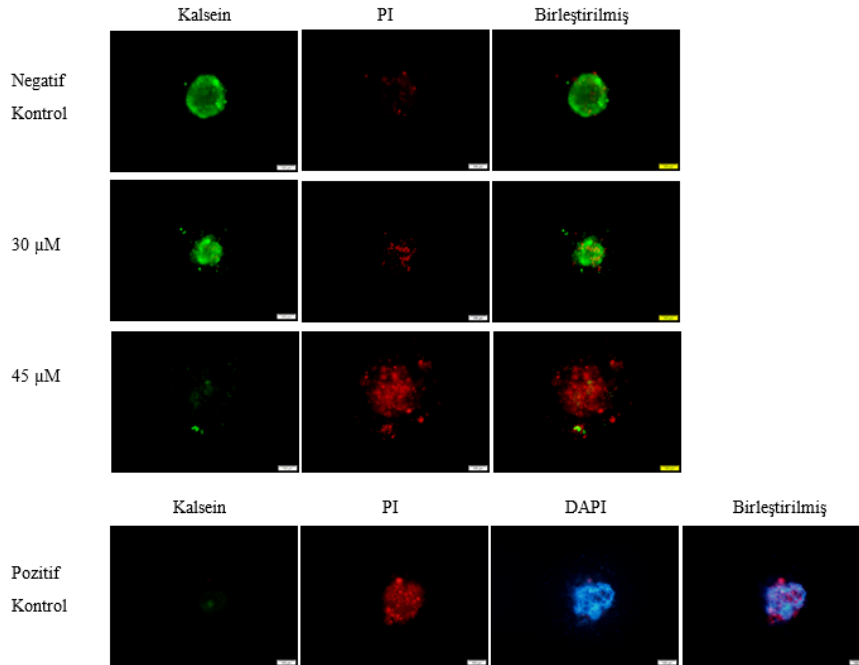
Şekil 4.33. HUVEC hücreleri 24 saat 30 μ M ve 45 μ M Vortioxetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri (Agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 μ M ölçektir).



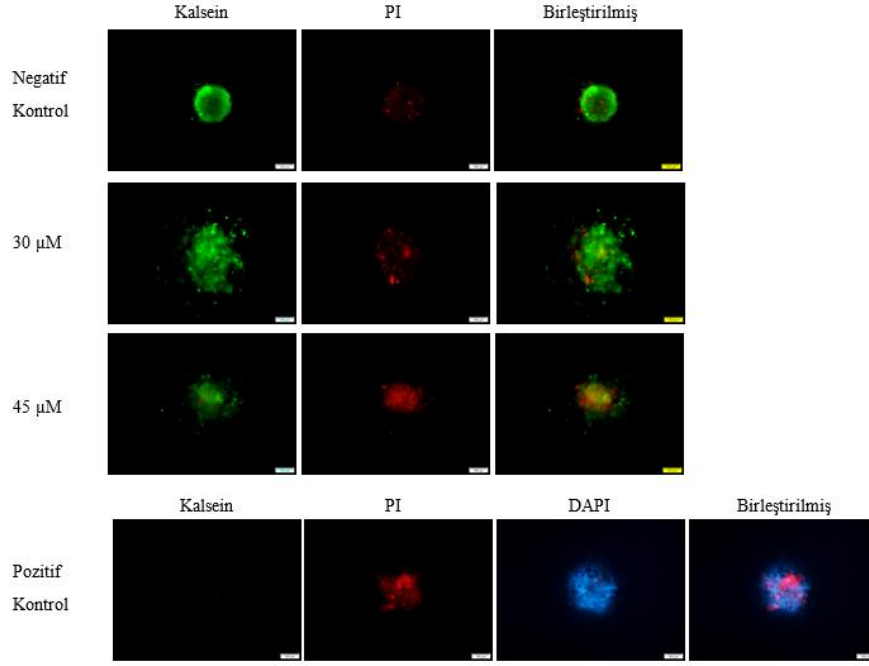
Şekil 4.34. HUVEC hücreleri 48 saat 30 μ M ve 45 μ M Vortioxetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri (Agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 μ M ölçektir).



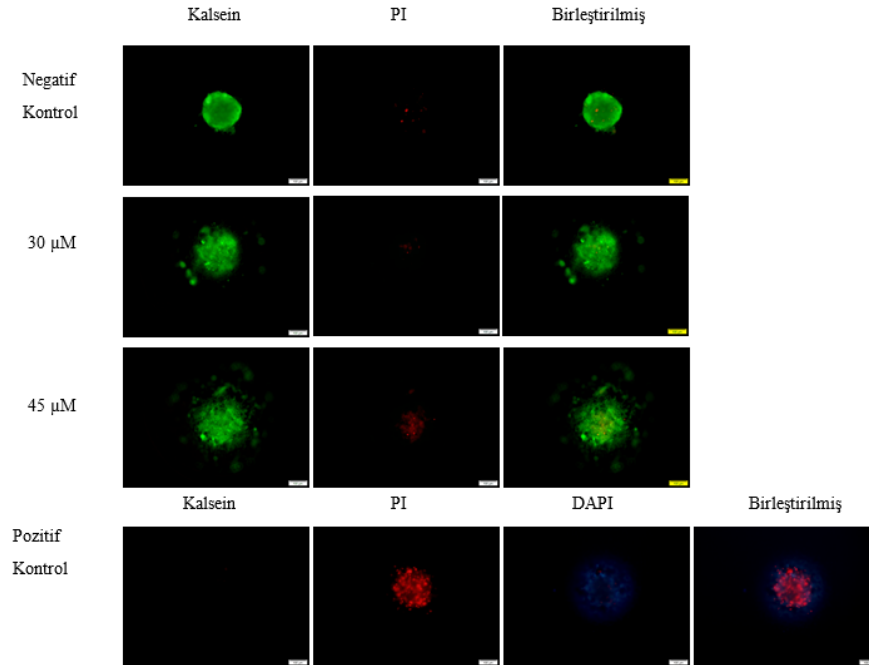
Şekil 4.35. HUVEC hücreleri 72 saat 30 µM ve 45 µM Vortioxetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri (Agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 µM ölçektir).



Şekil 4.36. 3:1 ortak kültür oran grubu 24 saat 30 µM ve 45 µM Vortioxetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri (Agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 µM ölçektir).



Şekil 4.37. 3:1 ortak kültür oran grubu 48 saat 30 μ M ve 45 μ M Vortioxetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri (Agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 μ M ölçektedir).



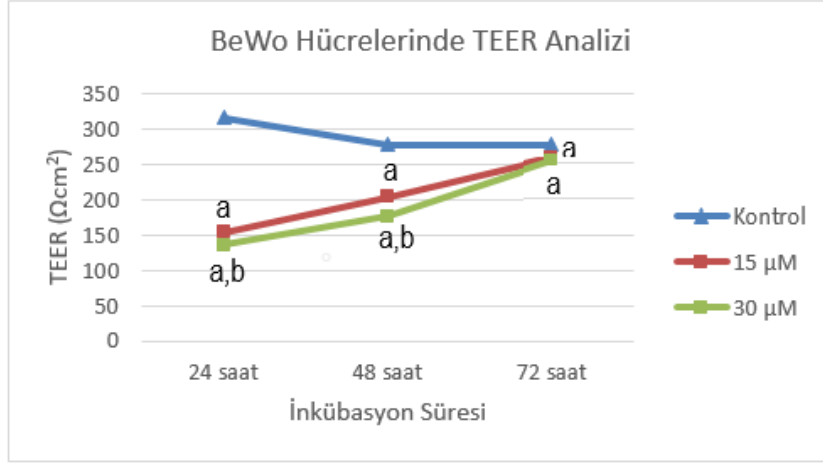
Şekil 3.38. 3:1 ortak kültür oran grubu 72 saat 30 μ M ve 45 μ M Vortioxetin uygulamasının Kalsein-PI-DAPI floresan görüntüleri (Agar içerisindeki sferoid görüntüleri 100 μ M ölçektedir).

İnsan glioblastoma hücre hattı kullanılarak kanser modellenmesi yapılan bir çalışmada, kalsein AM-PI boyaması yapılarak sferoidlerde canlılık ölçümü belirlenmiştir. Hücre zar bütünlüğü bozulup nekroz görülen hücrelerin kırmızı ve canlı hücrelerin yeşil renkte görüldüğü belirtilmiştir. Ayrıca sferoid çapının mikro doku için fazlalığında kor böylesindeki iskemiden kaynaklanan nekroz ve ölü hücrelerin görüntülenmesinde PI boyamanın başarılı olduğu gösterilmiştir [86].

4.7. Bariyer Bütünlüğünün Ölçümü (Transepiteliyel Elektriksel Direnç-TEER) ve Na-F Akış Analiz Sonuçları

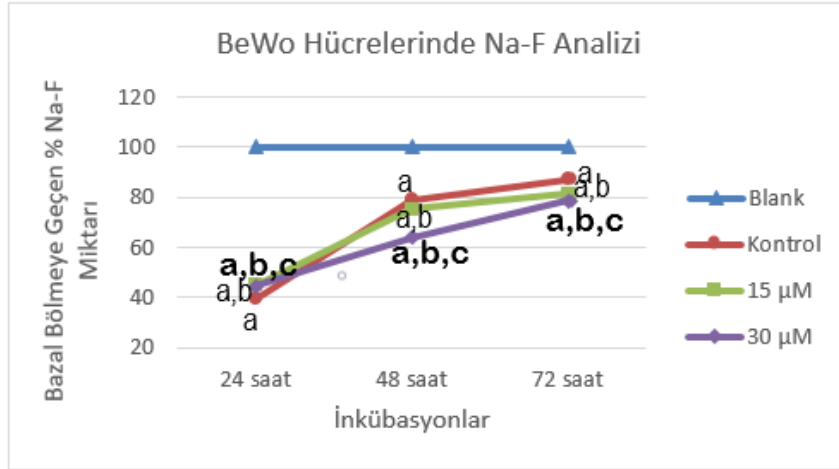
BeWo hücrelerin TEER ve Na-F analizleri Şekil 4.39 ve Şekil 4.40'da verilmiştir. TEER analizinde kontrol grupları 24 ve 48 saatlik Vortioxetin gruplarına göre anlamlı derecede yüksek görülmüştür. 15 µM Vortioxetin uygulaması da inkübasyon saatlerine bağlı olarak 30 µM grubundan yüksek görülmüştür. 24 saatten sonra inkübasyon süresinin artması BeWo hücrelerinde TEER direncini arttırmıştır. Na-F analizlerinde ise inkübasyon ve doza bağlı olarak bazal bölmeye geçen Na-F miktarında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur. BeWo hücrelerinde doz uygulamasıyla hücrelerarası direncin ilk 24 saatlik inkübasyonda bozulması apikal bölmeden bazal bölmeye geçen Na-F miktarını anlamlı şekilde arttırmıştır. 48 ve 72 saatte ölçülen TEER ve Na-F değerlerindeki artış BeWo hücrelerinde hücrelerarası bağlantıların bozulmasıyla Na-F geçiş miktarında artışı desteklemektedir.

Bewo ve insan primer vasküler endotel hücreleri (HPVEC) kullanılarak yapılan ortak kültürlerin TEER ölçümlerinde direncin artması trofoblast-endotel doku bütünlüğünü yansıttığı belirtilmiştir. Aynı zamanda ortak kültürlerin insertler üzerinde E-kaderin IF görüntüleri incelendiğinde E-kaderin ifadesinin varlığı ile hücrelerarası bağlantıları oluştuğu ve tek tabakalı olarak bir bariyer oluşturdukları görülmüştür. TEER değerleri ve floresan geçiş analizleri doğrultusunda BeWo ve endotel hücrelerinin doku-doku bütünlüğü oluşturduğu gösterilmiştir [106]. HUVEC hücreleri de endotel hücreleri olarak BeWo hücreleriyle birlikte kültüre edilmiştir ve Şekil 4.43'te görüldüğü üzere mono kültürlerle kıyasla daha yüksek TEER direnci göstermiştir.



Şekil 4.39. BeWo hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca 15 μM ve 30 μM Vortioxetin uygulamasının TEER analizi.

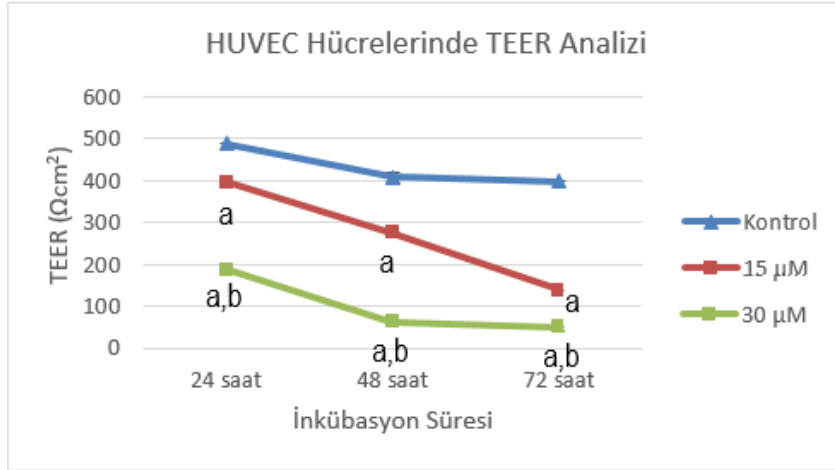
^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b 15 μM Vortioxetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).



Şekil 4.40. BeWo hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca 15 μM ve 30 μM Vortioxetin uygulamasının Na-F analizi.

