

**GELİŞTİRİLEN ÜÇ BOYUTLU BÖBREK PROKSİMAL
TÜBÜL MODELİNDE NEFROTOKSİSİTE
DEĞERLENDİRMESİ**

**EVALUATION OF NEPHROTOXICITY IN THE
DEVELOPED THREE-DIMENSIONAL KIDNEY
PROXIMAL TUBULE MODEL**

NAZLIHAN GÜRBÜZ

PROF. DR PETEK KORKUSUZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

GELİŞTİRİLEN ÜÇ BOYUTLU BÖBREK PROKSİMAL TÜBÜL MODELİNDE NEFROTOKSİSİTE DEĞERLENDİRMESİ

Nazlıhan GÜRBÜZ

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

Ocak 2023, 70 sayfa

Akut böbrek hasarı her yıl dünyada 2 milyon insanın ölümüne neden olan yüksek morbidite ve mortaliteye sahip önemli bir sağlık sorunudur. Akut böbrek hasarının önemli nedenlerinden birisi de ilaçlara bağlı nefrotoksisitedir. Organ transplantasyonu sonrası tedavide bağışıklık baskılayıcı olarak kullanılan takrolimusun nefrotoksik etkisi klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Primer olarak proksimal tübül (PT) epitelini hedefleyen nefrotoksisitenin modellenmesinde iki boyutlu (2B) *in vitro* modeller mikroçevre, polarite, hücre-hücre etkileşimleri ve tübüler akışı sağlayamamakta bu nedenle üç boyutlu (3B) *ex vivo* modellere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışmasında takrolimusun insan proksimal tübül epitel hücreleri (PTEH) üzerindeki gerçek zamanlı antiproliferatif dozunun belirlenip, ilacın etkilerinin *ex vivo* koşullarda biyomühendislik yaklaşımlarıyla geliştirilen 3B-PT modeli üzerinde yapısal ve fonksiyonel olarak

değerlendirilebileceği varsayılmıştır. Takrolimusun antiproliferatif etki dozunun (ED50) belirlenmesi için insan PTEH'e (HK-2) 1×10^{-1} , 1, 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda takrolimus uygulanıp gerçek zamanlı impedans temelli proliferasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Üç boyutlu PT modelinin oluşturulması için 3B baskı teknikleri ile bir platform üretilmiş, perfüze edilebilen bir kanal oluşturulmuş ve kanal içine HK-2 hücrelerinin ekimi yapılmıştır. Ayrıca ticari mikroakışkan kültür platformunda 3B-PT modeli oluşturulmuş, HK-2 hücrelerinin ekimi yapıldıktan sonra aralıklı salınım cihazı ile perfüzyon sağlanmıştır. Mikroakışkan kültür platformunda oluşturulan 3B-PT modelinde kontrol ve takrolimus verilen deney gruplarında ZO-1 ve asetillenmiş α tübülün immün işaretlemesi, hücre canlılığı, albümin geri alım işlevi ve bariyer bütünlüğü karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Gerçek zamanlı proliferasyon analizinin sonucunda takrolimusun HK-2 hücrelerindeki ED50'si 48. saatte $44.69 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Üç boyutlu baskı ile üretilen platformda kanal tasarlanmış, oluşturulmuş ve perfüzyon sağlanmıştır ancak HK-2 hücreleri kanal içinde tutunma eğilimi göstermemiştir. Mikroakışkan kültür platformunda ise perfüzyonun sağlandığı 3B-PT modeli başarıyla oluşturulmuştur. Takrolimus statik koşullarda ve 3B-PT modelinde hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır. Mikroakışkan kültür platformunda oluşturulan 3B-PT modelinde takrolimusun kontrol grubuna göre ZO-1 ve asetillenmiş α tübülün immün işaretlemesini azaltarak 3B-PT yapısını bozduğu gösterilmiştir. Mikroakışkan kültür platformunda oluşturulan 3B-PT modelinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında takrolimusun albümin geri alım işlevini bozduğu gösterilmektedir. Takrolimus kontrol grubuna göre PT epitelinin bariyer bütünlüğünü bozarak 155 kDa dekstran molekülüne karşı geçirgenliği 2.3 kat ve 20 kDa dekstran molekülüne karşı geçirgenliği 1.4 kat artırmıştır. Sonuç olarak takrolimusun HK-2 hücrelerindeki gerçek zamanlı ED50'si hesaplanmış, mikroakışkan platformunda 3B-PT modeli oluşturulmuş ve takrolimusun 3B-PT üzerindeki etkisi *ex vivo* koşullarda yapısal ve fonksiyonel olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Böbrek, Proksimal Tübül, Üç Boyutlu Kültür, Nefrotoksisite

ABSTRACT

EVALUATION OF NEPHROTOXICITY IN THE DEVELOPED THREE-DIMENSIONAL KIDNEY PROXIMAL TUBULE MODEL

Nazlıhan GÜRBÜZ

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

January 2023, 70 pages

Acute kidney injury (AKI) is an important health problem causes the death of 2 million people worldwide every year with high morbidity and mortality. One of the important causes of AKI is drug-induced nephrotoxicity. After organ transplantation, nephrotoxic effect of tacrolimus, which is used as an immunosuppressant treatment, limits its clinical use. In modeling nephrotoxicity that primarily targets the proximal tubule (PT) epithelium, two-dimensional *in vitro* models can't provide microenvironment, polarity, cell-cell interactions and tubular flow, therefore three-dimensional (3D) *ex vivo* models are needed. It was assumed that the real-time antiproliferative dose of tacrolimus on human proximal tubule epithelial cells (PTEC) can be determined and the effects of the drug could be evaluated structurally and functionally on the 3D-PT model developed with bioengineering approaches in *ex vivo* conditions. To determine the

antiproliferative effective dose (ED50), 1×10^{-1} , 1, 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of tacrolimus were applied to human PTEC's (HK-2) and evaluated by real-time impedance-based proliferation analysis. In order to obtain the 3D-PT model, a platform was produced with 3D printing techniques while a perfusable channel was made and HK-2 cells were cultivated into the channel. Additionally, a 3D-PT model was created on a commercial microfluidic culture platform, and perfusion provided with an intermittent release device after HK-2 cells were cultivated. In the control and tacrolimus-treated experimental groups, ZO-1 and acetylated- α -tubulin immunolabeling, cell viability, albumin reuptake function and barrier integrity were evaluated comparatively in 3D-PT model which created on the microfluidic culture platform. As a result of real-time proliferation analysis, the ED50 of tacrolimus in HK-2 cells was $44.69 \mu\text{g/ml}$ at 48th hour. The canal designed, created and perfusion was achieved on the platform produced by 3D printing, but HK-2 cells didn't show any attachment tendency in the canal. In the microfluidic culture platform, a 3D-PT model with perfusion was successfully created. Tacrolimus significantly decreased cell viability in static conditions, 3D-PT model. When the control and tacrolimus-treated experimental groups were compared in the 3D-PT model on the microfluidic culture platform, it was shown that tacrolimus disrupted the 3D-PT structure by reducing ZO-1 and acetylated- α -tubulin immunolabeling. Compared with the control group in the 3D-PT model, tacrolimus impaired the albumin reuptake function. Tacrolimus increased the permeability by disrupted the barrier integrity of PT epithelium, to 155 kDa dextran molecule 2.3-fold and to 20 kDa dextran molecule 1.4-fold compared to the control group. As a result, the real-time ED50 of tacrolimus in HK-2 cells was calculated and a 3D-PT model was created in the perfusable microfluidic plate, and the effect of tacrolimus on 3D-PT was evaluated structurally and functionally under *ex vivo* conditions.

Keywords: Kidney, Proximal Tubule, Three Dimensional Culture, Nephrotoxicity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince katkılarını esirgemeyen, öğretici kimliği ile yoluma ışık tutan tez danışmanım sayın Prof. Dr. Petek Korkusuz'a,

Tez projesi kapsamında laboratuvar desteği sağlayıp, sorunlara çözüm bulmaya odaklanan yaklaşımı ile Prof. Dr. Pınar Yılgör Huri'ye,

Bakış açıları, bilgi birikimleri ve deneyimleri ile yol gösteren, birlikte çalışma fırsatı bulduğum için kendimi şanslı hissettiğim kıymetli Uzm. Dr. Sefa Burak Çam ve Dr. Eda Çiftci' ye,

Tez projesi kapsamında üç boyutlu baskı çalışmalarındaki desteği için Fahriye Şeyda Gökyer'e,

Yardımlarını esirgemeyen Merve Gizer, Selin Önen ve Özge Boyacıoğlu'na,

Laboratuvarda birlikte çalışmaktan keyif aldığım arkadaşım Başak Işıl Zorba'ya,

Uzun yıllardır pek çok paylaşımımız olan, beni her zaman destekleyen ve inanan değerli arkadaşım Oya Elif Daldal'a,

Her kararında beni cesaretlendiren ve her zaman sırtımı yaslayabileceğimi bildiğim sevgili babam Rasim Gürbüz'e, güçlü duruşu ve neşesine hayran olup varlığıyla huzur bulduğum sevgi dolu biricik annem Hatice Gürbüz'e, hayatımın her parçasında büyük rolü olan en büyük destekçim kıymetli ablam Gamze Nur Yüksel'e, hayatın bize minik bir hediyesi olan Dila Yüksel'e,

Son anına dek hep yanımda olan, her daim kalbimde yaşayacak İsa Dönergüneş'e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2021-19632 numaralı Yüksek Lisans Tez Destek Projesi ile desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim süresince TÜBİTAK (Proje No:218S421, Proje No: 321S058) tarafından sağlanan burs desteği için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Akut Böbrek Hasarı.....	4
2.2. İlaçlara Bağlı Akut Böbrek Hasarı	5
2.3. Takrolimus.....	5
2.4. Böbreğin Yapısı; Nefron ve Proksimal Tübüller.....	7
2.5. Üç Boyutlu Böbrek Kültür Sistemleri	10
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	13
Deney Tasarımı	13
3.1. Gerçek Zamanlı Olarak Takrolimusun PTEH'deki Submaksimal Antiproliferatif Etkili Dozunun Belirlenmesi.....	15
3.1.1. İnsan Kaynaklı PTEH'in Elde Edilmesi ve Çoğaltılması.....	15
3.1.2. İmpedans Temelli Gerçek Zamanlı Proliferasyon Analizi ile Takrolimusun Submaksimal Doz Penceresinin Belirlenmesi	15
3.2. Üç Boyutlu PT Kültür Platformlarının Oluşturulması ve Optimizasyonu .	16
3.2.1. Üç Boyutlu Baskı ile PT Modelinin Tasarımı, Üretimi, Optimizasyonu	16
3.2.1.1. Üç Boyutlu Baskı ile Kalıbın Tasarımı ve Üretimi	16
3.2.1.2. Ekstraselüler Matriksin Optimizasyonu	18

3.2.1.3. Perfüzyon Kanalının Optimizasyonu.....	20
3.3.1.4. Seçilen Ekstraselüler Matriksin Biyomekanik Analizi	21
3.2.2. Üç Boyutlu PT Mikroakışkan Kültür Platformunda Kanalın Oluşturulması.....	22
3. 3. Üç Boyutlu PT Modelinde Takrolimus Kaynaklı Akut Hasarın Oluşturulması ve Değerlendirilmesi	24
3.3.1. Perfüzyon Kanalına HK-2 Hücrelerinin Ekimi ile 3B-PT Modellerinin Oluşturulması.....	24
3.3.2. HK-2 Hücre Kültür Platformlarında Takrolimus Nefrotoksisite Modelinin Oluşturulması	24
3.3.3. Takrolimus Nefrotoksisitesinin 2B ve 3B Platformlarda Yapısal ve Fonksiyonel Olarak Değerlendirilmesi	25
3.3.3.1. Yapısal Değerlendirme	25
<i>Lateral Sıkı Bağlantı Birimleri (ZO-1) ve Hücre İskeleti Bileşenlerinin (Asetillenmiş α tübülün) İmmün İşaretleme ile Değerlendirilmesi.....</i>	25
3.3.3.2. Fonksiyonel Değerlendirme.....	26
<i>HK-2 Hücre Canlılığının WST-1 Tekniği ile Değerlendirilmesi</i>	26
<i>Albüminin Geri Alımının Kolorimetrik Olarak Değerlendirilmesi.....</i>	26
<i>Dekstran Moleküllerinin Geçirgenlik İndeksleri ile Epitel Bariyer Bütünlüğünün Değerlendirilmesi.....</i>	27
3.4. Verilerin İstatistiksel Analizi	28
4. SONUÇLAR.....	29
4.1. Gerçek Zamanlı Olarak Takrolimusun PTEH'deki Submaksimal Antiproliferatif Etkili Dozunun Belirlenmesi	29
4.1.1. İnsan Kaynaklı PTEH'in Elde Edilmesi ve Çoğaltılması.....	29
4.1.2. İmpedans Temelli Gerçek Zamanlı Proliferasyon Analizi ile Takrolimusun Submaksimal Doz Penceresinin Belirlenmesi.....	29
4.2. Üç Boyutlu PT Kültür Platformlarının Oluşturulması ve Optimizasyonu .33	
4.2.1. Üç Boyutlu Baskı ile PT Modelinin Tasarımı, Üretimi, Optimizasyonu33	
4.2.1.1. Üç Boyutlu Baskı ile Kalıbın Tasarımı ve Üretimi	33
4.2.1.2. Ekstraselüler Matriksin Optimizasyonu.....	33
4.2.1.3. Perfüzyon Kanalının Optimizasyonu.....	35

4.2.1.4. Seçilen Ekstraselüler Matriksin Biyomekanik Analizi.....	36
4.2.2. Üç Boyutlu PT Mikroakışkan Kültür Platformunda Kanalın Oluşturulması	38
4.3. Üç Boyutlu PT Modelinde Takrolimus Kaynaklı Akut Hasarın Oluşturulması ve Değerlendirilmesi.....	39
4.3.1. Perfüzyon Kanalına HK-2 Hücrelerinin Ekimi ile 3B-PT Modellerinin Oluşturulması	39
4.3.2. HK-2 Hücre Kültür Platformlarında Takrolimus Nefrotoksisite Modelinin Oluşturulması.....	41
4.3.3. Takrolimus Nefrotoksisitesinin 2B ve 3B Mikroakışkan Platformunda Yapısal ve Fonksiyonel Olarak Değerlendirilmesi.....	41
4.3.3.1. Yapısal Değerlendirme	41
<i>Lateral Sıkı Bağlantı Birimleri (ZO-1) ve Hücre İskeleti Bileşenlerinin (Asetillenmiş α tübülün) İmmün İşaretleme ile Değerlendirilmesi</i>	41
4.3.3.2. Fonksiyonel Değerlendirme.....	45
<i>HK-2 Hücre Canlılığının WST-1 Tekniği ile Değerlendirilmesi</i>	45
<i>Albüminin Geri Alımının Kolorimetrik Olarak Değerlendirilmesi</i>	46
<i>Dekstran Moleküllerinin Geçirgenlik İndeksleri ile Epitel Bariyer Bütünlüğünün Değerlendirilmesi</i>	46
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ.....	56
7. KAYNAKLAR.....	58
EKLER	67
EK 1 – Tezden Türetilmiş Bildiriler.....	67
EK 2 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	68
ÖZGEÇMİŞ.....	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Çalışmanın varsayımı şematize edilmiştir.....	3
Şekil 2.1.	Akut böbrek hasarının prerenal, renal ve postrenal etiyolojik faktörleri sınıflandırılmıştır.	4
Şekil 2.2.	Böbreğin işlevsel birimi: Nefron.	8
Şekil 3.1.	Tez çalışmasının hedeflerine göre planlanan iş akış şeması.	14
Şekil 3.2.	Üç boyutlu yazıcı ile üretilen platformun üretim akış şeması.	17
Şekil 3.3.	Mikroakışkan platformunun makroskopik ve şematik görüntüleri ..	23
Şekil 3.4.	Permeabilite katsayısı formülü.	27
Şekil 4.1.	HK-2 hücrelerine ait mikrograflar.....	29
Şekil 4.2.	Takrolimusun HK-2 hücrelerindeki antiproliferatif etkisi gerçek zamanlı ve impedans temelli olarak saptanmıştır.	32
Şekil 4.3.	Üç boyutlu yazıcı ile üretilen platform.....	33
Şekil 4.4.	Ekstraselüler matriks üzerine statik koşullarda HK-2 hücrelerinin ekimi.	34
Şekil 4.5.	HK-2 hücrelerinin %5 jelatin metakrilatın fibronektin ile kaplandığı statik koşullarda 48. ve 72. saate ait mikrografları.	35
Şekil 4.6.	Perfüzyon kanalının modeli (A, C, E, G) ve kanalın ESM üzerine 3B baskısı (B, D, F, H).	35
Şekil 4.7.	Ekstraselüler matriksin biyomekanik analizi..	37
Şekil 4.8.	Değişen konsantrasyonlarda jelatin-fibrinojen karışımlarına statik koşullarda HK-2 hücrelerinin ekiminden 24 saat sonraki mikrografları	38
Şekil 4.9.	Perfüzyon kanalına HK-2 hücrelerinin ekimi ile 3B-PT modellerinin oluşturulması.....	40
Şekil 4.10.	Statik 2B kültür platformunda ZO-1 ve asetillenmiş α tübülün immün işaretleme sonuçları.	43
Şekil 4.11.	Mikroakışkan platformunda ZO-1 ve asetillenmiş α tübülün immün işaretleme sonuçları.	44

Şekil 4.12.	WST-1 ile takrolimusun HK-2 hücrelerinin canlılığına etkisini gösteren saçılım grafiği.	45
Şekil 4.13.	Takrolimusun mikroakışkan platformunda HK-2 hücrelerinin albümin geri alımına etkisi	46
Şekil 4.14.	Dekstran moleküllerinin geçirgenlik indeksleri ile PT epitel bariyer bütünlüğünün değerlendirilmesi.....	47

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1.	Takrolimusun böbrekteki akut toksik etkilerini değerlendiren çalışmalar sunulmuştur.....	7
Tablo 2.2.	Mikroakışkan platformları ve 3B baskı teknikleri ile oluşturulan PT modellerinde sorun temelli deney tasarımları özetlenmiştir.	11
Tablo 3.1.	İş paketlerine ait bağımlı ve bağımsız değişkenler gösterilmiştir...	13
Tablo 3.2.	Statik şartlarda PTEH'in optimum koşullarda yaşayabileceği malzemenin belirlenebilmesi için oluşturulan deney grupları gösterilmiştir.....	20
Tablo 3.3.	Biyomekanik özellikleri karşılaştırılacak olan ESM bileşenlerinin oranları gösterilmiştir.	21

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
dk	Dakika
g	Gram
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
N	Newton
ng	nanogram
P_{app}	Permeabilite katsayısı
U	Unit
v/v	Hacim/Hacim
w/v	Kütle/Hacim

Kısaltmalar

2B	İki Boyutlu
3B	Üç Boyutlu
AQP1	Aquaporin 1

ci-PTEC	<i>Conditionally immortalized proximal tubule epithelial cells</i>
DAB	<i>3,3'-Diaminobenzidin</i>
DMEM F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DTFY	Düzeltilmiş Toplam Floresan Yoğunluğu
ESM	Ekstraselüler Matriks
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HK-2	<i>Human Kidney -2</i>
ED50	Etkili Doz 50
LLC-PK1	Epithelial-like pig kidney cell line
MRP2	Multidrug resistance protein
MRP4	Multidrug resistance protein
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
P-gp	<i>P-glycoprotein</i>
Pen-Strep	<i>Penicillin-Streptomycin</i>
PT	Proksimal Tübül
PTEH	Proksimal Tübül Epitel Hücreleri
RPTEC	<i>Renal Proximal Tubular Cell</i>
TG	Transglutaminaz
OAT1	Organik Anyon Taşıyıcı-1
OAT3	Organik Anyon Taşıyıcı-3
OCT2	Organik Katyon Taşıyıcı-2
uPKH	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre

1. GİRİŞ

Akut böbrek hasarı (ABH), böbrek fonksiyonunun hızlı ve ani bozulması ile tanımlanan, her yıl dünyada ortalama 13.3 milyon insanın etkilendiği ve yılda 1.7 ila 2 milyon insanın ölümüne neden olan yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilendirilen önemli bir sağlık sorunudur [1-4]. Prerenal, renal ve postrenal nedenlerle ortaya çıkan ABH olgularının büyük çoğunluğunu prerenal ve renal nedenler oluşturmaktadır [1, 5]. Renal nedenlerin ise %20 ila 30'undan ilaçlara bağlı nefrotoksisite sorumludur [6].

Takrolimus, klinikte organ transplantasyonu sonrası allogreft reddini önleyici tedavi rejimlerinde yaygın olarak kullanılan kalsinörin inhibitörü bir ilaçtır [7-9] ve allogreft reddini büyük ölçüde önlemekle birlikte ABH oluşturma riski nedeniyle klinikteki kullanımını kısıtlıdır [10]. Protokollerde terapötik doz verildikten sonra hastaların durumu takip edilip, hastanın ilaca yanıtına göre doz düzenlemeleri yapılabilmesine rağmen nefrotoksisite yan etkisi gösterdiği vakalar bildirilmiştir [9, 11]. Nefrotoksisite özellikle böbreğin fonksiyonel birimi olan nefronlar üzerinden proksimal tübül (PT) hasarıyla gitmektedir [12]. Bu nedenle takrolimusun böbrek PT epitelindeki öncelikli tutulumunun araştırılması gerekmektedir.