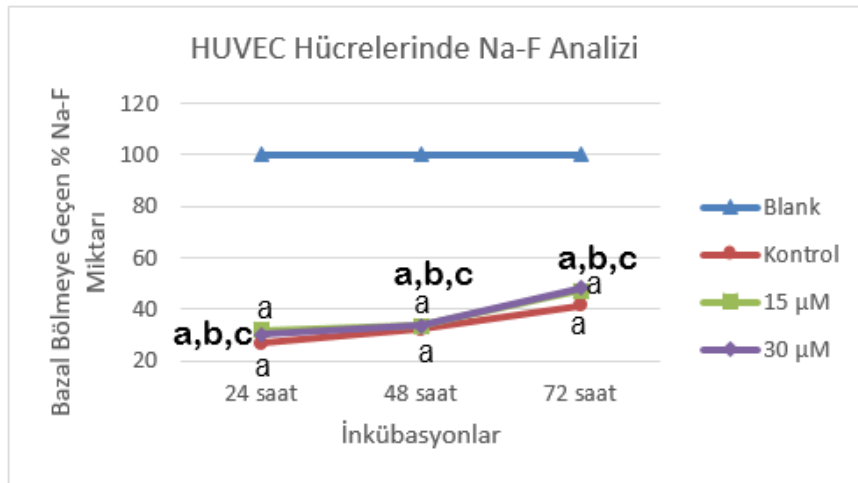
^a Blank grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c 15 μM Vortioxetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

HUVEC hücrelerinde TEER ve Na-F (Şekil 4.41 ve Şekil 4.42.) analizleri doz ve inkübasyon saatlerine göre anlamlı derece farklılık göstermiştir. 24, 48 ve 72 saatlik doz uygulamalarında TEER direnci azalırken, 30 µM grubunun Na-F değerlerinde 15 µM grubuna göre istatistiksel olarak artış görülmüştür.



Şekil 4.41. HUVEC hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca 15 µM ve 30 µM Vortiooksetin uygulamasının TEER analizi.

^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b 15 µM Vortiooksetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

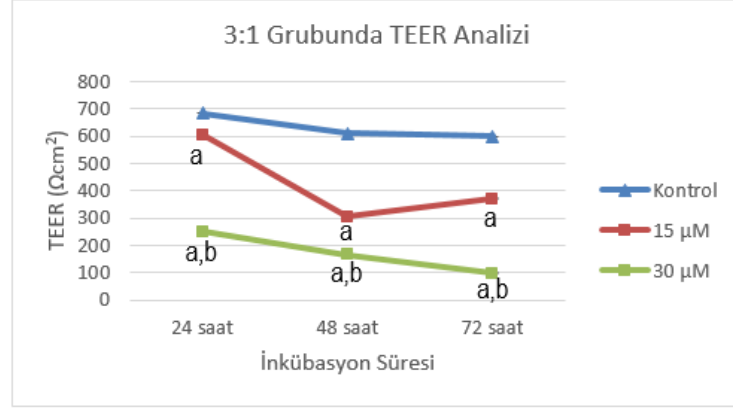


Şekil 4.42. HUVEC hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca 15 µM ve 30 µM Vortiooksetin uygulamasının Na-F analizi.

^a Blank grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c 15 µM Vortiooksetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

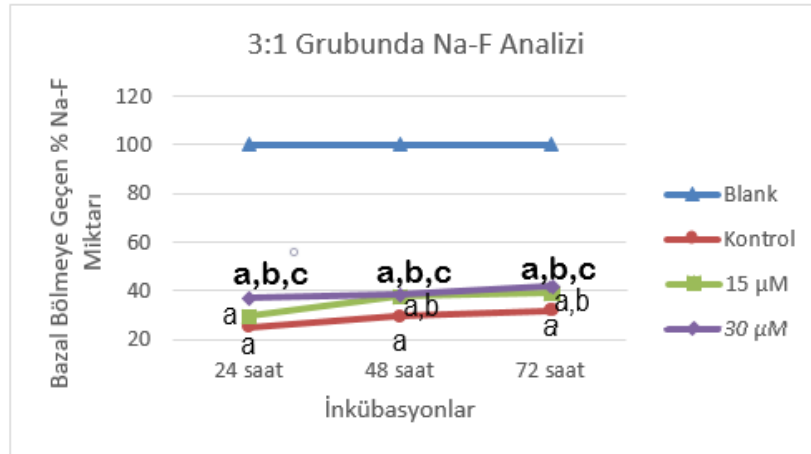
3:1 grubunun TEER ve Na-F analizi (Şekil 4.43 ve Şekil 4.44) tüm inkübasyon ve doz gruplarında anlamlı olarak değişiklik göstermiştir. TEER değerlerinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda dozlar arasında anlamlı düşüş görülürken Na-F analizinde benzer şekilde bazal bölmeye geçen Na-F miktarında artış görülmektedir.

Sonuç olarak, hücrelerarası bağlatıların ve toplam hücre direncinin ifade edildiği TEER analizlerini destekleyici olarak Na-F analizi kullanılmıştır. BeWo ve HUVEC hücrelerinin mono kültürleri ve ortak kültür grubundaki TEER ve Na-F analizleri hücrelerin bariyer olma özelliğini yansıtmaktadır.



Şekil 4.43. 3:1 oran ortak kültür grubunda 24, 48 ve 72 saat boyunca 15 µM ve 30 µM Vortioxetin uygulamasının TEER analizi.

^a Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b 15 µM Vortioxetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).



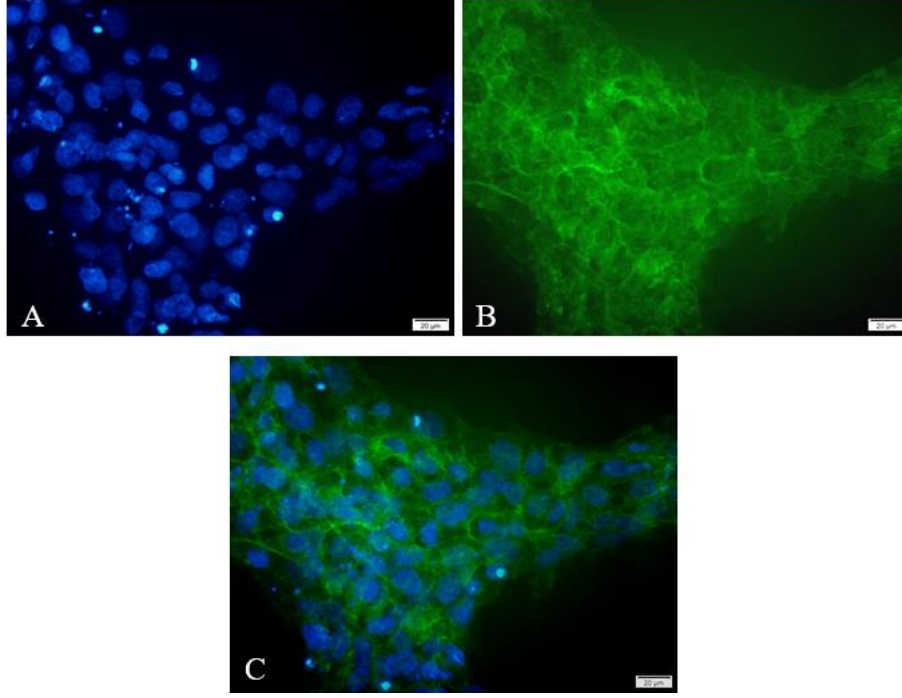
Şekil 4.44. 3:1 oran ortak kültür grubunda 24, 48 ve 72 saat boyunca 15 µM ve 30 µM Vortioksetin uygulamasının Na-F analizi.

^a Blank grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^b Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). ^c 15 µM Vortioksetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

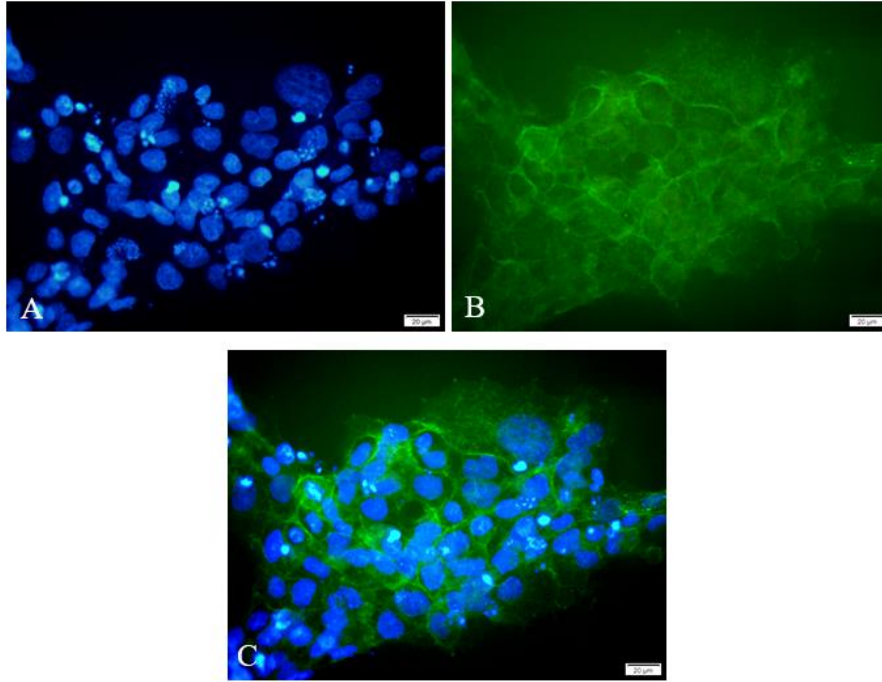
4.8. E-kaderin İmmü Floresan Görüntüleri

BeWo hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca Vortioksetin uygulanmasından sonra hücrelerin birbirleri ile bağlantı kurmasına yardımcı olan E-kaderin protein miktarı ve lokalizasyonlarının belirlenmesi için immü floresan boyama yapılmış ve floresan mikroskopta incelenmiştir. Vortioksetin uygulamasının 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için kontrol gruplarındaki (Şekil 4.45., Şekil 4.48.) E-kaderin proteinlerinin hücre zarında yoğun olarak yerleşim gösterdiği görülmektedir. 24 saat uygulama sonrasında 7,5 µM ve 15 µM Vortioksetin uygulanan (Şekil 4.46.) E-kaderin ifadesinin kontrol grubu ile arasında bir farklılık olmadığı görülmektedir. 48 saat inkübasyon sonrasında 7,5 µM ve 15 µM Vortioksetin uygulanan (Şekil 4.49., Şekil 4.50.) hücrelerdeki E-kaderin protein ifadesinin doza bağlı olarak azaldığı ve sitoplazmik boyamalar olduğu görülmektedir. 48 saat 15 µM Vortioksetin uygulanmasına bağlı olarak E-kaderin ifadesinin azalmasından dolayı hücrelerarası bağlantıların bozulduğu gözlenmiştir. 30 µM doz uygulanan gruplarda hücre canlılığı azalmış ve hücre zarı hasarından dolayı boyama görülmemiştir.

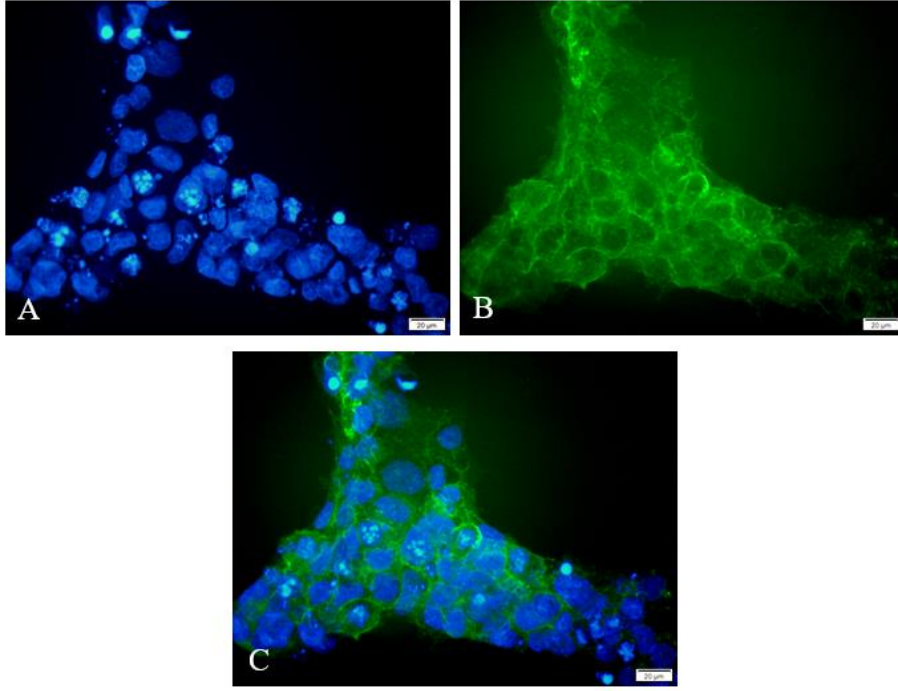
F-aktin filamentleri ve E-kaderin proteinleri plasenta hücrelerinin biraraya gelmesini sağlayarak plasenta bariyerinin oluşmasına yardımcı olmaktadır. BeWo hücrelerinde 48 saat 15 µM Vortioksetin uygulanmasına bağlı olarak F-aktin ve E-kaderin ifadelerinde azalma ve bozulma görülmesi hücrelerin biraraya gelme yeteneklerini engellediğini ve doku bütünlüğünün bozulduğunu göstermektedir. Aynı zamanda plasenta dokusunda trofoblast-trofoblast etkileşimlerini sağlayan kaderin bağlantıları trofoblast ve diğer fetal kaynaklı herhangi bir hücrenin biraraya gelmesine engel olarak da özgün bağlanma noktaları yaratmaktadır [69]. Sitotrofoblastik BeWo hücrelerinde yüksek miktarda E-kaderin ifade edildiği, sinsityotrofoblast halindeki BeWo hücrelerinde ise hücre zarı varlığındaki azalmayla E-kaderin ifadesinde azalma görülmektedir [70].



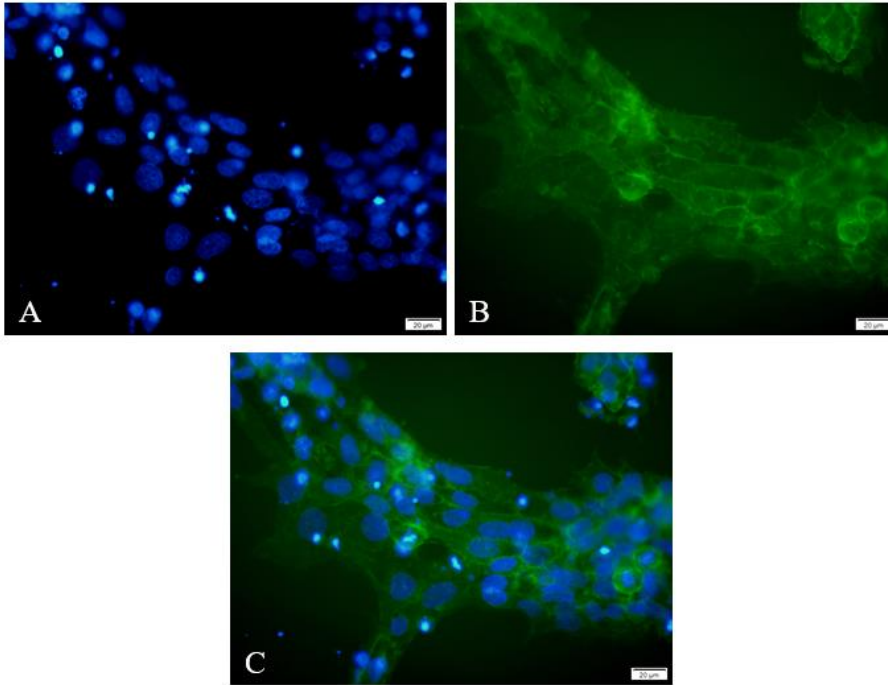
Şekil 4.45. BeWo hücrelerinde kontrol grubunun 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. E-Kaderin, C. Birleştirilmiş görüntüsü.