Böbreğin proksimal tübülleri, nefronun süzülme ve salgılama işlevini yerine getiren ilk segmenti olup ultrafiltratın toksik içeriğine maruz kalan ilk kısmı olması nedeniyle ilaca bağlı ABH'nin ilk hücresel hedefidir [13]. Statik iki boyutlu (2B) hücre kültürü yöntemlerinde proksimal tübül epitel hücreleri (PTEH) kutuplaşamadıkları, lümendeki akış ve kayma gerilimi gibi fizyolojik koşullar oluşmadığı için toksik hasarı modellemede yetersiz kalır [14, 15]. *İn vivo* hayvan modellerinde üç boyutlu (3B) tübül yapıları sağlanmakla birlikte türe özgü farklılıklar ve etik sınırlamalar deney çıktılarının insana uygulanması ve kliniğe aktarımı kısıtlayan faktörlerdir [16, 17].

Üç boyutlu *ex vivo* kültür platformları, PTEH'in polaritesi ve tübülün fizyolojik koşullarını oldukça iyi modelleyebilen, hücrelerin ekstraselüler matriks (ESM) ile

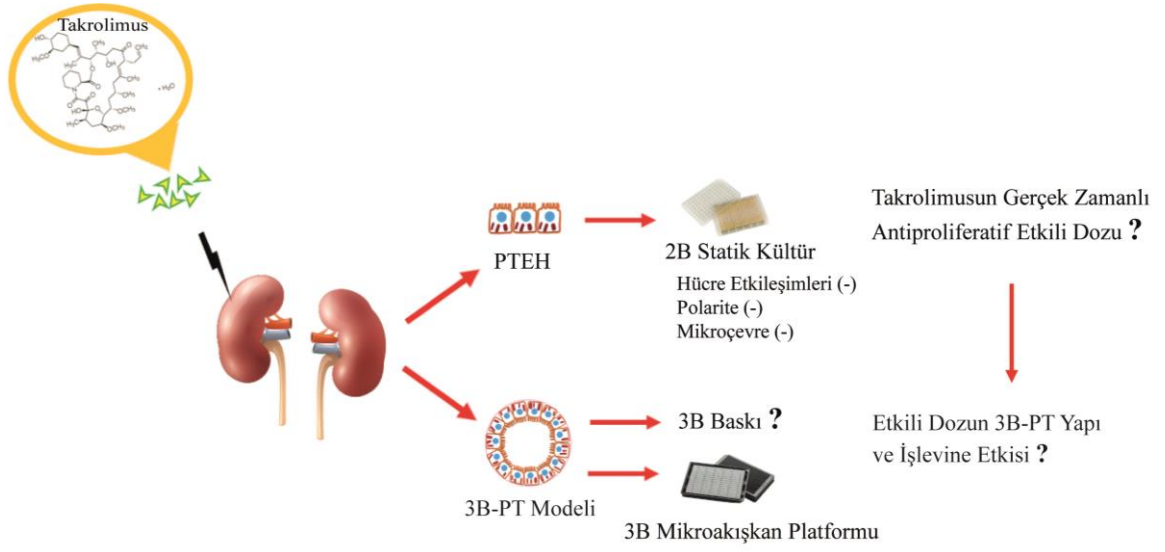
temasının sağlanabildiği biyomühendislik tasarımlarını içerir [18-20]. Bu tasarımlar arasında mikrokanalları bulunan, perfüzyonun aralıklı salınım cihazları ile bir peristaltik pompaya ihtiyaç duyulmaksızın sağlanabildiği ve tek plaka üzerinde çok sayıda örnek incelemeye olanak tanıyan ticari 3B mikroakışkan platformlar standardize bir düzenek sağlamaktadır [21-23]. Ticari mikroakışkan düzeneklerin yanında daha yeni bir yaklaşım olan 3B baskı yöntemleri kullanılarak üretilen ve perfüzyonun peristaltik pompa ve peristaltik borular aracılığıyla sağlandığı 3B-PT modelleri oluşturulmuştur [24-27]. Bu tasarımlar mikrofizyolojik koşulları daha iyi yansıtabilmesi nedeniyle nefrotoksisite çalışmalarında PT hasarını değerlendirmeye olanak tanımaktadır.

Takrolimusa bağlı nefrotoksisitenin neden olduğu PT hasarının preventif ve teranöстик yaklaşımlarla öngörülebilmesi için hücre hasarının yapısal ve fonksiyonel olarak değerlendirildiği 3B *ex vivo* kültür sistemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada; takrolimusun insan PTEH'de gerçek zamanlı antiproliferatif dozunun belirlenip, biyomühendislik yaklaşımlarıyla geliştirilen, mikroakışın sağlandığı, 3B-PT kültür platformunun geliştirilmesi, etkili dozda takrolimusun 3B-PT üzerindeki yapısal ve fonksiyonel etkilerinin *ex vivo* koşullarda değerlendirilebileceği varsayılmıştır.

Bu doğrultuda çalışmanın hedefleri;

1. Takrolimusun insan PTEH'deki gerçek zamanlı antiproliferatif etki dozunun belirlenmesi
2. Biyomühendislik yaklaşımlarıyla 3B-PT kültür platformunun oluşturulması ve optimizasyonu
3. Üç boyutlu PT modelinde takrolimus kaynaklı akut hasarın oluşturulması ve test edilmesidir.

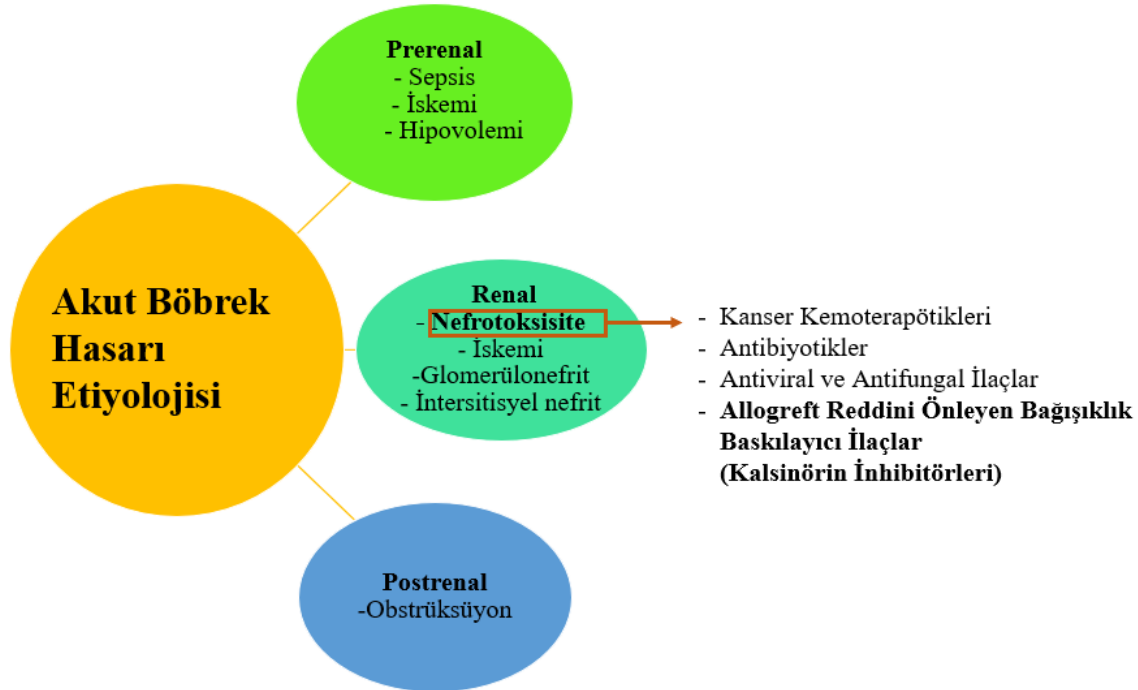


Şekil 1.1. Çalışmanın varsayımı şematize edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akut Böbrek Hasarı

Akut böbrek hasarı, yılda 13.3 milyon insanın etkilendiği, böbrek fonksiyonunun hızlı ve ani bir şekilde bozulması ile tanımlanan, tedavi edilmediği takdirde kronikleşme sürecine geçip kalıcı yetmezlik ile sonuçlandığından yüksek mortalite ve morbidite ile ilişkili küresel bir sağlık sorunudur [2, 3, 28-33]. Her yıl yaklaşık 2 milyon insanın ölümüne neden olan ABH, böbreğin kanlanmasını etkileyen prerenal nedenler, süzülmeyle etkileyen durumlar gibi renal nedenler ve obstrüksiyon gibi postrenal nedenlerle (Şekil 2.1) ortaya çıkabilir [1, 5, 32]. Dünya çapında böbrek hastalarının bakımını ve sonuçlarını iyileştirme misyonuna sahip, bağımsız küresel bir kuruluş olan KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) tarafından yayımlanan kılavuzda ABH'nin renal nedenleri arasında yer alan nefrotoksisitenin tüm ABH olgularının %20 ila 30'undan sorumlu olduğu bildirilmiştir [34].



Şekil 2.1. Akut böbrek hasarının prerenal, renal ve postrenal etiyolojik faktörleri sınıflandırılmıştır.

Organ hasarına neden olan kanser gibi hastalıkların ve transplantasyon ihtiyacının artması sebebiyle ilaç kaynaklı nefrotoksisite ABH için oldukça önemlidir [35-40].

Özellikle farmakoloji alanı için yeni ilaçların geliştirilmesinde böbrekteki toksisitesinin değerlendirilmesi önemli bir parametredir çünkü ilaç nefrotoksitesi doz ve maruz kalma süresine bağlı değişiklik gösterirken, yaşlı hastalarda risk daha yüksektir [6, 41, 42]. Bu nedenlerden dolayı ilaçlara bağlı ABH'nin değerlendirilmesi gerekmektedir.

2.2. İlaçlara Bağlı Akut Böbrek Hasarı

İlaça bağlı ABH, hastaneye yatırılan tüm hastaların %19-26'sını oluşturmaktadır olup ABH'nin majör nedenlerindedir [36, 43, 44]. Klinikte yaygın olarak kullanılan ilaçların çoğu böbreklerin yapısal ve fonksiyonel birimi olan nefronlardaki hasarını ifade eden nefrotoksiteye yol açmaktadır [13]. Böbrek hasarı sisplatin ve doksorubisin gibi kanser kemoterapötikleri [45, 46], gentamisin ve aminoglikozid gibi antibiyotikler [47, 48], amfoterisin B gibi antifungal ilaçlar [49], tenofovir gibi antiviral ilaçlar [50], siklosporin A ve takrolimus gibi organ transplantasyonu sonrası organ reddini önleyen immün baskılayıcı ilaçlara [51, 52] akut veya kronik maruziyet, metabolizma atık ürünleriyle birlikte ilaç ve toksinlerin vücuttan uzaklaştırılmasını sağlayan böbreklerin yapısal ve fonksiyonel birimi olan nefronların üzerinde oluşturduğu hasardır [53]. Doku ve organ transplantasyonlarının son yıllardaki artışıyla [54] birlikte transplant reddinde kullanılan ilaçlara bağlı ABH önem kazanmaktadır. Kalsinörin inhibitörleri organ transplantasyonu sonrası allogreft reddini önlemek için kullanılan temel ilaçlardır [55, 56]. Bu grupta en sık siklosporin A ve takrolimus uygulanır [57, 58]. Takrolimus ve siklosporin A erken dönemde transplant reddini başarıyla önlemekle birlikte ciddi nefrotoksite ve nörotoksite gibi yan etkilere neden olabilir [56, 59, 60].

2.3. Takrolimus

Takrolimus 1987'de keşfedilen ve 1994 yılında ilk kez karaciğer nakli sonrası kullanım için FDA tarafından onaylanan bir ilaç olup daha sonra böbrek, kalp, akciğer, bağırsak ve kemik iliği nakli sonrası transplant reddini önlemek için tedavi rejiminde kullanılmaya başlanmıştır [40, 55, 61]. Takrolimus allogreft reddini önemli derecede azalttığı için organ transplantasyonu sonrası tedavi protokolünün temel etkili bileşeni olmakla birlikte yaklaşık 30 yıldır klinikte tercih edilmesine karşın nefrotoksite ve nörotoksite etkileri klinik kullanımını kısıtlamaktadır [61, 62]. Siklosporin A ile karşılaştırıldığında hem akut allogreft reddinin hem de uzun dönem allogreft kaybının

engellenmesinde daha etkili olması nedeniyle klinikte tercih edilmektedir [57, 63]. Böbrek transplantlı hastaların uzun vadeli prognozunu değerlendiren meta analizde takrolimusun greft sağkalımını artırmada siklosporin A' ya göre daha başarılı olduğu bildirilmiştir [58]. Diğer yandan takrolimusun biyoyararlanım oranları bireyler arasında %5 ila 90 arasında geniş varyasyon göstermektedir [35]. Bu durum ilacın terapötik penceresini ve dolayısıyla etkinlik ve güvenilirliğini tehdit etmektedir. Takrolimusun bilinen nörotoksik ve nefrotoksik yan etkileri nedeniyle sistemik uygulanabilir güvenli doz penceresi oldukça dardır [64-66]. Değişken biyoyararlanımı ve dar terapötik penceresi takrolimusun klinik uygulamasını önemli ölçüde sınırlamaktadır [67]. Takrolimus alternatifi bağışıklık baskılayıcı ilaçlar piyasaya sürülmüş ancak bu ilaçlar transplant reddini önlemede benzer başarıyı gösterememiştir [40, 56]. Takrolimusun klinikte transplant sonrası tedavi protokollerinde hasta temelli kişiselleştirilmiş platformlarda güvenli ve etkili doz penceresinde uygulanması gerekmektedir. Bu kapsamda ilacın böbrekteki hücresel toksisitesinin öngörülmesi, önlenmesi veya geri çevrilebilmesi için moleküler patogenezin ortaya konduğu preklinik test düzeneklerine ihtiyaç vardır. Böylece klinik uygulamada ABH'nin önlenmesi veya akut dönemde geri çevrilebilmesi mümkün olabilir [9, 10, 68].

Takrolimus nefrotoksitesinin klinikte uygulanmadan önce öngörülmesi ve patogenezinin araştırılması için *ex vivo* biyomühendislik temelli modellerin geliştirilmesi gelecekte nakil hastaları için güvenli tedavi rejimlerinin oluşturulabilmesi açısından önemlidir [59]. Bu bağlamda takrolimusun böbrek PTEH kültürlerinde *in vitro* koşullarda uygulandığı pek çok deneysel araştırma yürütülmüştür. Takrolimusun 24 veya 48 saat süreyle 15-60 µg/ml değişken doz aralığında uyguladığı akut hasar oluşturulan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ilacın PTEH'i apoptoza götürerek hücre canlılığını azalttığını bildirmiştir [61, 69-73].

In vivo sıçan ve fare hayvan modellerinde 2-4 hafta süreyle, 1-3 mg/kg doz aralığında sistemik takrolimus uygulaması yapılmış ve histopatolojik değerlendirme ile ilacın tübüler atrofi, tübüler interstisyel fibrozis, tübüler bazal membranda kalınlaşma ve glomerüler hasara neden olduğu saptanmıştır [71, 72, 74, 75].

Takrolimus nefrotoksisitesi ile ilgili son beş yılda yapılmış *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar Tablo 2.1’ de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Takrolimusun böbrekteki akut toksik etkilerini değerlendiren çalışmalar sunulmuştur.

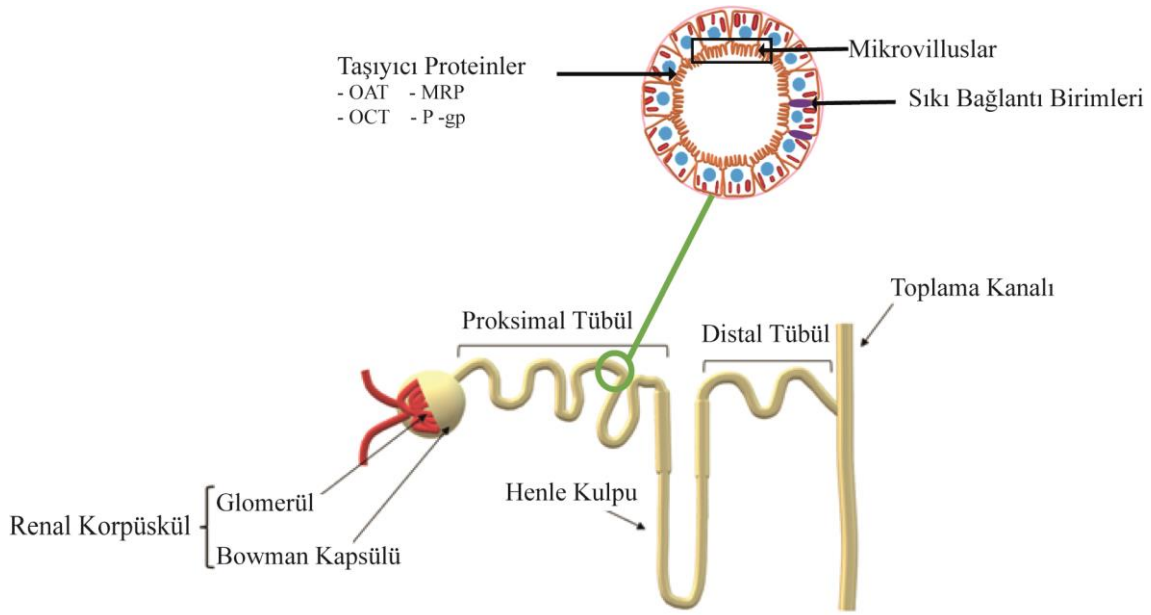
Deney Düzenegi	Hücre Hattı / Deney Modeli	İlacın Doz Aralığı	Deney Süresi	Kaynak
<i>İn vitro</i> 2B	HK-2	15-60 µg/ml	24-48 saat	[69, 70, 72, 73, 76-81]
	RPTEC	20-40 µg/ml	24-48 saat	[75]
	LLC-PK1	40-50 µg/ml	24 saat	[82, 83]
<i>İn vitro</i> 3B	uPKH	25- 50 µg/ml	24 saat	[84]
<i>İn vivo</i>	Sıçan böbreği	1.5-2 mg/kg	2 ve 4 hafta	[69, 76, 77, 85]
	Fare böbreği	1-3 mg/kg	2 ve 4 hafta	[52, 70, 72, 75]

Literatürde takrolimusun nefrotoksik etkilerini değerlendiren *in vitro* çalışmalarda, ilacın böbreğin fonksiyonel birimi nefronların ABH’ye en duyarlı kısmı olan PTEH üzerinde öncelikli etki gösterdiği bildirilmiştir [86].

2.4. Böbreğin Yapısı; Nefron ve Proksimal Tübüller

Böbrek omurganın iki yanında retroperitoneal olarak yerleşmiş, damarlardan gelen kanı süzerek idrarı oluşturan, metabolizma atık ürünleriyle birlikte ilaç ve toksinlerin vücuttan uzaklaştırılmasını ve vücut sıvısının belirli bir dengede tutulmasını sağlayan damardan zengin parankimatöz bir çift organdır [87, 88]. Her böbrek yaklaşık 11 cm uzunluk, 4-5 cm genişlik ve 3 cm kalınlıkta olup ortalama ağırlıkları 150 gramdır [89]. Her iki böbreğin üst kenarlarında hormon üreten böbreküstü bezi mevcuttur. Böbrekler düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındaki bir kapsül ile çevrilidir. Parankim kısmında renal korpüskül ile tübüllerin yer aldığı renal korteks ve tübüllerin düzenlenişleri nedeniyle

piramit şeklindeki yapıların oluşturduğu renal medulla bölgeleri vardır [89, 90]. Her medullar piramit ve çevresindeki ilişkili kortikal doku bir lobu oluşturmaktadır [90]. İnsan böbreklerinin her biri 8 ila 18 lob içermektedir [88]. Loblar ise lobüllere ayrılırlar ve her bir lobül bir toplama borusu ve onun bağlantılı olduğu nefronlardan oluşmaktadır. Böbreğin fonksiyonel birimi olan nefronlar her bir böbrekte yaklaşık 1-1.5 milyon civarında bulunur işlevleri doğrultusunda özelleşmiş hücrelerin meydana getirdiği kısımları vardır [87]. Nefronlar; glomerül, glomerülü çevreleyen Bowman kapsülünden oluşan renal korpüskül ve proksimal tübül, Henle kulpu, distal tübül ve toplama borularını içeren bir kanal sisteminden oluşur [91-93] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Böbreğin işlevsel birimi: Nefron. Nefronlar, glomerül ve Bowman kapsülünün oluşturduğu renal korpüskül ile başlayıp, proksimal tübül, Henle kulpu, distal tübül ve toplama kanalları ile kesintisiz devam eden kanal sisteminden oluşmaktadır.

Nefronun başlangıç segmenti olan börek cisimciğini oluşturan yapılardan glomerül, iki atardamar arasında yer alan ve endotel hücreleri ile döşeli özelleşmiş bir kılcak damar ağı olup kanın süzülmesi ile ultrafiltratın oluşumunu sağlar [92, 94]. Oluşan ultrafiltrat glomerülü çevreleyen Bowman kapsülüne ve oradan da tübüler kısmın başlangıcı olan proksimal tübüle geçer [88, 95]. Proksimal tübülde ultrafiltratın büyük bölümü geri emilir ve sekresyon gerçekleşir. Henle kulpunda su ve iyonların geri emilimi gerçekleşir

[96]. Distal tübülde ise iyonların geri Emilimi tamamlanır ve oluşturulan atık toplama kanallarına iletilir [88].

Nefronun kısımları farklı işlevlere ve dolayısıyla birbirlerinden farklı yapısal özelleşmelere sahip olduğu için ilaçlar ve toksik maddelere maruziyetten etkilenme durumu değişiklik gösterebilmektedir. Dolayısıyla nefronların toksik maddelere ilk önce maruz kalan ve en duyarlı kısmı proksimal tübüldür. Nefrotoksik hasarın önemli bir hedefi olması nedeniyle literatürdeki nefrotoksisite çalışmalarında proksimal tübül hücrelerine odaklanılmıştır [12, 97].