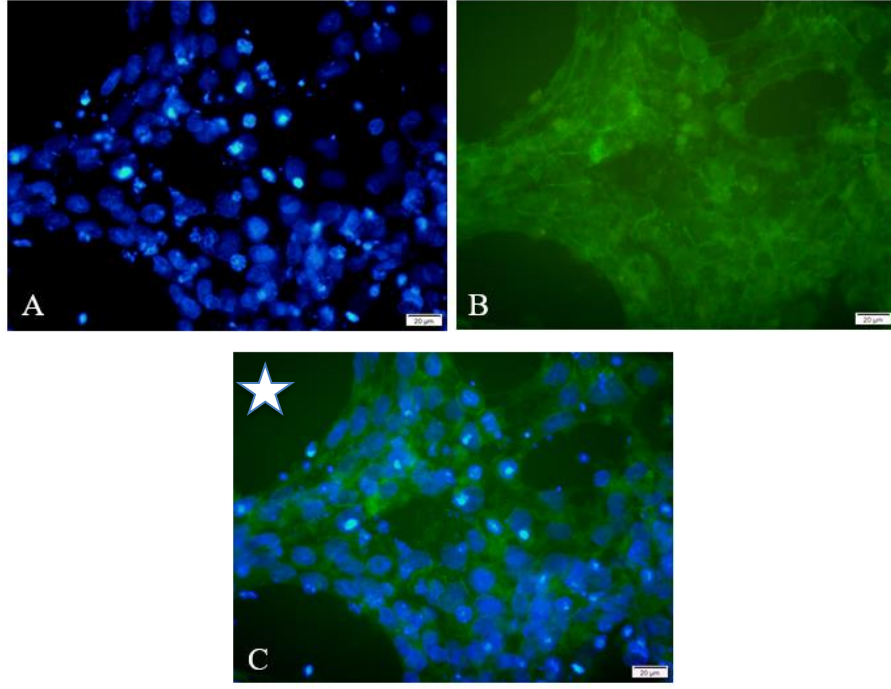
Şekil 4.46. BeWo hücrelerinde 7,5 µM Vortioxetin uygulaması 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. E-Kaderin, C. Birleştirilmiş görüntüsü.



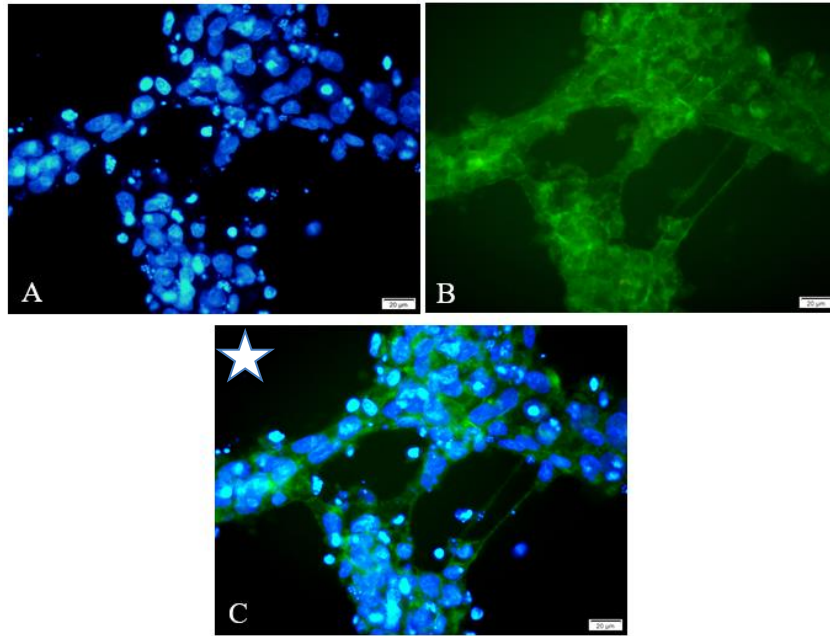
Şekil 4.47. BeWo hücrelerinde 15 μ M Vortioxetin uygulaması 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. E-Kaderin, C. Birleştirilmiş görüntüsü.



Şekil 4.48. BeWo hücrelerinde kontrol grubunun 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. E-Kaderin, C. Birleştirilmiş görüntüsü.



Şekil 4.49. BeWo hücrelerinde 7,5 μ M Vortioxetin uygulaması 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. E-Kaderin, C. Birleştirilmiş görüntüsü. ☆ , E-Kaderin yapısının bozuk olduğu görüntü.

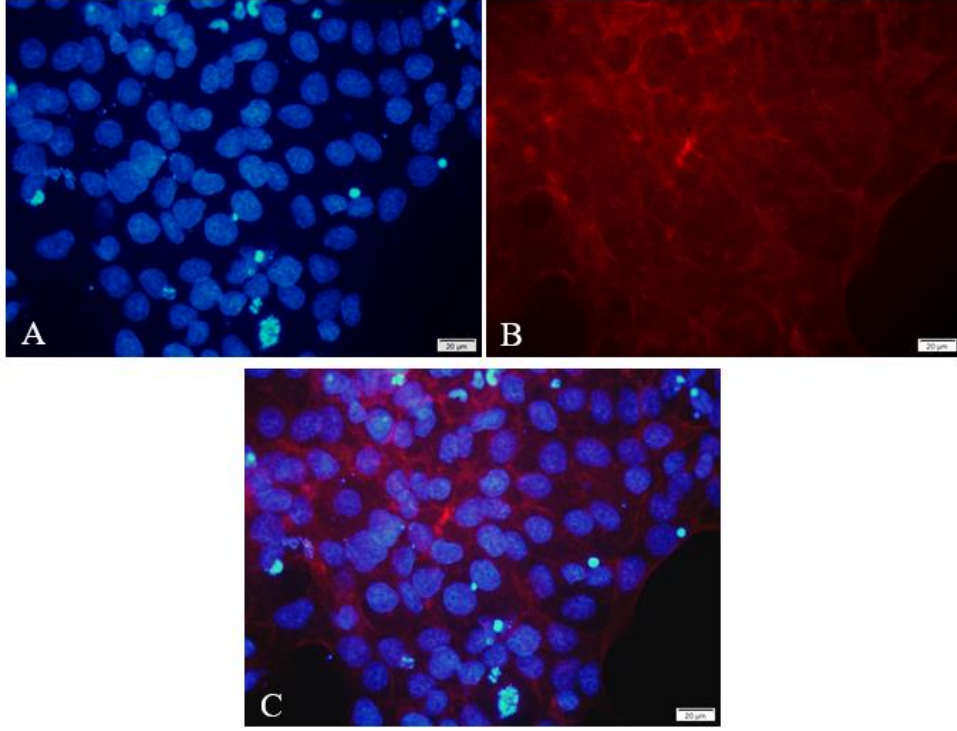


Şekil 4.50. BeWo hücrelerinde 15 μ M Vortioxetin uygulaması 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. E-Kaderin, C. Birleştirilmiş görüntüsü. ☆ , E-Kaderin yapısının bozuk olduğu görüntü.

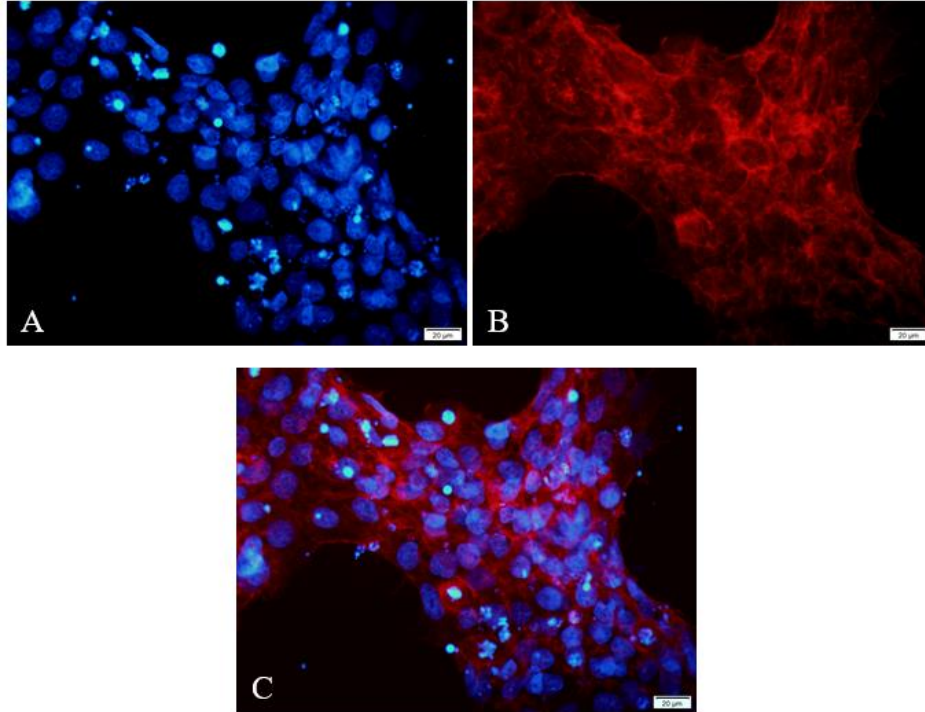
4.9. F-Aktin İmmüfloresan Görüntüleri

BeWo hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca Vortioksetin uygulanmasından sonra hücreye mekanik destek sağlayarak hücresel bütünlüğü koruyan F-aktin filamentlerinin lokalizasyonlarının belirlenmesi için immüfloresan boyama yapılmış ve floresan mikroskopta incelenmiştir. Vortioksetin uygulanmasının 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için kontrol gruplarındaki (Şekil 4.51 ve Şekil 4.54.) F-aktin filamentlerinin sitoplazmada ve hücre zarının altında yoğun ve düzenli olarak yerleşim gösterdiği görülmektedir. Vortioksetin uygulanmasından 24 saat sonraki 7,5 μM ve 15 μM doz grubuyla (Şekil 4.52., Şekil 4.53.) kontrol grubu F-aktin dağılımlarında fibrillerde düzensizlik görülmektedir. Vortioksetin uygulanmasından 48 saat sonrasında 7,5 μM ve 15 μM doz gruplarında (Şekil 4.55., Şekil 4.56.) F-aktin dağılımlarının doza bağlı olarak azaldığı ve ifadesinin azalmış olması nedeniyle hücresel bütünlüğü koruyamadığı gözlenmiştir. 30 μM doz uygulanan gruplarda hücre canlılığı azalmış ve hücre iskelet hasarından dolayı boyama görülmemiştir.

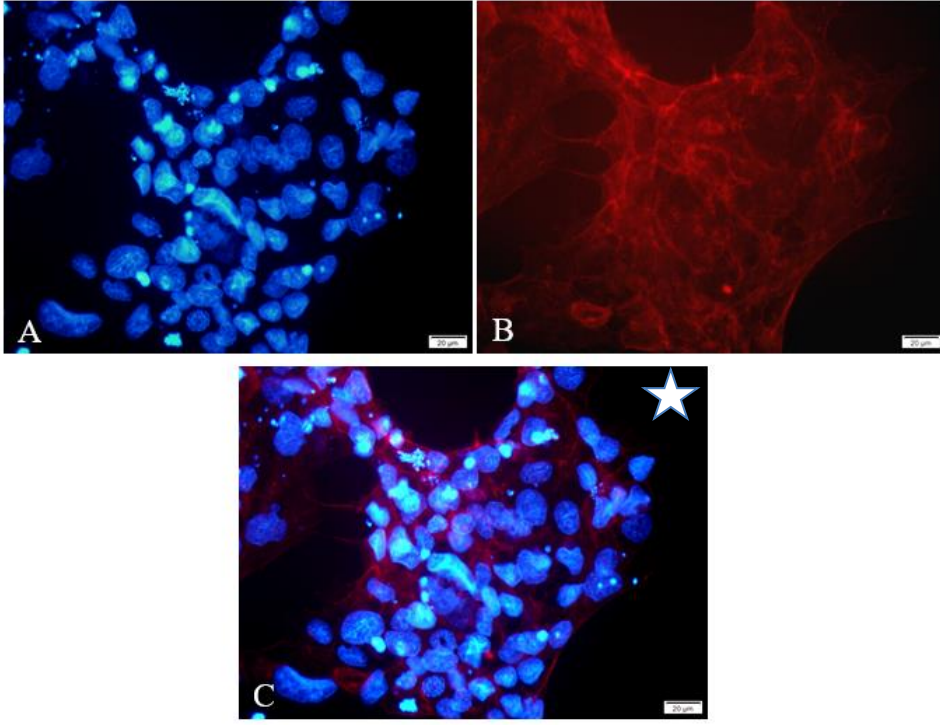
Gebelikte trofoblast hücrelerinin endometriyum invazyonu plasental karsinom ile ilişkilendirilebilmektedir. Plasental karsinom hücrelerinde aşırı ifade edilen LASP-1 gibi sitoskeletal proteinlerin hücre çoğalma ve göçü üzerinde etkileri olduğu bilinmektedir [115]. Placenta hücre hatları ile yapılan bir çalışmada, hücre göçü ve invazyonunun iskelet protein miktarının artışıyla ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde Vortioksetin maruziyetinden sonra F-aktin düzensizliği yaşayan BeWo hücreleri, gebelikte trofoblast hücrelerinin plasental prognozu veya invazyonda düzensizliği ile ilişkilendirilebilmektedir.