Proksimal Tübül

Proksimal tübül geri Emilim ve sıvı transportunu sağlamak için uzun ve sıkı mikrovilluslardan oluşan özelleşmiş bir fırçamsı kenara sahiptir ve tek katlı kübik epitel hücrelerinden oluşmaktadır [92, 98]. Ultrafiltrat içeriğinin büyük kısmı burada geri emildiği için PTEH'in arasında çok sayıda sıkı bağlantı birimi bulunur [88, 98, 99]. Ayrıca geri Emilimin yanı sıra salgılama görevini de yerine getiren kısımdır [98]. Proksimal tübül hücreleri hem geri Emilim hem de salgılama sağladığı için renal korpüskülde filtre edilmemiş olan yabancı maddeler ve ilaçlar PTEH tarafından filtrata salgılanır [91, 98]. Proksimal tübül epitel hücrelerindeki organik anyon ve katyon taşıyıcıları, böbreklerin organik anyonlar ve katyonlar, safra tuzları, kreatinin, antibiyotik ve diğer ilaçları tek başına glomerüler filtrasyona göre daha yüksek bir oranda atmasına izin verir [91, 99]. Bu süreçteki mekanizmalar farmakolojik olarak ilaçların düzenli klirensi ve toksik etki göstermemesinin sağlanmasında önemlidir. Böbreklerden aktif ilaç sekresyonunda ve reabsorpsiyonunda PTEH'in bazolateral zarlarında OAT-1 ve OAT-3 [14], apikal zarlarında MRP-2, MRP-4 [100], P-gp, OCT-2 [101] gibi yerleşik taşıyıcı proteinler görev yapar [102].

Proksimal tübül epitel hücreleri *in vitro* koşullarda tek katlı olarak kültür plağı üzerinde çoğaltıldıklarında yukarıda anlatılan fizyolojik koşullara benzer bir yapı oluşturamadığından kutuplaşmayı gösteremez [14]. Bu nedenle vücut içinde *in vivo* koşullarda sürdürdükleri aktif transport ve reabsorpsiyon işlevleri açısından değerlendirilemez [103, 104]. Böbrekteki akut hücresel hasarın özellikle PT'leri

etkilediği bildirilmektedir [86]. Hücresel hasarın organın yapısal ve fonksiyonel yetmezliği ile giden klinik hasara dönüşmeden önce sağlıklı nefronların devamlılığının sağlanabilmesi için PTEH’de ilaca bağlı böbrek hasarının saptanabilmesi ve moleküler patogenezin öngörülebilmesi gerekmektedir [14].

Proksimal tübülün yapısı ve fonksiyonları *in vivo* koşullarda tasarlanan hayvan modellerinde insana göre PTEH’in ifade ettiği taşıyıcı proteinlerin ifadesinde türe özgü varyasyonlar göstermektedir [16]. Bu nedenle *in vivo* hayvan modelleri yapısal ve fonksiyonel özellikleri açısından insanla birebir eşleştiremediğinden prelinik deney düzeneklerinin insan hücre ve dokuları ile oluşturulması gerekmektedir [16]. Bu doğrultuda *ex vivo* 3B-PT kültür modelleri geliştirilmiştir [104, 105].

Takrolimusun klinikte organ transplantasyonu sonrası kullanılması ve allogreft reddini önleyen bir ilaç olması nedeniyle hücre düzeyinde toksik etkilerinin öngörülerek hastaların nefrotoksik ABH’den korunması için biyomühendislik yaklaşımlarıyla 3B *ex vivo* PT test düzeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır [105, 106].

2.5. Üç Boyutlu Böbrek Kültür Sistemleri

Üç boyutlu böbrek kültür sistemleri; mikroakışkan sistemleri ve 3B baskı platformlarından oluşmaktadır. Mikroakışkan sistemleri, mikrolitre ve daha küçük hacimlerdeki mikro ölçekteki kanallar içerisinde kontrollü bir akışın gerçekleşmesini sağlayan sistemlerdir ve nefronun kısımlarından PT yapısının modellendiği bir dizi ticari 3B mikroakışkan sistemleri geliştirilmiştir [107-110]. Bu sistemler üzerinde farklı ilaç etken maddeleri ile toksisite değerlendirmesi yapılmıştır [104, 106, 110, 111]. Ticari mikroakışkan platformların yanı sıra PT modellemek için 3B baskı teknolojisinin kullanımı oldukça yeni bir yaklaşımdır ve bu yöntem hücreleri destekleyici biyomalzemelerin hücreleri sarması, tübül yapısının oluşturulması ve perfüze edilerek akış yoluyla kayma geriliminin modellenebilmesi gibi özellikleriyle fizyolojik koşulları taklit etmek için uygun bir platform sağlamaktadır [112]. Üç boyutlu baskı yöntemleri ile böbrek hücreleri kullanılarak oluşturulmuş platformlar; ilaca bağlı nefrotoksisite, hiperglisemi, renal doku analoglarının geliştirilmesi ve fizyolojik koşulları taklit

edebilen *in vitro* modeller oluşturulması hedefleriyle farklı çalışmalarda kullanılmıştır [25, 27, 113-115]. Tüm bu çalışmalarda hücre canlılığı, PT'ye ait yapısal ve fonksiyonel belirteçler, hücresel yapıların ultrastrüktürel düzeyde incelenmesi gibi 2B hücre kültürü çalışmalarında gösterilebilen yöntemlerin yanı sıra; bariyer bütünlüğü ve albümin geri alımı ölçümü gibi 3B kültür sistemlerinde değerlendirilmesi mümkün olan kantitatif fonksiyonel analizler kullanılmıştır [22, 27].

Son dönemde geliştirilen mikroakışkan ve 3B baskı sistemlerini içeren *ex vivo* kültür platformları insan PT'lerinin yapı ve fonksiyonlarını çeşitli düzeylerde gösterebilmektedir. Mikroakışkan platformları ve 3B baskı yöntemleri ile PT modelleri oluşturan çalışmalar Tablo 2.2' de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Mikroakışkan platformları ve 3B baskı teknikleri ile oluşturulan PT modellerinde sorun temelli deney tasarımları özetlenmiştir.

Tasarım	Sorun	Hücre	Kültür Süresi	Değerlendirme Ölçütü	Kaynak
3B Mikroakışkanda PT Platformu	Nefrotoksisite	HK-2, LLCPK1, RPTEC, ciPTEC-OAT1	4-10 gün	PTEH canlılığı, Bariyer yapısı (AQP1, OCT2) Bariyer işlevi (geçirgenlik indeksinin hesaplanması, albüminin geri alımı)	[21, 22, 107, 108, 110, 116, 117]
	Hiperglisemi	HK-2	4 gün	PTEH canlılığı, Fibrotik belirteçlerin değerlendirilmesi(α -SMA ekspresyonu, alkalın fosfataz aktivitesi)	[107]
3B Baskı PT Platformu	Nefrotoksisite	RPTEC	30 gün	PTEH canlılığı, Bariyer yapısı (asetillenmiş α tübülün, laminin, AQP1), Bariyer işlevi (geçirgenlik indeksinin hesaplanması, albüminin geri alımı)	[113, 114]
	Hiperglisemi	RPTEC	18 gün	PTEH canlılığı, Bariyer yapısı (asetillenmiş α tübülün, laminin,	[25]

				AQP1), Bariyer işlevi (geçirgenlik indeksinin hesaplanması, albüminin geri alımı)	
	Tübül Dejenerasyonu	RPTEC	28 gün	PTEH canlılığı, Bariyer Yapısı (AQP1,OCT2), Bariyer işlevi (bariyer bütünlüğü, albüminin geri alımı)	[26]
	İlaç Toksisitesi	pmTEC, RPTEC, HEK-293	7-28 gün	PTEH canlılığı, Bariyer yapısı (ZO-1)	[118-120]

Sonuç olarak, takrolimus kaynaklı nefrotoksisite çalışmaları ve 3B *ex vivo* modeller incelendiğinde perfüzyonun sağlanabildiği 3B-PT modellerinde takrolimusa bağlı nefrotoksisite değerlendirilmemiştir. Transplant reddini önleyici tedavi protokollerinde uygulanan takrolimus kaynaklı ABH'nin öngörülmesi ilacın klinikte güvenli olarak uygulanabilmesi için gereklidir. İnsan PT'lerinde başlayan hücresel hasar *ex vivo* ortamda mikroakışkan düzenekler ve 3B baskı sistemlerinde test edilmelidir.

Bu tez çalışması kapsamında takrolimusun gerçek zamanlı antiproliferatif dozunun belirlenebileceği ve takrolimus kaynaklı nefrotoksisitenin insan PTEH kullanılarak perfüzyonun sağlanabildiği 3B *ex vivo* model üzerinde yapısal ve fonksiyonel olarak değerlendirileceği varsayılmıştır.

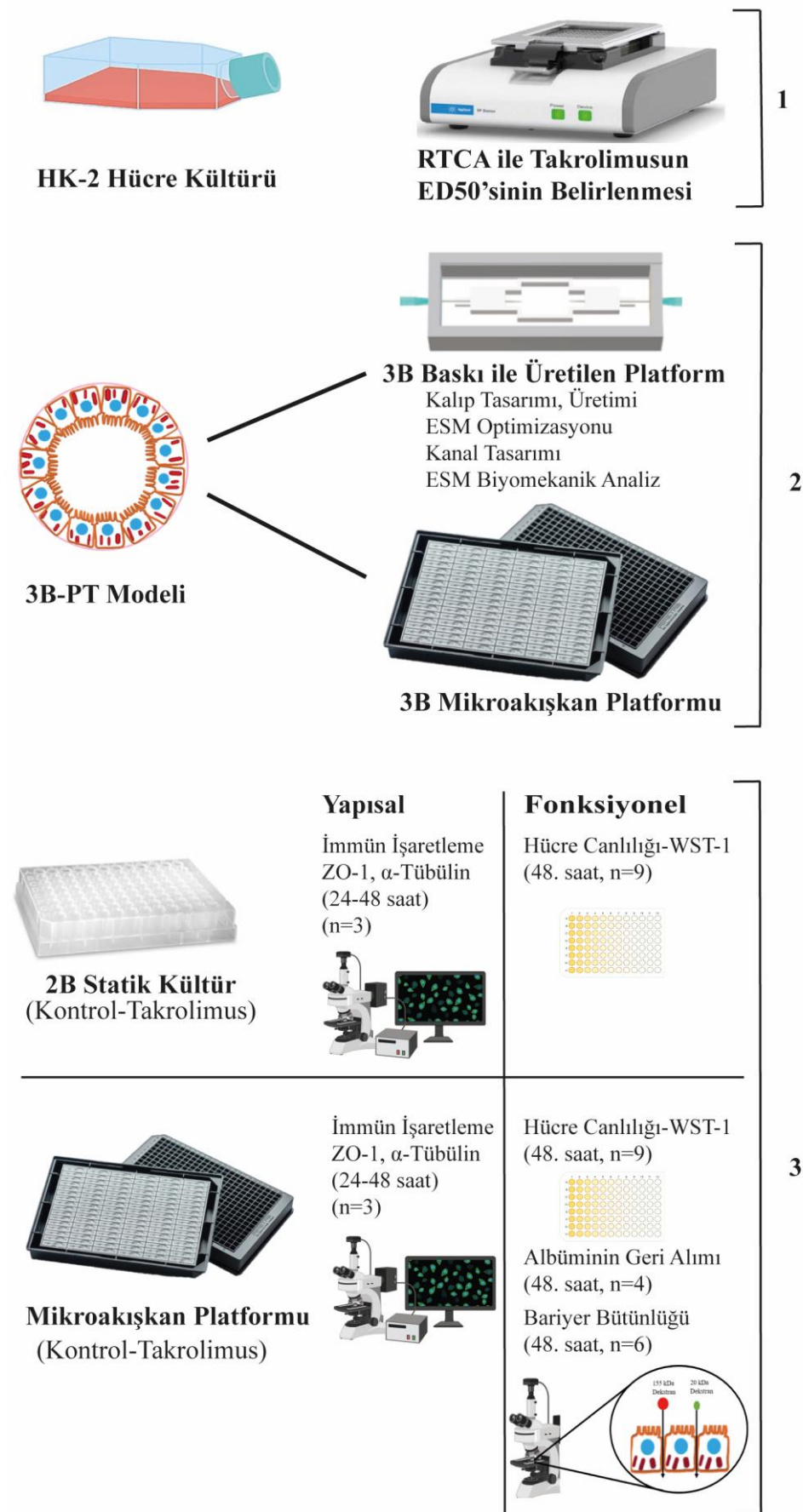
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Deney Tasarımı