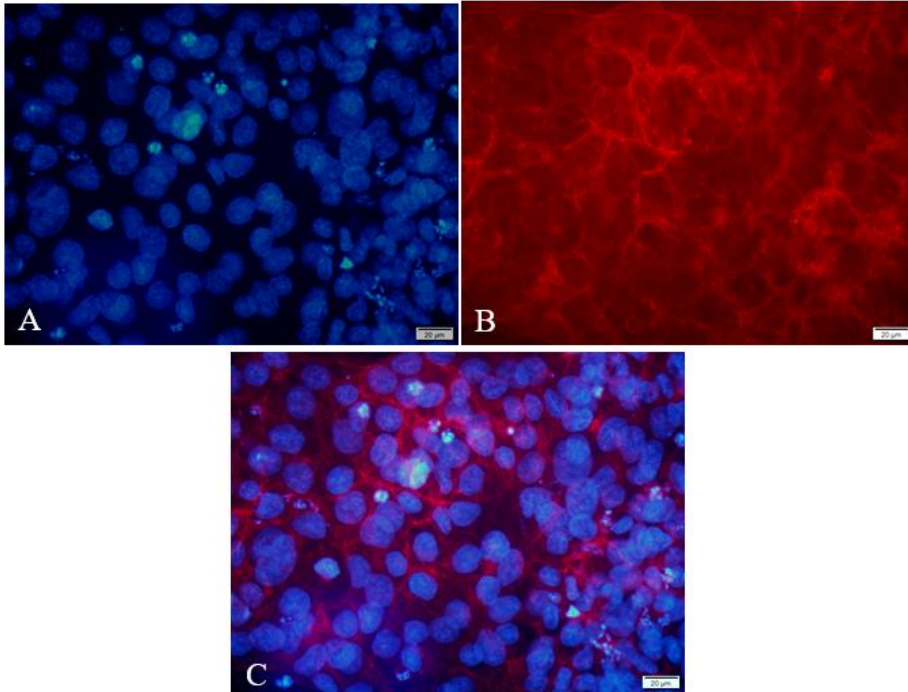
Şekil 4.51. BeWo hücrelerinde kontrol grubunun 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. F-Aktin, C. Birleştirilmiş görüntüsü.



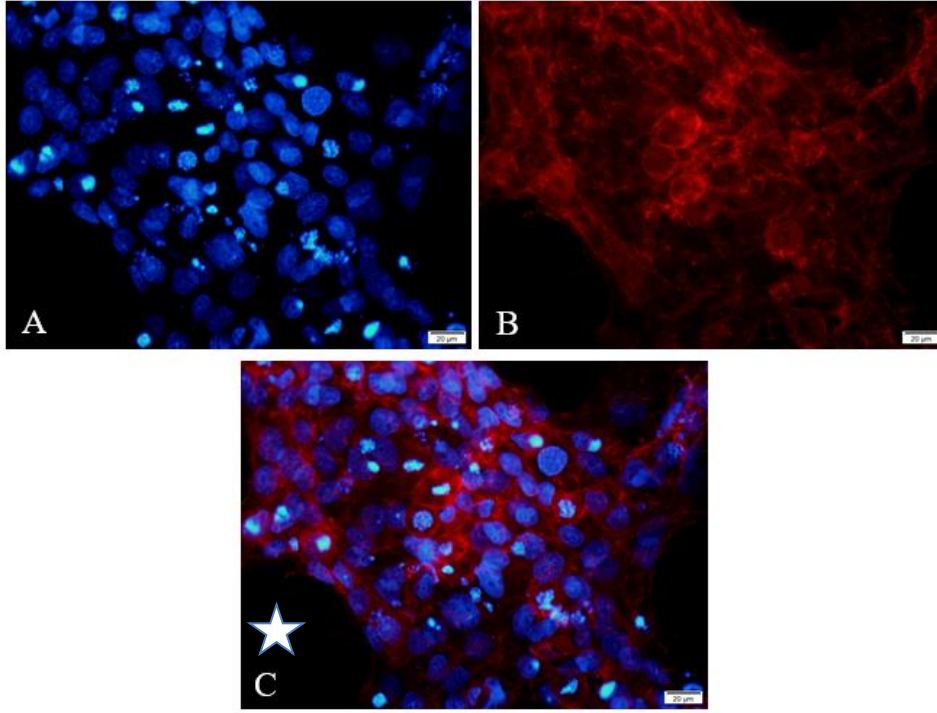
Şekil 4.52. BeWo hücrelerinde 7,5 µM Vortioxetin uygulaması 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. F-Aktin, C. Birleştirilmiş görüntüsü.



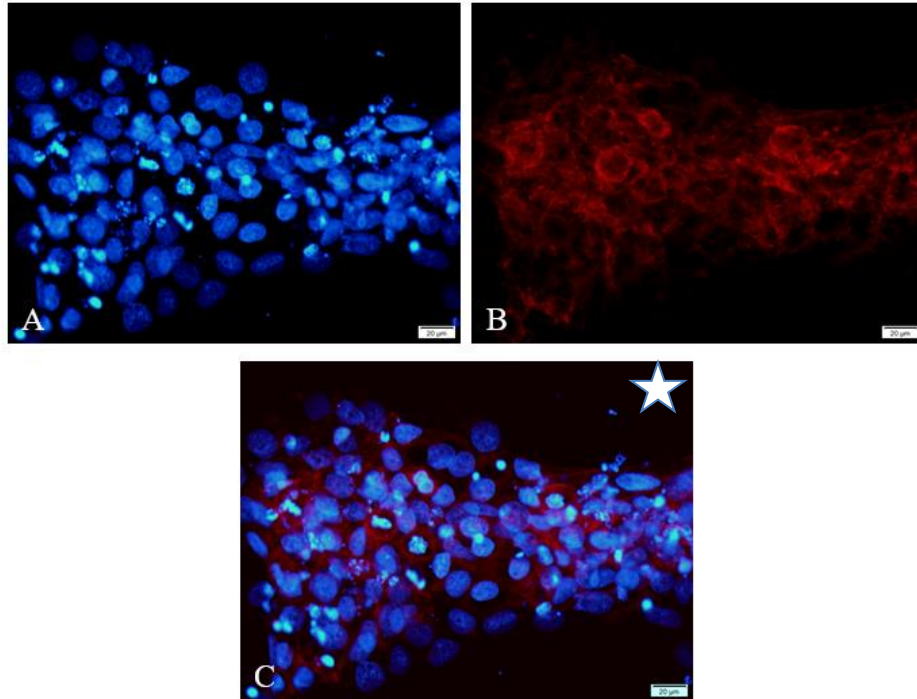
Şekil 4.53. BeWo hücrelerinde 15 µM Vortioxetin uygulaması 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. F-Aktin, C. Birleştirilmiş görüntüsü. ☆, F-Aktin yapısının bozuk olduğu görüntü.



Şekil 4.54. BeWo hücrelerinde kontrol grubunun 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. F-Aktin, C. Birleştirilmiş görüntüsü.



Şekil 4.55. BeWo hücrelerinde 7,5 μ M Vortioksetin uygulamanın 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. F-Aktin, C. Birleştirilmiş görüntüsü. ☆ ,F-Aktin yapısının bozuk olduğu görüntü.

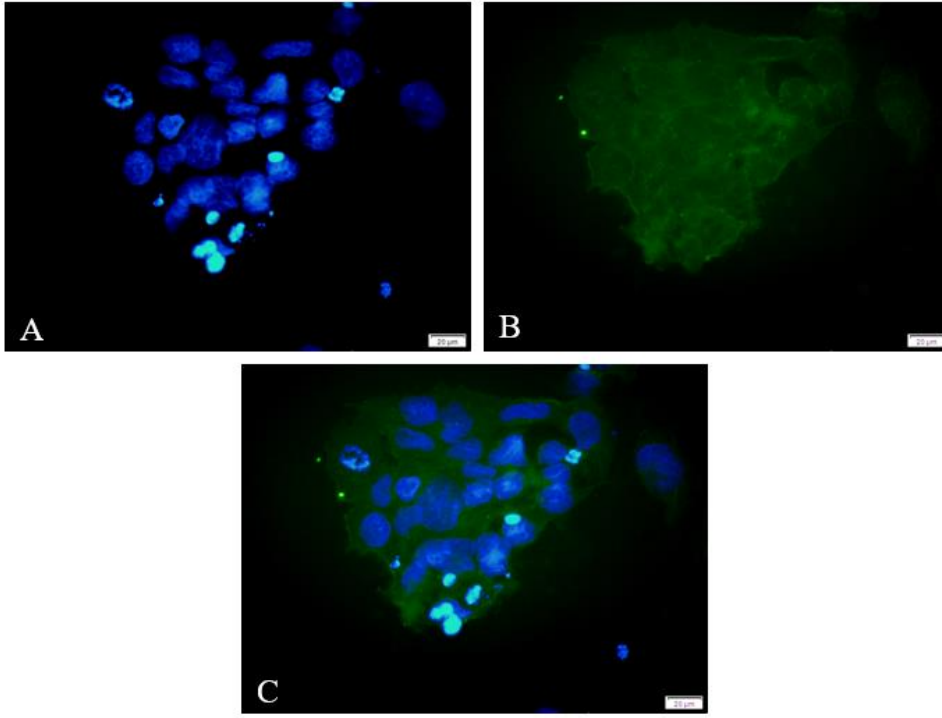


Şekil 4.56. BeWo hücrelerinde 15 μ M Vortioksetin uygulamanın 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. F-Aktin, C. Birleştirilmiş görüntüsü. ☆ ,F-Aktin yapısının bozuk olduğu görüntü.

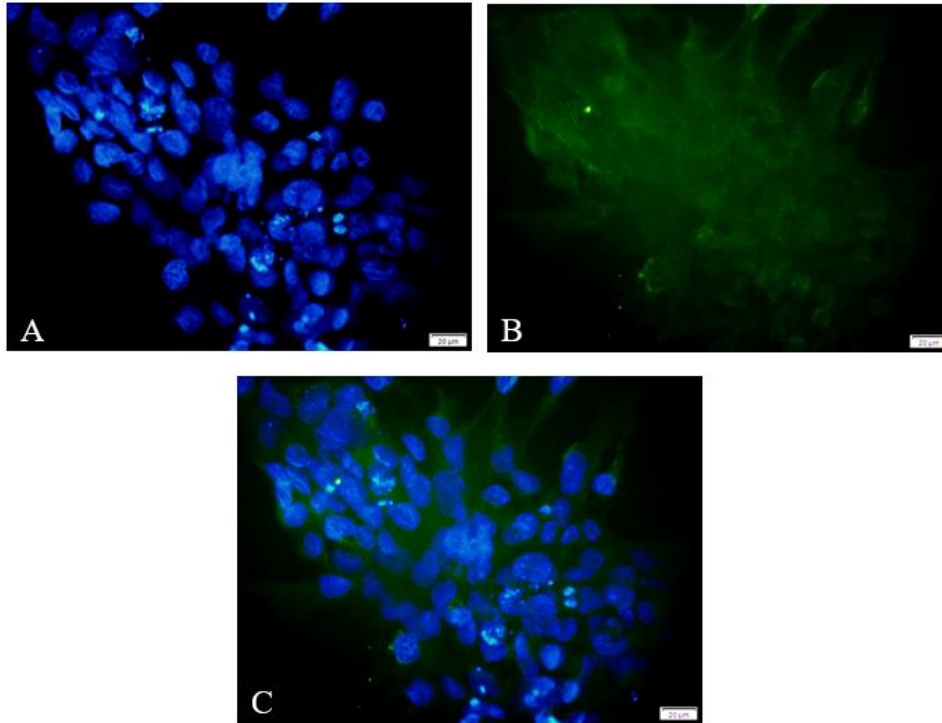
4.10. Serotonin Geri alım Reseptörleri (SERT) İmmüfloresan Görüntüleri

BeWo hücrelerine 24 ve 48 saat boyunca Vortioksetin uygulanmasından sonra hücrelerdeki SERT proteinin miktarı ve lokalizasyonunun belirlenebilmesi için immüfloresan boyama yapılmıştır ve floresan mikroskopta incelenmiştir. Vortioksetin uygulanmasının 24 ve 48 saat inkübasyon süreleri için kontrol gruplarındaki (Şekil 4.57., Şekil 4.60.) SERT proteini hücrede yoğun ve hücre zarında düzenli olarak yerleşim göstermektedir. Vortioksetin uygulanmasından 24 saat sonraki 7,5 μM ve 15 μM doz grubuyla (Şekil 4.58, Şekil 4.59.) kontrol grubu SERT proteini arasında bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. Vortioksetin uygulanmasından 48 saat sonrasında 7,5 μM ve 15 μM doz gruplarında (Şekil 4.61., Şekil 4.62.) SERT proteinin doza bağlı olarak azaldığı görülmektedir. 48 saat 15 μM Vortioksetin uygulanmasına bağlı olarak SERT proteinin hücredeki ifadesinin azalmış olması serotonin taşınmasının SERT reseptörleriyle doğru bir şekilde gerçekleşemeyeceğini göstermektedir.

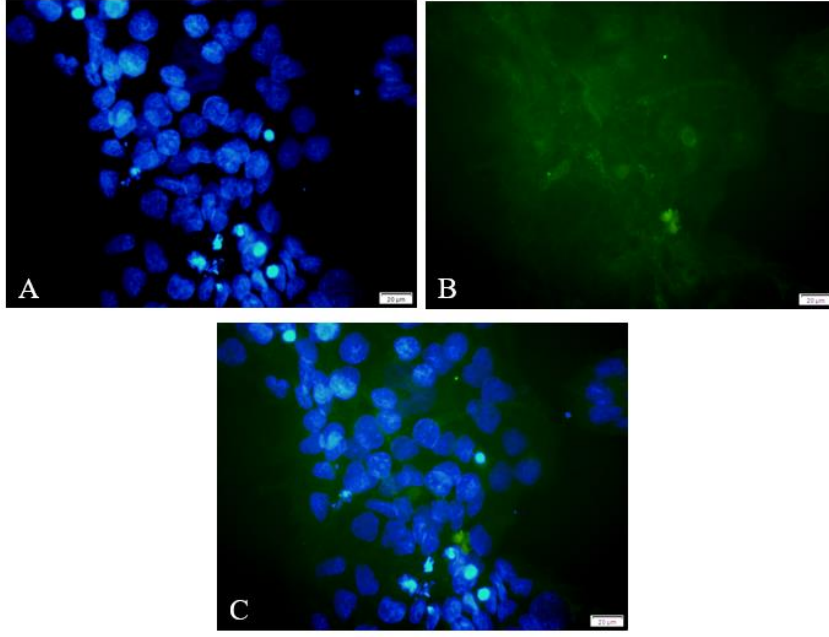
SSRI tip antidepresan etken maddelerinden fluoksetin ve nurfluoksetin (sırasıyla 1-3 μM) kullanılarak BeWo hücrelerinde SERT ve aromataz aktivitesi incelendiğinde CYP19 aktivitesini düşürdüğü, hCG seviyesini değiştirmediği belirtilmektedir. SERT ifadesinde ise mRNA ve protein seviyesinde azalma olduğu ifade edilmektedir. Çalışma sonucunda 5-HT reseptörlerinin plasental aromataz ile ilişkilendirildiği ve hormonal etkileşimi etkilediği görülmüştür [74].



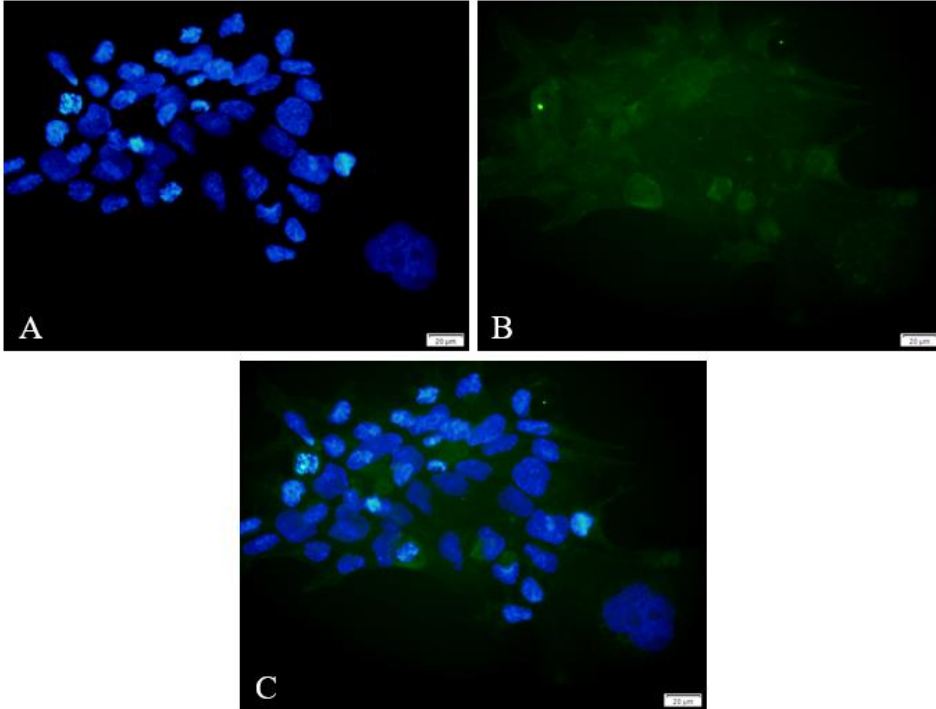
Şekil 4.57. BeWo hücrelerinde kontrol grubunun 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyaması inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. SERT, C. Birleştirilmiş görüntüsü.



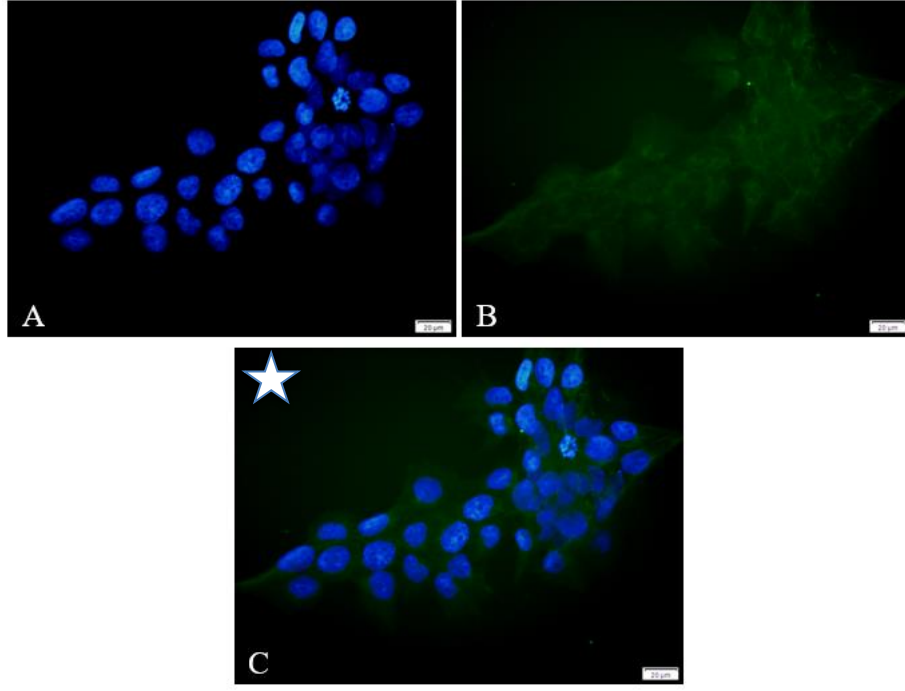
Şekil 4.58. BeWo hücrelerinde 7,5 µM Vortioxetin uygulaması 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. SERT, C. Birleştirilmiş görüntüsü.



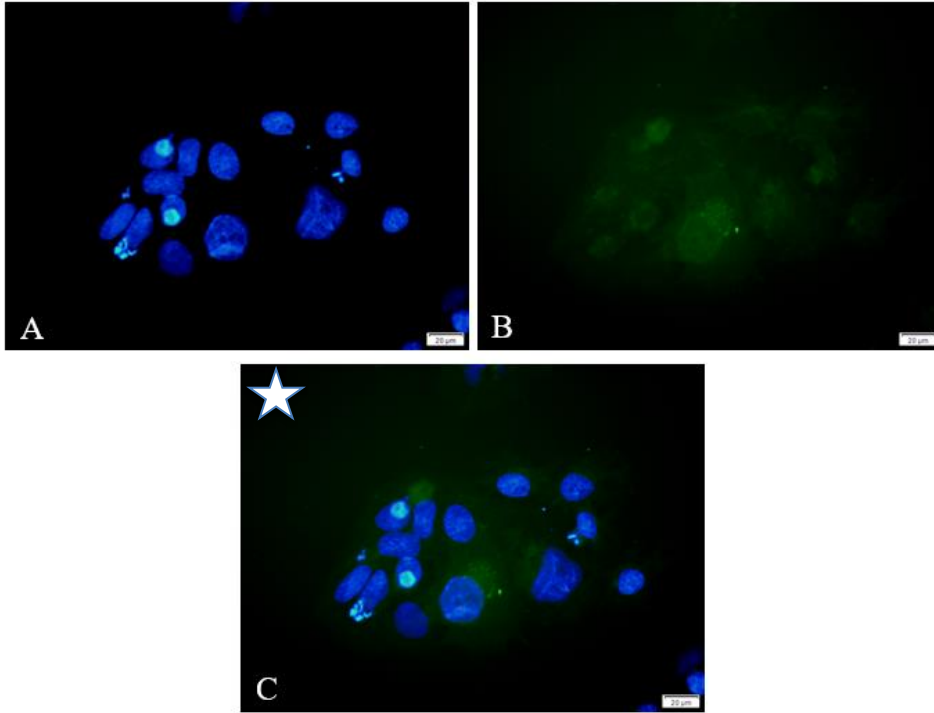
Şekil 4.59. BeWo hücrelerinde 15 μ M Vortioxetin uygulamanın 24 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. SERT, C. Birleştirilmiş görüntüsü.



Şekil 4.60. BeWo hücrelerinde kontrol grubunun 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. SERT, C. Birleştirilmiş görüntüsü.



Şekil 4.61. BeWo hücrelerinde 7,5 μ M Vortioxetin uygulaması 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. SERT, C. Birleştirilmiş görüntüsü. ☆, SERT miktarının az olduğu görüntü.



Şekil 4.62. BeWo hücrelerinde 15 μ M Vortioxetin uygulamanın 48 saat inkübasyon sonrası immünfloresan boyamanın inverted mikroskop görüntüsü A. DAPI, B. SERT, C. Birleştirilmiş görüntüsü. ☆, SERT miktarının az olduğu görüntü.

4.11. β -HCG Hormon Seviyelerinin Ölçüm Sonuçları

İki ve üç boyutlu hücrelerde β -hCG hormon üretiminin karşılaştırılması için BeWo ve 3:1 grubu kullanılmıştır.

İki boyutlu BeWo grubunda Şekil 4.63.'te görüldüğü üzere, 7,5 μ M Vortioksetin uygulanan hücrelerde tüm inkübasyonlarda kontrol grubuna göre hormon miktarında anlamlı bir artış görülmüştür. 15 μ M Vortioksetin uygulanan hücrelerde 24 ve 72 saatlik inkübasyonlarda hem kontrol grubu hem de 7,5 μ M doz grubuna göre hormon miktarında artış görülürken 48 saatlik inkübasyonda sadece 7,5 μ M doz gruba göre artış görülmüştür. 30 μ M Vortioksetin uygulanan hücrelerin tüm inkübasyonlarında kontrol grubu, 7,5 μ M ve 15 μ M Vortioksetin uygulamalarına göre istatistiksel olarak β -hCG hormon miktarında anlamlı bir azalış görülmüştür.

Üç boyutlu BeWo grubunda görüldüğü üzere, 7,5 μ M Vortioksetin uygulanan hücrelerde tüm inkübasyonlarda kontrol grubuna göre hormon miktarında anlamlı bir artış görülmüştür. 15 μ M Vortioksetin uygulanan hücrelerin hormon miktarı inkübasyon süresi arttıkça yükselse de 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda 7,5 μ M doz grubuna göre azalmıştır. 30 μ M Vortioksetin uygulanan hücrelerin hormon miktarı ise 7,5 μ M ve 15 μ M doz grubuna göre tüm inkübasyonlarda istatistiksel olarak azalmıştır.

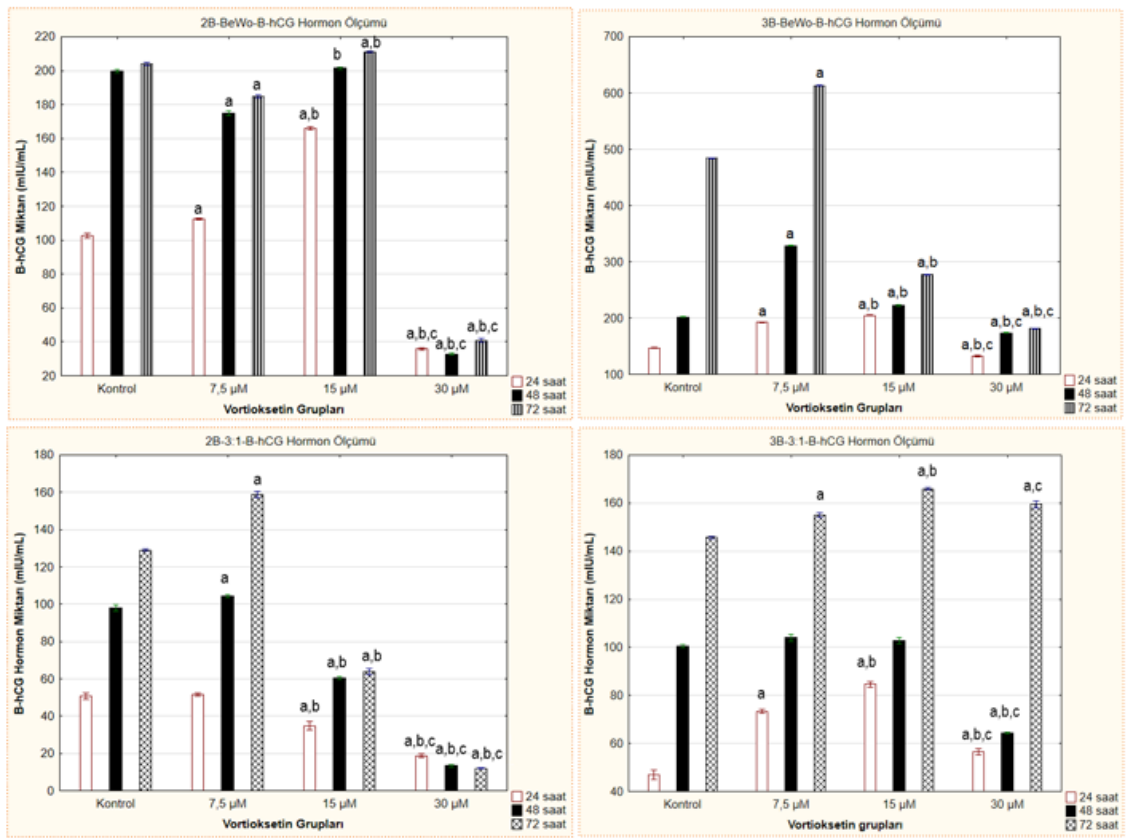
Bu karşılaştırmada görüldüğü üzere, üç boyutlu kültüre edilen BeWo hücrelerinde her inkübasyon ve Vortioksetin uygulamasında iki boyutlu kültüre edilenlere göre hormon miktarında artış görülmektedir [116].

İki boyutlu 3:1 grubunda görüldüğü üzere, 7,5 μ M Vortioksetin uygulanan hücrelerde sadece 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda kontrol grubuna göre hormon miktarında artış görülmüştür. 15 μ M Vortioksetin uygulanan hücrelerin tüm inkübasyonlarında hem kontrol grubu hem de 7,5 μ M doz grubuna göre hormon miktarında azalma görülmüştür. 30 μ M Vortioksetin uygulanan hücrelerin de tüm inkübasyonlarında hormon miktarlarında hem 7,5 μ M hem de 15 μ M Vortioksetin gruplarına göre anlamlı bir azalma görülmüştür.

Üç boyutlu 3:1 grubunda görüldüğü üzere, 7,5 μ M ve 15 μ M Vortioksetin uygulanan hücrelerde 24 ve 72 saatlik inkübasyonlarında hormon miktarında istatistiksel artış görülürken, 48 saatlik inkübasyonda bir farklılık görülmemiştir. 30 μ M Vortioksetin uygulanan hücrelerde ise 24 saatlik inkübasyonda hem kontrol hem 7,5 μ M hem de 15 μ M doz uygulanan gruplara göre hormon miktarında anlamlı bir azalış görülmüştür. 48

saatlik inkübasyonda da durum aynıken, 72 saatlik inkübasyondaki hormon miktarında belirli bir yükseliş görülmüş ve 15 µM Vortioksetin uygulamasına göre istatistiksel bir artış olduğu gözlemlenmiştir.