Bu tez çalışması; hücre kültürü, 3B modelin tasarımı, optimizasyonu ve 3B-PT modelinin oluşturulması, floresan işaretleme ile görüntüleme, yapısal ve fonksiyonel değerlendirme iş paketlerini içermekte olup *in vitro* koşullarda; kontrol grubu içeren gözlemsel bir araştırma olarak tasarlanmıştır. Çalışmadaki bağımlı ve bağımsız değişkenler Tablo 3.1’de gösterilmiştir. Tez çalışmasının hedeflerine göre planlanan iş akış şeması Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. İş paketlerine ait bağımlı ve bağımsız değişkenler gösterilmiştir.

Bağımsız Değişkenler	3B Baskı Yöntemi ile Üretilen Platform	Bağımsız Değişkenler	2B Kültür Platformu		3B Mikroakışkan Platformu	
			Kontrol	Takrolimus	Kontrol	Takrolimus
Bağımlı Değişkenler	Kalıp Tasarımı ve Üretimi	Bağımlı Değişkenler	İmmün İşaretleme (ZO-1, α -tübülin)		İmmün İşaretleme (ZO-1, α -tübülin)	
	ESM Optimizasyonu		Hücre Canlılığı (WST-1)		Hücre Canlılığı (WST-1)	
	Kanal Tasarımı ve 3B Baskısı				Albüminin Geri Alımı	
	ESM Biyomekanik Özellik				Bariyer Bütünlüğü	



Şekil 3.1. Tez çalışmasının hedeflerine göre planlanan iş akış şeması.

3.1. Gerçek Zamanlı Olarak Takrolimusun PTEH'deki Submaksimal Antiproliferatif Etkili Dozunun Belirlenmesi

3.1.1. İnsan Kaynaklı PTEH'in Elde Edilmesi ve Çoğaltılması

İnsan kaynaklı PTEH olarak, HPV ile ölümsüzleştirilmiş HK-2 hücre hattı (ATCC, CRL-2190), literatürde ilaca bağlı nefrotoksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir hücre hattı olması nedeniyle tercih edilmiştir [69, 70]. Hücreler DMEM-F12 (DMEM-12A, Capricorn, Almanya), %10 FBS (FBS-HI-11A, Capricorn, Almanya), %1 L-glutamin (GLN-B, Capricorn, Almanya), %1 Pen-Strep (03-031-1B, Biological Industries, İsrail) içeren besiyeri ile T25 (833.910.002, Sarstedt, Almanya) ve T75 (833.911.002, Sarstedt, Almanya) hücre kültür flasklarında %5 CO₂ ve 37°C sıcaklık koşullarındaki inkübatörde (EC160, Nüve, Türkiye) kültüre edilmiştir. Haftada üç kez besiyeri değiştirilip yaklaşık %80 yoğunluğa ulaşıldığında pasajlanarak tüm iş paketlerinde 9-15 arasındaki pasajlar kullanılmıştır.

3.1.2. İmpedans Temelli Gerçek Zamanlı Proliferasyon Analizi ile Takrolimusun Submaksimal Doz Penceresinin Belirlenmesi

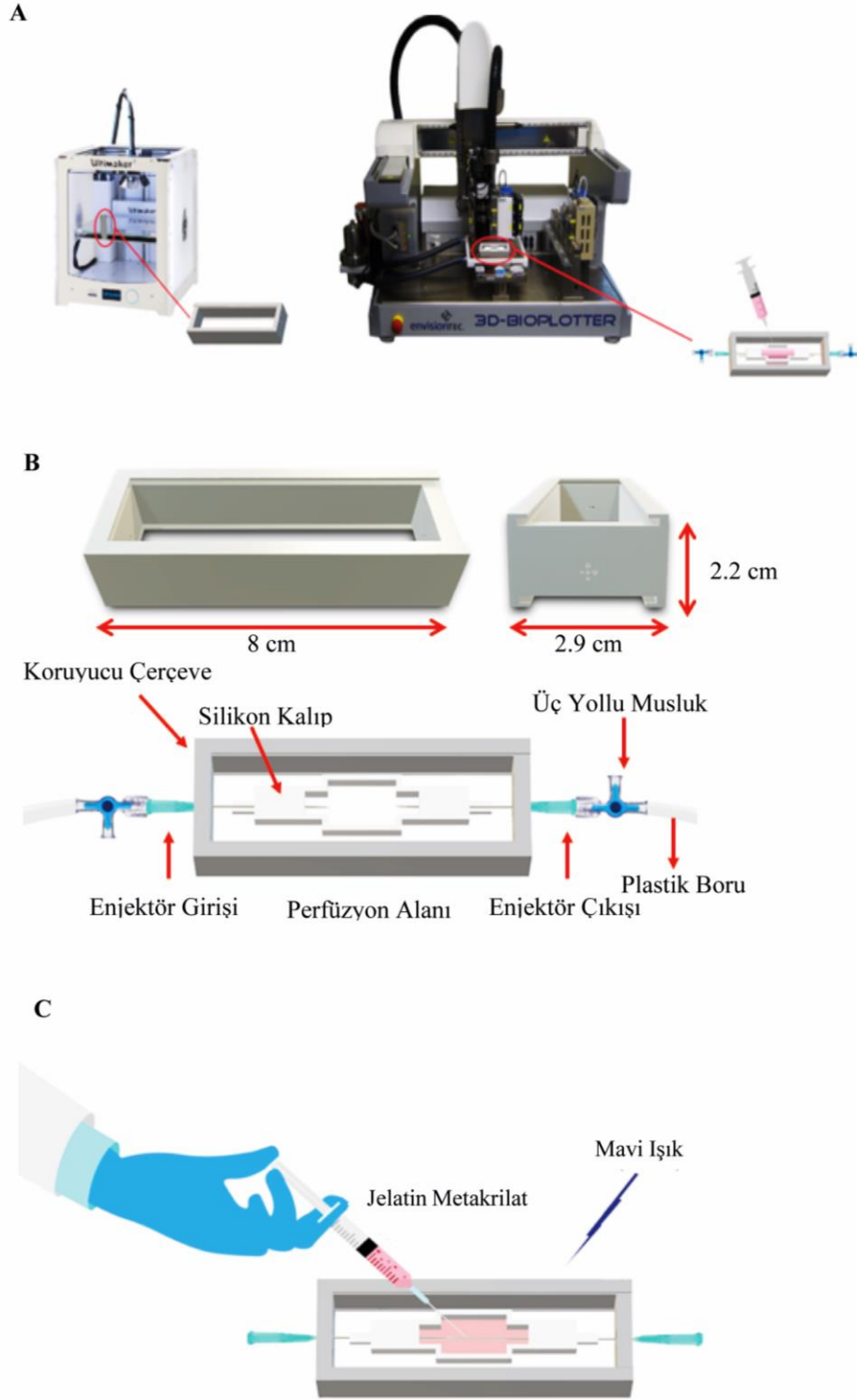
Takrolimusun (FK-506 Monohydrate, F4679, Sigma, ABD), HK-2 hücrelerindeki etkisinin gerçek zamanlı ve doz bağımlı olarak impedans temelli teknik ile ölçülebilmesi amacıyla tabanı altın mikroeletrotlarla kaplı 96 kuyucuklu kültür plakasına (E- Plate, ACEA) her kuyucuğa 1×10^4 hücre gelecek şekilde besiyeri içinde eklenmiştir. Deney, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarında nemlendirilmiş inkübatör içindeki RTCA SP cihazı (xCELLigence, Agilent, ABD) ile hücrelerin yoğunluğuna ilişkin veriler her 15 dakikada bir hücre indeksinin ölçülmesiyle gerçek zamanlı olarak kaydedilmiştir. Takrolimus, DMSO içinde çözülmüş ve besiyeri içerisinde seyreltilerek dozlar ayarlanmıştır. Deney; takrolimus verilmeyen kontrol grubu, geniş doz aralığında 1×10^{-1} , 1, 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 µg/ml konsantrasyonlarda takrolimus ve %10 DMSO'nun verildiği çözücü grubundan oluşmaktadır ve her grup 3 tekrarlı olacak şekilde deney planlanmıştır. Hücre indeksinin 1'e ulaştığı görüldükten sonra 1×10^{-1} , 1, 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 µg/ml konsantrasyonlarda takrolimus uygulanmıştır [121]. İlaç uygulamasından sonra 72 saate kadar hücre indeksi her 15 dakikada bir kaydedilmiş ve RTCA yazılımı (RTCA Software 2.0) ile değerlendirilerek ED50'si belirlenip hücrelerin proliferasyon hızı istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

3.2. Üç Boyutlu PT Kültür Platformlarının Oluşturulması ve Optimizasyonu

3.2.1. Üç Boyutlu Baskı ile PT Modelinin Tasarımı, Üretimi, Optimizasyonu

3.2.1.1. Üç Boyutlu Baskı ile Kalıbın Tasarımı ve Üretimi

Biyomühendislik temelli 3B-PT modeli en dışta koruyucu çerçeve ile destekli bir silikon kalıp ve içindeki kapalı perfüzyon alanı, perfüzyon alanının içine yerleştirilmiş bir kanal olarak tasarlanmıştır. Sistemin bileşenlerinin tümü bilgisayar destekli 3B tasarım programı (3D Builder, Microsoft Corporation, ABD) ile çizilmiştir. Silikon kalıbın 8x2.9x2.2 cm boyutlarındaki koruyucu çerçevesi perfüzyon alanını çevreleyecek kapalı bir düzenek olarak planlanmış ve 3B yazıcı (Ultimaker, Ultimaker 2+, Hollanda) ile polilaktik asit filament (PLA Filament, Color Fabb, Hollanda) kullanılarak üretilmiştir. Böylece üzeri 76x26x1 mm boyutlarındaki cam lam ile kapatılabilen kapalı bir düzenek elde edilmiştir (Şekil 3.2.A). Kalıp 3B yazıcı (3D Bioplotter, Envisiontec, Almanya) ile silikon (Sista, Akvaryum Silikonu, Almanya) kullanılarak üretilmiştir (Şekil 3.2. B). Döküm yöntemi ile kanal üretimi şematize edilmiştir (Şekil 3.2.C).