Bu karşılaştırmada görüldüğü üzere 15 µM ve 30 µM Vortioksetin uygulaması üç boyutlu kültürlerde iki boyutlu kültürlerle göre daha fazla hormon üretimi desteklenmektedir. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada 3B BeWo hücrelerinin 2B kültürlenen gruplarına göre hCG hormon miktarında anlamlı bir artış görülmektedir [110,117].



a Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b 7,5 µM Vortioksetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). c 15 µM Vortioksetin uygulanan gruptan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Şekil 4.63. 2B ve 3B sistemlerde BeWo ve 3:1 ortak kültür oran grubunun 24, 48 ve 72 saatlik Vortioksetin uygulamasından sonra β-HCG hormon seviyelerinin ölçümü.

Sağlıklı gebelik için gerekli olan steroid hormonlar, gebelik boyunca farklı miktarlarda sentezlenmektedir. Gebeliğin devamı ve fetal gelişimin korunmasında steroid hormonlar

da eşey hormonları kadar önemli bir rol oynamaktadır [61]. Östrojenler genel olarak overlerde ve periferik dokularda, androjenlerden aromatzasyonla sentezlenmektedir [118]. Gebelikte ise östrojen sentezini kontrol eden enzim plasental aromatazdır (CYP19). CYP19, yoğunlukla sinsitiyotrofoblast hücrelerinde ve *in vitro*da BeWo hücrelerinde sentezlenmektedir [61].

Epidemiyolojik çalışmalar, hamilelikte ağır metaller, poliklorlu bifeniller, dioksinler ve pestisitler gibi maddelere maruz kalınmasıyla fetüste doğum kilosunda azalma, fetal bilişsel ve üreme sistemi gelişiminde değişiklikler ve erken doğum gibi sağlık problemleri yaşandığını göstermiştir. Bu olumsuz etkilerin bazıları, plasentanın fonksiyonel endokrin birimi olan sinsityotrofoblastın östrojen üretimindeki değişikliklerinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Placenta sitokrom P450 enzimi CYP17 tarafından katalize edilen steroid 17 α -hidroksilaz, 17,20-liyaz aktivitesinden yoksun olduğu için *de novo* olarak androjen üretimi yapamamaktadır. Bu nedenle, trofoblastın östrojen üretimi, plasental aromataz (CYP19) için substrat olarak işlev gören fetal ve maternal androjen öncüllerine dayanmaktadır. İnsan gebeliği sırasında ortaya çıkan bu karmaşık steroidojenik etkileşimleri incelemek için deneysel araçlar son derece sınırlıdır. İnsanların dahil edildiği deneysel yaklaşımlar, etik sebeplerden ötürü mümkün değildir. *In vivo* kemirgen modelleri ise spesifik gen inaktivasyon çalışmaları için yararlı olsa da, gebelik sırasında insan steroidojenezile büyük ölçüde farklılık göstermektedir. Çünkü kemirgen plasentası CYP19 enzimi ifade etmediğinden insan plasentasının aksine östrojenleri sentezleyememektedir. Placenta ve fetal hücrelerden hormon salgılanmasını değerlendirmek için *in vitro* modeller geliştirilirken steroidojenik etkileşimleri birarada oluşturmak yapılan çalışmaya anlamsal bir bütünlük katmaktadır.

Yalnızca bağımsız hücre hatları kullanılan deneysel modeller, placenta ve fetüs arasındaki hormonal etkileşimi yansıtmamaktadır. Ancak yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır ve konuyla ilgili daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır [61].

Plasentanın işlevsel endokrin birimi olan trofoblastların hormon üretiminin SSRI ile engellenmesi, gebelik sırasında utero-plasental arterlerin yeniden yapılandırılması, trofoblastların endometriyuma ilerleyişi ve villus trofoblastın sinsitleştirilmesi dahil çeşitli süreçleri etkileyebilmektedir. Bunun sonucunda gerilemiş fetal gelişim, erken doğum gibi ciddi obstetrik komplikasyonlara, preeklampsi ve intrauterin büyüme kısıtlamalarına sebep olabilmektedir. Bu durum, gebelerde risk yaratabilecek olan

antidepesanların kullanımına onay verilmesi konusundaki şüpheleri arttırmıştır, bu nedenle yapılacak yeni çalışmalar teşvik edilmekte ve güncellemeler yapılması beklenmektedir [61].

5. YORUM

Gebeler insanlar üzerinde herhangi bir ksenobiyotiğin toksisitesini çalışmak etik kısıtlamalar doğrultusunda kabul edilmemektedir. Ancak plasenta, embriyonal gelişimi doğrudan etkileyen bir doku olması nedeniyle üzerinde çok fazla inceleme yapılması gereken bir dokudur. Literatürdeki bilgiler gebe sağlığı için kullanımı zararlı olan uyuşturucu, alkol, sigara gibi maddelerin ancak hasta öykülerinden elde edilen genellemelerdir [119]. Bu durumda gebelikte kullanılan ve fetotoksitate yaratan maddeler hakkında elde edilebilir bilgiler ayrıntılı olarak ele alınamamaktadır. Gebe sağlığı ve gelecek nesillerin sağlığını olumsuz yönde etkileyen herhangi bir kaynağın araştırılarak muhtemel zararın olabilecek en düşük seviyeye indirilmesi gerekmektedir [25].

Bu tez çalışmasında, plasenta dokusunun *in vivo*yu en iyi şekilde yansıtabilmesi için BeWo ve HUVEC hücreleri birlikte kültürlenerek plasentanın karmaşık dokusu *in vitro* ortamda 2B ve 3B ortamlarda modellenerek incelenmiştir.

1. BeWo ve HUVEC hücrelerinin ikilenme zamanlarının farkından dolayı iki boyutlu kültürasyonda inkübasyonlar farklılık göstermiştir. Bu nedenle her analiz ve her model grubunda birçok inkübasyon süresi kullanılması gerekmiştir.

2B ortak kültür gruplarının belirlenebilmesi için 1:1, 1:2, 2:1, 3:1 ve 4:1 farklı hücre konsantrasyonlarında 24, 48, 72 ve 96 saat canlılık analizi incelenmiştir. Hücre canlılığı açısından en iyi olan grubun 3:1 hücre oranı (BeWo: HUVEC) olduğu belirlenmiştir.

Bunu belirlerken CellTracker boyama yapılarak hücrelerin konumlanması, miktarı, adherentlik potansiyelleri ve genel morfolojileri görüntülenmiştir.

3B ortak kültür gruplarının belirlenebilmesi için 2B gruplarından ve inkübasyon saatlerinden yola çıkarak 2:1, 3:1 ve 4:1 hücre konsantrasyonlarında 24, 48 ve 72 saat boyunca canlılık analizi yapılmıştır.

2B kültüre uyumlu olarak hücre canlılığı 3:1 oran grubunda (BeWo: HUVEC) diğer gruplara kıyasla yüksek çıkmıştır.

Aynı zamanda CellTracker boyama ile 120 saat boyunca hücrelerin lokalizasyonları belirlenmiş ve sferoid yapılarının bozulmadan kaldığı görülmüştür. 2B canlılık analizinde 96 saatte canlılık düşerken 3B gruplarında sferoid yapısının 120 saate kadar

bütünlüğünün bozulmaması hücrelerin 3B kültürünün başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir.

3. 2B kültürlerde, mono ve 3:1 ortak grubunun Vortioksetin uygulamasına verdiği yanıtlar incelendiğinde, 3:1 grubu 15 μ M doz uygulamasında BeWo hücrelerine kıyasla, 30 μ M doz uygulamasında HUVEC hücrelerine kıyasla % canlılık değerlerinde artış göstermiştir. Ortak kültür grubunun mono kültürlerle göre etken maddeye karşı direnci biraraya getirilen hücrelerin Vortioksetine karşı daha dirençli olduğunu göstermektedir.

4. Yapılan bu tez çalışmasında, BeWo ve HUVEC hücrelerinin ayrı ayrı ve birlikte (ortak-kültür) başarılı bir şekilde sferoid (mikro doku) oluşturdukları Petri Dish tekniği ile ilk kez gösterilmiştir. Ortak kültürlerinde de sferoid yapısında hücrelerin birbirleriyle etkileşimleri görüntülenmiştir. Hücrelerin tutundukları yüzeyin sertliği veya sferoid olduklarında kendi kendilerine biraraya gelme özellikleri *in vivo* dokudaki substrat özelliklerini yansıtması adına oldukça önemlidir [120]. Bu nedenle tez çalışmasında hücrelerin 2B ve 3B yanıtları birarada karşılaştırılmıştır.

5. 3B kültürlerde, mono ve 3:1 grubunun Vortioksetin uygulamasına verdiği yanıtlar incelendiğinde 3:1 grubunun 15 μ M ve 30 μ M doz uygulamasında her iki mono kültür grubuna kıyasla canlılığında artış olduğu görülmektedir. Bu sonuç doğrultusunda ortak kültüre edilen mikro doku modelinde mono kültürlerle kıyasla hücrelerin toksisiteye daha dirençli oldukları görülmektedir.

2B ve 3B mono ve ortak kültürleri kendi sistemleri içerisinde 3:1 grubunun daha dirençli olması incelendiği gibi, literatüre uyumlu olarak 3B kültürlerde 2B kültürlerle göre aynı doz ve inkübasyon saatlerinde canlılık değerleri daha yüksek bulunmuştur. MTS analizine ek olarak Kalsein-PI boyaması yapılarak mikro dokunun canlı ve ölü hücre lokalizasyonları belirlenmiştir.

Canlılık analizlerinin sonucu olarak herhangi bir ksenobiyotiğin toksisitesi veya ilaç doz belirleme çalışmalarında modeller üzerinde ortak kültür ve 3B deneyleri yapılarak daha yüksek dozlarda deneyler yapılabilir ve olası yan etkileri ön çalışmalar ile incelenebilme imkânı sağlamaktadır.

6. TEER ve Na-F ölçümleri ile mono ve ortak kültürlerde Vortioksetine verilen yanıt canlılık analizleri doğrultusunda görülmüştür.

7. BeWo hücrelerinde Vortioxetin uygulamasıyla E-kaderin ve F-aktin proteinlerinin yapısında bozulmalar görülmüştür. SERT proteinlerinin inkübasyon ve doz arttıkça immunolokalizasyonunda azalma görülmüştür.

8. İki ve üç boyutlu sistemlerde β -hCG hormon miktarı karşılaştırıldığında beklendiği üzere 3B sistemlerde hormon miktarının daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca oran gruplarında BeWo hücrelerinin HUVEC hücreleriyle birlikte kültürlendiklerinde de β -hCG üretimine devam ettiği ve aynı şekilde 3B ortamlarda daha fazla miktarda üretildiği görülmüştür.

Vortioxetin uygulaması düşük ve orta doz toksisitede mikro dokuların bütünlüğünü bozmakta, canlılık üzerine etki etmemektedir. Buna karşılık bariyer yapısında bozulmalar ve destekleyici şekilde Na-F akış miktarında artmalar görülmektedir. 2B ve 3B sistemlerde yüksek doz uygulamada hormon miktarını düşürdüğü görülmektedir. SERT ifadelerinin miktarını azaltarak BeWo hücrelerinde serotonin taşınmasını engellemektedir. BeWo hücrelerinde serotonin ifadesi CYP19 aktivasyonunu değiştirerek hormon üretimini engellemekte ve plasental kusurlar yaratabilmektedir. Bu gibi doğum öncesi aksaklıklarla plasentanın zarar görmesi gelecek nesillerin sağlığı için tehdit yaratmaktadır.

Oluşturulan plasenta mikro dokularıyla, yeni geliştirilen ve gebelikte kullanımı zorunlu olan ilaçlar (antidepresan, epilepsi, kanser, kardiovasküler) kozmetik ve temizlik ürünleri, gıda katkı maddeleri, nanopartiküller gibi tüm ksenobiyotikler ve metabolitlerinin plasental geçişinin araştırılabileceğini öngörülmektedir. Plasenta gibi yumuşak doku ve organların 3B kültürlerinde doku içerisindeki çeşitliliği ve niş ortamını yaratmak için ortak kültür çalışmaları yapılarak *in vivo*ya karşı verilen yanıtın doğruluğu arttırılmalıdır.

SSRI'ların depresyona karşı etkin kullanımı kanıtlanmış olsa da gebelikte SSRI maruziyetinin etkileri hala tartışmalıdır. Yapılan çalışmalarda fetüslerin solunum, gastrointestinal sistem, kalp ve nörolojik gelişim değişiklikleri ve düşük, doğum ağırlığı ya da prematüre doğum gibi gebelik şikayetlerinin SSRI ilişkili olduğu gösterilmiş olmasına rağmen; diğer çalışmalar SSRI'ların fetal gelişimi etkilemediği yönündedir.

SSRI'ların plasentanın yapısına, geçirgenliğine ve fetal dokulara olası etkileri konusunda literatürde birbirleriyle çelişen bilgiler yer almaktadır. Tez çalışmasında elde edilen sonuçların literatürdeki bu çelişkiyi gidermesi beklenmekte ve mekanizmayı

aydınlatmaya katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Vortioksetin kullanımının 5-HT seviyelerinin artmasıyla sonuçlanan ve SERT üzerindeki etkileriyle CYP19'u ve östrojen üretimini etkilediği öngörülmektedir. Bu tez çalışması, SSRI antidepresan ilacı Brintelliks'in etken maddesi olan Vortioksetinin plasental toksisitesini, bariyer yapısının verdiği yanıtı, hormon üretimini 2B ve 3B sistemlerde kıyaslayarak mono ve ortak kültürleri açısından bir değerlendirme sunmaktadır.