Şekil 3.2. Üç boyutlu yazıcı ile üretilen platformun üretim akış şeması. A: 3B yazıcı ile üretimin yapılması, B: Üretilen platformun bileşenleri, C: Döküm yöntemi ile kanal üretimi şematize edilmiştir.

3.2.1.2. Ekstraselüler Matriksin Optimizasyonu

HK-2 hücrelerini çevreleyecek malzemenin belirlenmesi için hidrojel yapısının optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Jelatin fibrinojen karışımı için %1 jelatin ve %7.5 jelatin içeren iki formülasyon kullanılmıştır. Bu doğrultuda %1 jelatin içeren malzeme için; jelatin (22151, Serva, Almanya), fibrinojen (F8630, Sigma, ABD), transglutaminaz (TG, RM70, Tegen, Türkiye), kalsiyum klorür (CaCl_2 , C3881, Sigma, ABD) ve trombin (SE3640203, Serva, Almanya) kullanılmış olup, ağırlıkça %1 jelatin, 25 mg/ml fibrinojen, 2.5 mM CaCl_2 ve ağırlıkça %0.2 TG karıştırılarak hidrojel elde edilmiştir [27]. İkinci olarak %7.5 jelatin içeren malzeme için; ağırlıkça %7.5 jelatin, 10 mg/ml fibrinojen, 2.5 mM CaCl_2 ve ağırlıkça %0.2 TG karıştırılarak hidrojel elde edilmiştir [25]. Jelatin hazırlamak için 0.075 g jelatin 5 ml DPBS içinde 60°C sıcaklıktaki etüv içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde 12 saat süreyle karıştırılarak çözülmüş ve sonra kabin içerisine alınıp 0.22 µm filtreden geçirilerek steril hale getirilmiştir. Fibrinojen ve trombin kabin içinde steril hazırlanmış, TG ve CaCl_2 hazırlandıktan sonra 0.22 µm filtreden geçirilmiştir.

Ekstraselüler matriks olarak değişen konsantrasyonlarda jelatin metakrilat ve jelatin metakrilat üzerine *Matrigel* (Corning, ABD), fibronektin (03-090-1-01, Biological Industries, İsrail) yüzey kaplamaları ile optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.2). Bu kapsamda jelatin metakrilat sentezi için jelatin %10 w/v konsantrasyonda 0.25 M karbon tamponu ile çözülmüştür. Karbon tamponu (0.25 M) hazırlamak için %0.795 w/v konsantrasyonunda sodyum karbonat (Na_2CO_3 , 490768, Sigma, ABD) ve %1.495 w/v konsantrasyonunda sodyum bikarbonat (NaHCO_3 , S5761, Sigma, ABD) saf suyun içerisinde çözüldükten sonra NaOH ile çözelti pH 9'a ayarlanmıştır. Sentez tepkimesi pH 9 iken gerçekleşeceğinden karbon tamponu içerisinde çözünen jelatin çözeltisinin pH'ı NaOH ve HCl ile pH 9'a ayarlanmıştır. Ardından jelatin çözeltisinin içine her 1 g jelatin için 0.1 ml konsantrasyonunda metakrilik anhidrit (276625, Sigma, ABD) eklenmiştir. Üç saat sonra reaksiyonu durdurmak için NaOH ve HCl ile pH 7.4'e ayarlanır ve tepkimeye girmeyen metakrilik anhidritler çözeltiden uzaklaştırmak için diyaliz tüpüne (SnakeSkin diyaliz tüpü, 10.000 MWCO, 68100, ThermoFisher, ABD) alınıp üç gün süreyle her gün ortamın suyu değiştirilir. Diyaliz tamamlandıktan sonra diyaliz tüplerindeki sıvı petrilere dökülüp önce -20°C ve ardından -80°C soğutuculara kaldırılarak donması sağlanmıştır. Daha

sonra 5 gün süreyle çözücünün kontrollü buharlaşmasını sağlamak için liyofilizatör (ScanVac Cool Safe, Danimarka) ile kurutulmuştur. Elde edilen jelatin metakrilat -20°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Sentezi tamamlanan jelatin metakrilat ile çözelti hazırlamak için, konsantrasyona uygun miktarda jelatin metakrilat tartılıp 30 dakika boyunca UV ile sterilize edildikten sonra, %0,01875 v/v konsantrasyonunda Triethanolamine (90279, Sigma, ABD) ve 0.0125 v/v konsantrasyonunda 1-Vinyl-2-Pyrolidinane (V3409, Sigma, ABD) içeren saf su içinde karıştırılıp filtre edildikten sonra manyetik karıştırıcı üzerinde 50°C sıcaklık ve 400 rpm hızda karıştırılarak çözülmüştür. Ardından 8:2 oranında 0.5 mM Eosin Y (E4009, Sigma, ABD) eklenmiş ve karışmaları sağlanmıştır.

HK-2 hücrelerinin malzeme üzerinde tutunma ve çoğalma özelliklerini değerlendirmek amacıyla 2B statik koşullarda 24 kuyucuklu hücre kültür plakasına %5, %7.5, %10, %16.5 jelatin metakrilat konsantrasyonları fibronectin ve *Matrigel*, kaplama grupları üzerinde PTEH'in ekimi gerçekleştirilip tutunma ve çoğalma durumları invert mikroskop ile takip edilmiştir (Tablo 3.2). Deney gruplarına uygun olarak %5, %7.5, %10, %16.5 jelatin metakrilat konsantrasyonları ayrı ayrı hazırlanıp ilgili kuyulara 600 µl malzeme eklenmiştir. Beş dakika süreyle mavi ışık altında bekletilip çapraz bağlanmaları sağladıktan sonra *Matrigel* ile kaplama için ilgili kuyucuklara *Matrigel* eklenip 1 saat süre ile kabin içinde inkübasyona bırakılmıştır. Fibronectin ile kaplama için önce DPBS ile yıkama yapıp ardından 5 µg/cm² konsantrasyonda olacak şekilde fibronectin ilgili kuyucuklara eklenmiş ve 30 dakika süreyle 37°C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra tekrar DPBS ile yıkama yapılmıştır. Hücre ekimi için her kuyucuk içine 1x10⁵ HK-2 hücresi içeren süspansiyon jelin üzerine damlatılıp bir saat süreyle 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kuyulara besiyeri eklenip her gün takip edilmiştir.

Tablo 3.2. Statik şartlarda PTEH'in optimum koşullarda yaşayabileceği malzemenin belirlenebilmesi için oluşturulan deney grupları gösterilmiştir.

Kontrol	<i>Matrigel</i> ile Kaplama	Fibronektin ile Kaplama
%5 Jelatin Metakrilat	%5 Jelatin Metakrilat <i>Matrigel</i> ile Kaplama	%5 Jelatin Metakrilat Fibronektin ile Kaplama
%7,5 Jelatin Metakrilat	%7,5 Jelatin Metakrilat <i>Matrigel</i> ile Kaplama	%7,5 Jelatin Metakrilat Fibronektin ile Kaplama
%10 Jelatin Metakrilat	%10 Jelatin Metakrilat <i>Matrigel</i> ile Kaplama	%10 Jelatin Metakrilat Fibronektin ile Kaplama
%16,5 Jelatin Metakrilat	%16,5 Jelatin Metakrilat <i>Matrigel</i> ile Kaplama	%16,5 Jelatin Metakrilat Fibronektin ile Kaplama

3.2.1.3. Perfüzyon Kanalı Optimizasyonu

Üç boyutlu baskı yapılacak kanalın modeli silikon kalıp içerisinde konumlandırılmış olup giriş ve çıkış noktalarında farklı tasarımlar yapılmıştır. Bu tasarımlar arasında 0.2 mm çapında düz kanal modeli, 0.2 mm çapında kanal ve 1.5 mm çap ile 3 mm uzunluğunda silindirik bağlantı noktası ve sol tarafta 0.5 mm sapma uzunluğu bırakılan kanal modeli, 0.2 mm çapında kanal ve 1.5 mm çapında 3 mm uzunluğunda silindirik bağlantı noktası ve her iki tarafta 0.5 mm sapma uzunluğu bırakılan kanal modeli oluşturulmuştur. Ayrıca proksimal kıvrımlı tübülü modelleyecek bir kanal da tasarlanmıştır.

Üç boyutlu kanal modeli, fizyolojik koşulları sağlayacak şekilde alt ESM katmanı üzerine 3B yazıcı (3D Bioplotter, Envisiontec, Almanya) ile çıkarılabilir mürekkep (Pluronic F127, P2443, Sigma, ABD) kullanılarak basılmış ve üst ESM katmanı eklenerek kapatılmıştır. Çapraz bağlanma sonrası çıkarılabilir mürekkebin uzaklaştırılması için model 4°C'ye soğutulmuş ve çıkarılabilir mürekkep soğuk distile su akışı ile çıkarılmıştır. Ardından sistem perfüzyon pompasına (Cole Parmer, Masterflex L/S®, ABD) bağlanmıştır.

Üç boyutlu baskı çalışmaları ile eş zamanlı olarak döküm yöntemi ile kanal oluşturmak için kalıbın içerisinde iğne uçları karşılıklı olarak birbiri içerisine geçecek şekilde yerleştirilmiştir. Ardından ESM kalıba dökülüp çapraz bağlanmanın gerçekleşmesi sağlanmıştır. Çapraz bağlanma tamamlandıktan sonra iğne uçlarının geri çekilmesi ile jel içerisine gömülü bir kanal oluşturulmuştur. Daha sonra oluşturulan kanalın

içerisinden besiyeri akışı başlatmak üzere perfüzyon pompasına bağlanıp 3 rpm hızda (4.32 ml/dk) akış başlatılmış ve beş güne kadar akış devam ettirilmiştir.

3.3.1.4. Seçilen Ekstraselüler Matriksin Biyomekanik Analizi

Ekstraselüler matriks içindeki TG [122] ve fibrinojen konsantrasyonlarının optimal mekanik stabilite sağlayan oranlarının belirlenmesi için evrensel test makinesi (Shimadzu AGS-X, Japonya) ile basma testi uygulanmıştır [123, 124]. Bunun için %1 jelatin ve %7.5 jelatin içeren ESM karışımları (Tablo 3.3) 24 kuyucuklu kültür kabına dökülüp jelleşmesi için 37°C’de 1 saat bekletildikten sonra 7.5 mm’lik diskler üzerinde 50N’luk yük sensörü kullanılarak 1mm/dk’lık bir hızla ESM basma testine maruz bırakılmıştır. Bütün örneklere uygulanan yük ve gerinim, zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilerek her grup için basma gerilimi hesaplanmıştır.