Tez çalışması kapsamında plasenta dokusunu mikro dokularda yansıtabilmek amacıyla uygun sferoid boyu, çapı, hücre oranı belirlenerek ideal mikro plasenta dokuları oluşturulmuştur. Tez çalışmasının devamı kapsamında ideal sferoidlere farklı hücre hatları eklenerek hormon analizlerinin kapsamının arttırılması ve moleküler analizler yapılarak modelin toksisiteye verdiği yanıtların ayrıntılı şekilde incelenmesi planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] K.Y. Çalık, S. Aktaş, Gebelikte Depresyon: Sıklık, Risk Faktörleri ve Tedavisi, *Psikiyatr. Güncel Yaklaşımlar*. 3 (2011) 142–162. <http://dergipark.ulakbim.gov.tr/pskguncel/article/view/5000076380>.
- [2] S. Kim, E.M. Kim, M. Yamamoto, H. Park, H. Shin, Engineering Multi-Cellular Spheroids for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Adv. Healthc. Mater.* 0 (2020) 1–18.
- [3] A.P. Napolitano, P. Chai, D.M. Dean, J.R. Morgan, Dynamics of the self-assembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels, *Tissue Eng.* 13 (2007) 2087–2094. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0190>.
- [4] G. Chen, A.M. Højer, J. Areberg, G. Nomikos, Vortioxetine: Clinical Pharmacokinetics and Drug Interactions, *Clin. Pharmacokinet.* 57 (2018) 673–686. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0612-7>.
- [5] M. Kuru, Omurgalı Hayvanlar, 11th ed., Palme Yayıncılık, 2013.
- [6] S. Gedikli, E. Özbek, T. Demirci, Fertilizasyonun Moleküler Temeli, *Van Tıp Derg.* 20 (2013) 294–301.
- [7] M. Soares J., J. Hunt S., Placenta and Trophoblast, *Methods and Protocols*, Volume I, 2006. <https://doi.org/10.1385/1592599893>.
- [8] G. Wooding, Peter. Burton, Comparative Placentation. Structures, Functions and Evolution, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1979.tb07062.x>.
- [9] M.K. Bauer, J.E. Harding, N.S. Bassett, B.H. Breier, M.H. Oliver, B.H. Gallaher, P.C. Evans, S.M. Woodall, P.D. Gluckman, Fetal growth and placental function, *Mol. Cell. Endocrinol.* 140 (1998) 115–120. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00039-2](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00039-2).
- [10] G. Ewing, Y. Tatarchuk, D. Appleby, D. Kim, Placental Transfer of Antidepressant Medications: Implications for Postnatal Adaptation Syndrome, *HHS Public Access*. 54 (2016) 359–370. <https://doi.org/10.1007/s40262-014-0233-3>. Placental.
- [11] M. Rothbauer, N. Patel, H. Gondola, M. Siwetz, B. Huppertz, P. Ertl, A

- comparative study of five physiological key parameters between four different human trophoblast-derived cell lines, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06364-z>.
- [12] S. Furukawa, N. Tsuji, A. Sugiyama, Morphology and physiology of rat placenta for toxicological evaluation, *J. Toxicol. Pathol.* 32 (2019) 1–17. <https://doi.org/10.1293/TOX.2018-0042>.
- [13] T. W. Sadler, *Langman's Medical Embryology*, 7th ed., Williams & Wilkins; Subsequent edition, 1996.
- [14] C. Prouillac, S. Lecoecur, The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: Importance of membrane transporters and human models for transfer studies, *Drug Metab. Dispos.* 38 (2010) 1623–1635. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.033571>.
- [15] S. Shibata, E. H., Kobayashi, N. Kobayashi, A. Oike, H. Okae, Unique features and emerging in vitro models of human placental development, *Reprod. Med. Biol.* 19 (2020) 301–313.
- [16] W. Chatuphonprasert, K. Jarukamjorn, I. Ellinger, Physiology and Pathophysiology of Steroid Biosynthesis, Transport and Metabolism in the Human Placenta, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 1–29.
- [17] A.C. Enders, T.N. Blankenship, Comparative placental structure, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 38 (1999) 3–15. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(99\)00003-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00003-4).
- [18] O. Cassmer, Hormone production of the isolated human placenta, *Eur. J. Endocrinol.* 32 (1959) 9–82.
- [19] M.S. Poulsen, E. Rytting, T. Mose, L.E. Knudsen, Modeling placental transport: Correlation of in vitro BeWo cell permeability and ex vivo human placental perfusion, *Toxicol. Vitro.* 23 (2009) 1380–1386. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.028>.
- [20] M. Ceckova-Novotna, P. Pavek, F. Staud, P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function, *Reprod. Toxicol.* 22 (2006) 400–410. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.01.007>.
- [21] M. V St-pierre, M.A. Serrano, R.I. R Macias, U. Dubs, M. Hoehli, U. Lauper, P.J. Meier, J.J. G Marin, Expression of members of the multidrug resistance

- protein family in human term placenta, *Am J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol.* 279 (2000) R1495–R1503. <http://www.ajpregu.org> (accessed December 17, 2019).
- [22] F. Staud, P. Pavlek, Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2005). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.11.004>.
- [23] R. Moll, B. Davis, Iron, vitamin B12 and folate, *Med. (United Kingdom)*. 45 (2017) 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.mpm.2017.01.007>.
- [24] S. Adler, D. Basketter, S. Creton, O. Pelkonen, J. Van Benthem, V. Zuang, K.E. Andersen, A. Angers-Loustau, A. Aptula, A. Bal-Price, E. Benfenati, U. Bernauer, J. Bessems, F.Y. Bois, A. Boobis, E. Brandon, S. Bremer, T. Broschard, S. Casati, S. Coecke, R. Corvi, M. Cronin, G. Daston, W. Dekant, S. Felter, E. Grignard, U. Gundert-Remy, T. Heinonen, I. Kimber, J. Kleinjans, H. Komulainen, R. Kreiling, J. Kreysa, S.B. Leite, G. Loizou, G. Maxwell, P. Mazzatorta, S. Munn, S. Pfuhler, P. Phrakonkham, A. Piersma, A. Poth, P. Prieto, G. Repetto, V. Rogiers, G. Schoeters, M. Schwarz, R. Serafimova, H. Tähti, E. Testai, J. Van Delft, H. Van Loveren, M. Vinken, A. Worth, J.M. Zaldivar, Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: Current status and future prospects-2010, *Arch. Toxicol.* 85 (2011) 367–485. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0693-2>.
- [25] A. Young, A. Fukuhara, K.L. Audus, BeWo cells: an in vitro system representing the blood-placental barrier, in: Claus-Michael Lehr (Ed.), *Cell Cult. Model. Biol. Barriers*, 2012: pp. 337–350.
- [26] E.D. and R.F.. M. Roland A . Pattillo , George O . Gey, Human Hormone Production in vitro, *Science* (80-.). 159 (1968) 1467–1469.
- [27] S. Al-Nasiry, B. Spitz, M. Hanssens, C. Luyten, R. Pijnenborg, Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells, *Hum. Reprod.* 21 (2006) 193–201. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei272>.
- [28] P. Gerbaud, G. Pidoux, Review: An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion, *Placenta*. 36 (2015) S35–S42. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.12.015>.

- [29] J. Hakkola, O. Pelkonen, M. Fasanen, H. Raunio, Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in the human fetoplacental unit: Role in intrauterine toxicity, *Crit. Rev. Toxicol.* 28 (1998) 35–72. <https://doi.org/10.1080/10408449891344173>.
- [30] G.J. Burton, D.S. Charnock-Jones, E. Jauniaux, Regulation of vascular growth and function in the human placenta, *Reproduction*. 138 (2009) 895–902. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0092>.
- [31] B. Furie, B.C. Furie, Mechanisms of thrombus formation, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 938–949. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0801082>.
- [32] Y. Yazır, H. Dalçık, An Important Method in the Investigation of Vascular Pathologies: Endothelial Cell Culture, *Kosuyolu Kalp Derg.* 15 (2012) 137–142. <https://doi.org/10.5578/kkd.3563>.
- [33] M. Ibrahim, M.K. Richardson, Beyond organoids: In vitro vasculogenesis and angiogenesis using cells from mammals and zebrafish, *Reprod. Toxicol.* 73 (2017) 292–311. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.07.002>.
- [34] G.D. Yancopoulos, S. Davis, N.W. Gale, J.S. Rudge, S.J. Wiegand, J. Holash, Vascular-specific growth factors and blood vessel formation, *Nature*. 407 (2000) 242–248. <https://doi.org/10.1038/35025215>.
- [35] Y. Yazır, İnsan umbilikal venlerinden elde edilen endotel hücre (HUVEC) kültüründe, vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) vasküler hücre adezyon molekülü-1(VCAM-1) ve intersellular adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi, Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2004.
- [36] H. Ide, M. Okada, K. Sakihama, T. Katsuki, Y. Minamishima, “Transformation” of Human Endothelial Cells by SV40 Virions, *Microbiol. Immunol.* 32 (1988) 45–55. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1988.tb01364.x>.
- [37] O. Karaman, Z.B. Yaralı, Determination of minimum serum concentration to develop scaffold free micro-tissue, *Eur. Res. J.* 90 (2017). <https://doi.org/10.18621/eurj.342109>.
- [38] A.B. Sultani, L.A. Marquez-Curtis, J.A.W. Elliott, L.E. McGann, Improved Cryopreservation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells : A Systematic

- Approach, *Nature*. 6 (2016) 1–14.
- [39] H.-J. Park, Y. Zhang, S. P. Georgescu, K. L. Jhonson, D. Kong, J. B. Galper, Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis, *Stem Cell Rev.* 2 (2006) 93–102.
- [40] A. Evangelatov, R. Pankov, The Evolution of Three-Dimensional Cell Cultures Towards Unimpeded Regenerative Medicine and Tissue Engineering, in: *Intech*, 2016: pp. 221–246. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>.
- [41] J.M. Kelm, M. Fussenegger, Scaffold-free cell delivery for use in regenerative medicine, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 753–764. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.02.003>.
- [42] B.A. Baker, P.S. Pine, K. Chatterjee, G. Kumar, N.J. Lin, J.H. McDaniel, M.L. Salit, C.G. Simon, Ontology analysis of global gene expression differences of human bone marrow stromal cells cultured on 3D scaffolds or 2D films, *Biomaterials*. 35 (2014) 6716–6726. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.075>.
- [43] K.R. Hixon, T. Lu, S.A. Sell, A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications, *Acta Biomater.* 62 (2017) 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.033>.
- [44] T.M. Achilli, S. McCalla, A. Tripathi, J.R. Morgan, Quantification of the kinetics and extent of self-sorting in three dimensional spheroids, *Tissue Eng. - Part C Methods*. 18 (2012) 302–309. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0478>.
- [45] Z. Cesarz, K. Tamama, Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cells Int.* (2016) 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/9176357>.
- [46] E. Fennema, N. Rivron, J. Rouwkema, C. van Blitterswijk, J. De Boer, Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.003>.
- [47] F. Pampaloni, E. Stelzer, A. Masotti, Three-Dimensional Tissue Models for Drug Discovery and Toxicology, *Recent Pat. Biotechnol.* 3 (2009) 103–117. <https://doi.org/10.2174/187220809788700201>.
- [48] Ş. Öztürk, Kanser Kök Hücrelerinin Mikro Doku Oluşumuna ve

Organizasyonuna Etkisi, Ege Üniversitesi, İzmir, 2015.

- [49] C. Jensen, Y. Teng, Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?, *Front. Mol. Biosci.* 7 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033>.
- [50] T. Ishiguro, H. Ohata, A. Sato, K. Yamawaki, T. Enomoto, K. Okamoto, Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications, *Cancer Sci.* 108 (2017) 283–289. <https://doi.org/10.1111/cas.13155>.
- [51] A. Teimouri, Y. Pollen, R. Agu, 2D vs. 3D Cell Culture Models for In Vitro Topical (Dermatological) Medication Testing, *Cell Cult. IntechOpen.* (2018) 1–18. <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>.
- [52] E. Polat, Üç boyutlu hücre kültürü sistemlerine güncel yaklaşımlar, *Namık Kemal Tıp Derg.* 8 (2020) 84–92.
- [53] T.A.L. Brevini, G. Pennarossa, F. Gandolfi, A 3D approach to reproduction, *Theriogenology.* 150 (2020) 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.020>.
- [54] M. Kapałczyńska, T. Kolenda, W. Przybyła, M. Zajączkowska, A. Teresiak, V. Filas, M. Ibbs, R. Bliźniak, Ł. Łuczewski, K. Lamperska, 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures, *Arch. Med. Sci.* 14 (2016) 910–919.
- [55] K. Duval, H. Grover, L.H. Han, Y. Mou, A.F. Pegoraro, J. Fredberg, Z. Chen, Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture, *Physiology.* 32 (2017) 266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>.
- [56] K. Moshksayan, N. Kashaninejad, M.E. Warkiani, J.G. Lock, H. Moghadas, B. Firoozabadi, M.S. Saidi, N.T. Nguyen, Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture, *Sensors Actuators, B Chem.* 263 (2018) 1–52. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.01.223>.
- [57] K. Brajša, M. Trzun, I. Zlatař, D. Jelić, Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery, *Period. Biol.* 118 (2016) 59–65. <https://doi.org/10.18054/pb.2016.118.1.3940>.

- [58] S.J. Millard, K. Weston-Green, K.A. Newell, The effects of maternal antidepressant use on offspring behaviour and brain development: Implications for risk of neurodevelopmental disorders, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 80 (2017) 743–765. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.06.008>.
- [59] T. M. Hillhouse, J. H. Porter, A brief history of the development of antidepressant drugs: From monoamines to glutamate, *Exp Clin Psycharmacol.* 23 (2015) 1–21. <https://doi.org/10.1037/a0038550.A>.
- [60] A.R. Fata Nahas, S.A. Syed Sulaiman, Prescribing patterns of antidepressants among depressive men in Malaysia: A survey, *J. Young Pharm.* 10 (2018) 98–101. <https://doi.org/10.5530/jyp.2018.10.22>.
- [61] A.A.H. Thibeault, K. Deroy, C. Vaillancourt, J.T. Sanderson, A unique co-culture model for fundamental and applied studies of human fetoplacental steroidogenesis and interference by environmental chemicals, *Environ. Health Perspect.* 122 (2014) 371–377. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307518>.
- [62] C. Hamilton, P. Perez, Z. Ma, C. Sanchez, A. Mork, A.L. Pehrson, N. Zhang, Acute effects of vortioxetine and duloxetine on resting-state functional connectivity in the awake rat, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 128 (2018) 379–387. [https://doi.org/10.1016/s0924-977x\(16\)31072-0](https://doi.org/10.1016/s0924-977x(16)31072-0).
- [63] X. Gonda, S.R. Sharma, F.I. Tarazi, Vortioxetine: a novel antidepressant for the treatment of major depressive disorder, *Expert Opin. Drug Discov.* 14 (2019) 81–89. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1546691>.
- [64] E.F. Pearce, J.A. Murphy, Vortioxetine for the Treatment of Depression, *Ann. Pharmacother.* 48 (2014) 758–765. <https://doi.org/10.1177/1060028014528305>.
- [65] M. Sowa-Kućma, P. Pańczyszyn-Trzewik, P. Misztak, R.R. Jaeschke, K. Sendek, K. Styczeń, W. Datka, M. Koperny, Vortioxetine: A review of the pharmacology and clinical profile of the novel antidepressant, *Pharmacol. Reports.* 69 (2017) 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.01.030>.
- [66] M.T. Akay, *Sitoloji, Altıncı Ba*, Ankara, 2012.
- [67] H. Şahin, Y.K. Akpak, U. Berber, I. Gün, D. Demirel, A.R. Ergür, Expression of P-cadherin (cadherin-3) and E-selectin in the villous trophoblast of first trimester human placenta, *J. Turkish Ger. Gynecol. Assoc.* 15 (2014) 13–17.

<https://doi.org/10.5152/jtgga.2014.56563>.

- [68] M. Aghababaei, K. Hogg, S. Perdu, W.P. Robinson, A.G. Beristain, ADAM12-directed ectodomain shedding of E-cadherin potentiates trophoblast fusion, *Cell Death Differ.* 22 (2015) 1970–1984. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.44>.
- [69] C. Coutifaris, L.C. Kao, H.M. Sehdev, U. Chin, G. Babalola, O.W.J.F. Blaschuk Strauss, E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts, *Development.* 113 (1991) 767–777.
- [70] L.M. Brown, H.A. Lacey, P.N. Baker, I.P. Crocker, E-cadherin in the assessment of aberrant placental cytotrophoblast turnover in pregnancies complicated by pre-eclampsia, *Histochem. Cell Biol.* 124 (2005) 499–506. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0051-7>.
- [71] I. Smyrek, B. Mathew, S.C. Fischer, S.M. Lissek, S. Becker, E.H.K. Stelzer, E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity, *Biol. Open.* 8 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1242/bio.037051>.
- [72] R. Dominguez, C.K. Holmes, Actin Structure and Function, *Annu. Rev. Biophys.* 40 (2011) 169–86.
- [73] B. Sonier, C. Lavigne, M. Arseneault, R. Ouellette, C. Vaillancourt, Expression of the 5-HT_{2A} serotonergic receptor in human placenta and choriocarcinoma cells: Mitogenic implications of serotonin, *Placenta.* 26 (2005) 484–490. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.08.003>.
- [74] A.A. Hudon Thibeault, L. Laurent, S. Vo Duy, S. Sauvé, P. Caron, C. Guillemette, J.T. Sanderson, C. Vaillancourt, Fluoxetine and its active metabolite norfluoxetine disrupt estrogen synthesis in a co-culture model of the fetoplacental unit, *Mol. Cell. Endocrinol.* 442 (2017) 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.11.021>.
- [75] T. Klempan, A.A. Hudon-Thibeault, T. Oufkir, C. Vaillancourt, J.T. Sanderson, Stimulation of serotonergic 5-HT_{2A} receptor signaling increases placental aromatase (CYP19) activity and expression in BeWo and JEG-3 human choriocarcinoma cells, *Placenta.* 32 (2011) 651–656. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.06.003>.

- [76] M. Montagnana, T. Trenti, R. Aloe, G. Cervellin, G. Lippi, Human chorionic gonadotropin in pregnancy diagnostics, *Clin. Chim. Acta.* 412 (2011).
- [77] L.A. Cole, Biological functions of hCG and hCG-related molecules, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8 (2010) 1–14. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-102>.
- [78] B.I. Tarnowski, D.A. Sens, J.H. Nicholson, D.J. Hazen-Martin, A.J. Garvin, M.A. Sens, Automatic quantitation of cell growth and determination of mitotic index using dapi nuclear staining, *Fetal Pediatr. Pathol.* 13 (1993) 249–265. <https://doi.org/10.3109/15513819309048211>.
- [79] I. Assanga, L. Lujân, Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities, *Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res.* 4 (2013) 60–70. <https://doi.org/10.5897/ijbmr2013.0154>.
- [80] R.I. Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5th ed., 2010. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(85\)90082-1](https://doi.org/10.1016/0278-6915(85)90082-1).
- [81] H. Jung, S.Y. Wang, I.W. Yang, D.W. Hsueh, W.J. Yang, T.H. Wang, H.S. Wang, Detection and treatment of mycoplasma contamination in cultured cells, *Chang Gung Med. J.* 26 (2003) 250–258.
- [82] L. Nikfarjam, P. Farzaneh, Prevention and detection of mycoplasma contamination in cell culture, *Cell J.* 13 (2012) 203–212.
- [83] A.A. O. Tokur, *In Vitro Sitotoksisite Testleri*, 6 (2017) 112–118.
- [84] G. Sittampalam, N. Coussens, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, B. Bejcek, M. Glicksman, J. Inglese, P. Iversen, J. Mcgee, O. Mcmanus, L. Minor, A. Napper, J.M. Peltier, T. Riss, O. Trask, J. Weidner, *Assay Guidance Manual*, in: *Assay Guid. Man.*, 2016: pp. 275–335. <https://doi.org/PMID:22553881>.
- [85] E. Kim, W.B. Jeon, S. Kim, S.K. Lee, Decrease of reactive oxygen species-related biomarkers in the tissue-mimic 3D spheroid culture of human lung cells exposed to zinc oxide nanoparticles, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14 (2014) 3356–3365. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8257>.
- [86] S. Kessel, S. Cribbes, O. Déry, D. Kuksin, E. Sincoff, J. Qiu, L.L.Y. Chan, High-Throughput 3D Tumor Spheroid Screening Method for Cancer Drug Discovery Using Celigo Image Cytometry, *SLAS Technol.* 22 (2017) 454–465. <https://doi.org/10.1177/2211068216652846>.

- [87] G-Biosciences, Geno Technology Inc., USA, (n.d). https://www.gbiosciences.com/Bioassays/Cell_Health_Assay/Cell-Toxicity-Proliferation-Assays/Calcein_AM_Cell_Viability_Assay (accessed May 25, 2021).
- [88] C. Brana, C. Benham, Sundstrom, A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry, *Brain Res. Protoc.* 10 (2002) 109–114.
- [89] B. Srinivasan, A.R. Kolli, M.B. Esch, H.E. Abaci, M.L. Shuler, J.J. Hickman, TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems, *J. Lab. Autom.* 20 (2015) 107–126. <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>.
- [90] W.W. Minuth, L. Denk, *Advanced culture experiments with adherent cells: From single cells to specialized tissues in perfusion culture*, 2011.
- [91] S. Chen, R. Einspanier, J. Schoen, Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports, *Histochem. Cell Biol.* 144 (2015) 509–515. <https://doi.org/10.1007/s00418-015-1351-1>.
- [92] B.E. Dewi, T. Takasaki, I. Kurane, In vitro assessment of human endothelial cell permeability: Effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection, *J. Virol. Methods.* 121 (2004) 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.06.013>.
- [93] S. Joshi, D. Yu, *Immunohistochemical Staining Methods*, Fifty, Dako, North america, Carpinteria, California, 2009. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00008-4>.
- [94] M. Key, R. J. Paul, S. Jennifer, G. L. Kumar, N. K. Kristensen, W. Lars, *Immunohistochemical Staining Methods*, Sixth, Dako, Denmark, 2013. https://doi.org/10.1007/978-3-030-00548-1_4.
- [95] S. Hosseini, P. Vázquez-Villegas, M. Rito-Palomares, S.O. Martinez-Chapa, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) From A to Z*, Second, Springer Nature, Monterrey, Mexico, 2018. <http://www.springer.com/series/11910>.
- [96] R.M. Lequin, Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Clin. Chem.* 51 (2005) 2415–2418.

- <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>.
- [97] S. Aydin, A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA, *Peptides*. 72 (2015) 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>.
- [98] P.J. Tighe, R.R. Ryder, I. Todd, L.C. Fairclough, ELISA in the multiplex era: Potentials and pitfalls, *Proteomics - Clin. Appl.* 9 (2015) 406–422. <https://doi.org/10.1002/prca.201400130>.
- [99] M. Yalınayak Çırak, Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (Elisa) Sistemleri, *T Klin Tıp Bilim.* 19 (1999) 242–248.
- [100] G. Terzioğlu, A.Ü. Keskin, G.Y. Demirel, Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması, *Turkish J. Immunol.* 1 (2013) 74–89. <https://doi.org/10.5606/tji.2013.267>.
- [101] W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby, Glutathione S-Transferases, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 7130–7139.
- [102] M.K. Wong, E.W. Li, M. Adam, P.R. Selvaganapathy, S. Raha, Establishment of an in vitro placental barrier model cultured under physiologically relevant oxygen levels, *Mol. Hum. Reprod.* 26 (2020) 353–365. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa018>.
- [103] L. Aengenheister, K. Keevend, C. Muoth, R. Schönenberger, L. Diener, P. Wick, T. Buerki-Thurnherr, An advanced human in vitro co-culture model for translocation studies across the placental barrier, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23410-6>.
- [104] R. Levkovitz, U. Zaretsky, A.J. Jaffa, M. Hod, D. Elad, In vitro simulation of placental transport: Part II. Glucose transfer across the placental barrier model, *Placenta*. 34 (2013) 708–715. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.05.006>.
- [105] R. Levkovitz, U. Zaretsky, Z. Gordon, A.J. Jaffa, D. Elad, In vitro simulation of placental transport: Part I. Biological model of the placental barrier, *Placenta*. 34 (2013) 699–707. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.03.014>.
- [106] C. Blundell, Y.S. Yi, L. Ma, E.R. Tess, M.J. Farrell, A. Georgescu, L.M. Aleksunes, D. Huh, Placental Drug Transport-on-a-Chip: A Microengineered In Vitro Model of Transporter-Mediated Drug Efflux in the Human Placental

- Barrier, *Adv. Healthc. Mater.* 7 (2018) 1–9.
<https://doi.org/10.1002/adhm.201700786>.
- [107] X. Huang, L. Jia, Z. Qian, Y. Jia, X. Chen, X. Xu, X. Chang, M. Liu, K. Wang, Diversity in human placental microvascular endothelial cells and macrovascular endothelial cells, *Cytokine*. 111 (2018) 287–294.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.09.009>.
- [108] B.R. Desroches, P. Zhang, B.R. Choi, M.E. King, A.E. Maldonado, W. Li, A. Rago, G. Liu, N. Nath, K.M. Hartmann, B. Yang, G. Koren, J.R. Morgan, U. Mende, Functional scaffold-free 3-D cardiac microtissues: A novel model for the investigation of heart cells, *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 302 (2012) 2031–2042. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00743.2011>.
- [109] M. Talmon, S. Rossi, A. Pastore, C.I. Cattaneo, S. Brunelleschi, L.G. Fresu, Vortioxetine exerts anti-inflammatory and immunomodulatory effects on human monocytes/macrophages, *Br. J. Pharmacol.* 175 (2018) 113–124.
<https://doi.org/10.1111/bph.14074>.
- [110] C. Muoth, A. Wichser, M. Monopoli, M. Correia, N. Ehrlich, K. Loeschner, A. Gallud, M. Kucki, L. Diener, P. Manser, W. Jochum, P. Wick, T. Buerki-Thurnherr, A 3D co-culture microtissue model of the human placenta for nanotoxicity assessment, *R. Soc. Chem.* 8 (2016) 17322–17332.
<https://doi.org/10.1039/c6nr06749b>.
- [111] A.A. Doğan, Ş. Taşdemir, A. Şendemir Ürkmez, COMPARISON OF MICROTISSUE FORMING CAPACITY OF SH- SY5Y, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ FEN VE MÜHENDİSLİK DERGİSİ. 18 (2016) 40–48.
- [112] W.L. Dissanayaka, L. Zhu, K.M. Hargreaves, L. Jin, C. Zhang, Scaffold-free prevascularized microtissue spheroids for pulp regeneration, *J. Dent. Res.* 93 (2014) 1296–1303. <https://doi.org/10.1177/0022034514550040>.
- [113] S. Przyborski, *Technology Platforms for 3D Cell Culture*, First, UK, 2017.
<https://doi.org/10.1002/9781118851647>.
- [114] M. Heiss, M. Hellström, M. Kalén, T. May, H. Weber, M. Hecker, H.G. Augustin, T. Korff, Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study

- angiogenesis in vitro, *FASEB J.* 29 (2015) 3076–3084.
<https://doi.org/10.1096/fj.14-267633>.
- [115] S.E. Segerer, C. Bartmann, S. Kaspar, N. Müller, M. Kapp, E. Butt, U. Kämmerer, The cytoskeletal protein LASP-1 differentially regulates migratory activities of choriocarcinoma cells, *Arch. Gynecol. Obstet.* 293 (2016) 407–414.
<https://doi.org/10.1007/s00404-015-3830-y>.
- [116] T.M. Butler, P.A. Elustondo, G.E. Hannigan, D.J. MacPhee, Integrin-linked kinase can facilitate syncytialization and hormonal differentiation of the human trophoblast-derived BeWo cell line, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7 (2009) 1–14.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-51>.
- [117] M.K. Wong, S.A. Shawky, A. Aryasomayajula, M.A. Green, T. Ewart, P. Ravi Selvaganapathy, S. Raha, Extracellular matrix surface regulates self-assembly of three-dimensional placental trophoblast spheroids, *PLoS One.* 13 (2018) 1–18.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199632>.
- [118] E. Drwal, A. Rak, E. Gregoraszczuk, Co-culture of JEG-3, BeWo and syncBeWo cell lines with adrenal H295R cell line: an alternative model for examining endocrine and metabolic properties of the fetoplacental unit, *Cytotechnology.* 70 (2018) 285–297. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0142-z>.
- [119] S.J. Yaffe, *A Reference Guide to Fetal and Neonatal Risk Drugs in Pregnancy and Lactation*, Tenth Edit, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 1998.
http://gynecology.sbm.ac.ir/uploads/4_5933795622082576774.pdf.
- [120] M. Roemer, Emily J., West, Kesley L., Northrup, Jessica B., Iverson, Jana, Cell Mimicking Microparticles Influence the Organization, Growth, and Mechanophenotype of Stem Cell Spheroids Nicholas, *Physiol. Behav.* 46 (2018) 1146–1159. <https://doi.org/10.1007/s10439-018-2028-4.Cell>.