Tablo 3.3. Biyomekanik özellikleri karşılaştırılacak olan ESM bileşenlerinin oranları gösterilmiştir.

Jelatin (% wt)	Fibrinojen (mg/ml)	TG (%wt)
%7.5	10 mg/ml	%0.2
		%1
		%5
		%10
%1	25 mg/ml	%0.2
		%1
		%5
		%10

Elde edilen verilerden yararlanarak mühendislik gerilmesi-mühendislik gerinmesi eğrisi (σ - ϵ) elde edilmiştir. Mühendislik gerilmesi;

$$\sigma = \frac{F}{A_0}$$

F uygulanan yükü ifade etmektedir, A_0 doku iskelesinin kesit alanını ifade etmektedir.

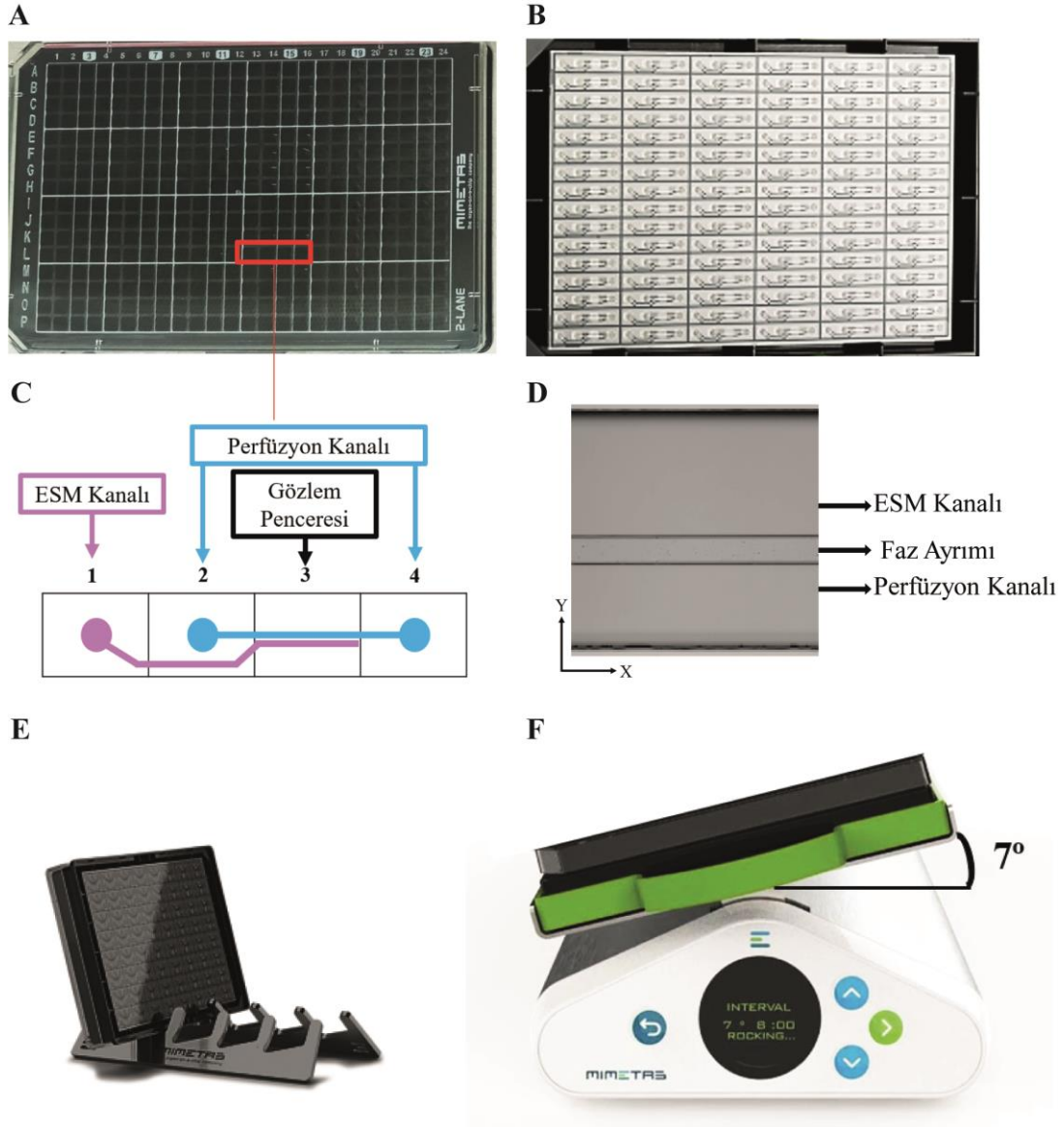
Mühendislik gerinmesi;

$$\varepsilon = \frac{li - lo}{lo}$$

li doku iskelelerin ilk uzunlukları, lo uzama sonucundaki uzunluğunu ifade etmektedir.

3.2.2. Üç Boyutlu PT Mikroakışkan Kültür Platformunda Kanalın Oluşturulması

Üç boyutlu PT modeli için aralıklı salınım cihazı ile perfüze edilebilen, formatında 384 kuyucuk yer alan ve birbirine bağlı her 4 kuyucuğun bir çipi oluşturduğu dolayısıyla plaka başına 96 çipi olan, jel kanalı ve perfüzyon kanalı olmak üzere iki ayrı kanalı ve kanalları arasında faz ayrımı bulunan ticari mikroakışkan platformu (9605-400-B, Mimetas, Hollanda) kullanılmıştır (Şekil 3.3). Bir çipi oluşturan 4 kuyucuktan birinci kuyucuk jel girişi, ikinci kuyucuk besiyeri girişi, üçüncü kuyucuk gözlem penceresi ve dördüncü kuyucuk besiyeri çıkışı sağlamaktadır. Mikroakışkan platformunda başlangıçta her çipin gözlem penceresine 50 µl PBS eklenmiştir ve sonra jel kanalına 1.8 µl ESM (*Matrigel*, Corning, ABD) yüklenmiş ve 30 dakika süreyle 37°C sıcaklıkta bekletilerek polimerizasyonu sağlanmıştır.



Şekil 3.3. Mikroakışkan platformunun makroskopik ve şematik görüntüleri. A,B Mikroakışkan platformunun üstten ve alttan görüntüsü, C: Her çipi oluşturan dört kuyucuğun şematik çizimi, D: Boş çipin mikrokanalları, E: 75° açı ile platformun durmasını sağlayan aparat, F: Perfüzyonun sağlandığı aralıklı salınım cihazı gösterilmektedir. X perfüzyon kanalının yatay, Y dikey eksenini göstermektedir.

3. 3. Üç Boyutlu PT Modelinde Takrolimus Kaynaklı Akut Hasarın Oluşturulması ve Değerlendirilmesi

3.3.1. Perfüzyon Kanalına HK-2 Hücrelerinin Ekimi ile 3B-PT Modellerinin Oluşturulması

Üç boyutlu baskı ile PT modeli oluşturulması için kültür koşullarında uygun şekilde çoğaltılan HK-2 hücreleri sayılarak yaklaşık 1×10^6 hücre, oluşturulan kanal içerisine verilip 12 saat süre ile inkübatörün içinde statik koşulda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda invertte faz kontrast mikroskobu ile görüntüleme yapıp perfüzyon pompasına bağlandıktan sonra kanaldan besiyeri akışı başlatılmıştır. Deney her grupta iki tekrarlı olacak şekilde $n=6$ örnek ile gerçekleştirilmiştir.

Mikroakışkan platformunda 3B-PT modeli oluşturulması için jel polimerizasyonu gerçekleştikten sonra her çipin perfüzyon kanalına 1×10^4 HK-2 hücresi içeren $1.8 \mu\text{l}$ besiyeri yüklenmiş ve aynı kuyucuğa $50 \mu\text{l}$ besiyeri eklendikten sonra 75° açı ile durmasını sağlayan özel aparata (Şekil 3.3.E) yerleştirilip 4 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyeri çıkışı kuyucuklarına $50 \mu\text{l}$ besiyeri eklenmiş ve mikroakışkan platformu 7° açı ve 8 dakika aralıklı salınım cihazına (Şekil 3.3.F, Organoflow, Mimetas, Hollanda) yerleştirilmiştir. Bu koşul ile 2 dyne/cm^2 kayma gerilimi oluşturularak perfüzyon kanalında akış sağlanmıştır. İki gün ara ile giriş ve çıkış kuyularından besiyeri değiştirilmiş ve kanal içindeki hücre yoğunlukları invertte mikroskopta kontrol edilmiştir. Deney her grupta bir tekrarlı olacak şekilde $n=6$ örnek ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. HK-2 Hücre Kültür Platformlarında Takrolimus Nefrotoksisite Modelinin Oluşturulması

İki boyutlu ve 3B düzeneklerde karşılaştırmalı olarak HK-2 hücrelerindeki takrolimus toksisitesi değerlendirilmiştir.

Statik koşullarda 2B düzenekte nefrotoksisite değerlendirmesi için, 96 kuyulu plakalara her kuyuda 1×10^4 HK-2 hücresinin ekimi yapıp %70 yoğunluğa ulaştıklarında ED50

44.69 µg/ml takrolimus 48 saat süreyle uygulanmıştır. Kontrol ve takrolimus verilen deney grupları 48 saat süreyle izlenmiştir ve her grupta n=6 örnek bulunmaktadır.

Üç boyutlu baskı ile PT modelinde kanal içine 1×10^6 HK-2 hücresinin ekimi yapılmış ve kültüre edildikten sonra 44.69 µg/ml takrolimus 48 saat süreyle uygulanmıştır. Deney her grupta bir tekrarlı olacak şekilde n=6 örnek ile gerçekleştirilmiştir.

Mikroakışkan platformunda 1×10^4 HK-2 hücresi perfüzyon kanalına ekilmiş ve hücreler kanalı kaplayıp sızdırmaz bir bariyer oluşturana kadar kültüre edildikten sonra ED50 44.69 µg/ml takrolimus 48 saat süreyle uygulanmıştır. Uygulandıktan sonra hücreler 48 saat süreyle izlenmiştir. Deney her grupta bir tekrarlı olacak şekilde n=3 örnek ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. Takrolimus Nefrotoksitesinin 2B ve 3B Platformlarda Yapısal ve Fonksiyonel Olarak Değerlendirilmesi

3.3.3.1. Yapısal Değerlendirme

Lateral Sıkı Bağlantı Birimleri (ZO-1) ve Hücre İskeleti Bileşenlerinin (Asetillenmiş α tübülün) İmmün İşaretleme ile Değerlendirilmesi

Takrolimusun HK-2 hücrelerine verdiği hasarın yapısal etkilerinin incelenmesi için 2B ve 3B mikroakışkan platformunda lateral sıkı bağlantı birimi ZO-1 ve hücre iskeleti bileşeni asetillenmiş α tübülün direkt immün floresan işaretleme yöntemi ile işaretlenmiştir. Bu amaçla Alexa Fluor 594 (ZO-1, 339194, Invitrogen, ABD) ve FITC ile konjuge (acetylated α -tubulin, sc-23950, SantaCruz Biotechnology, ABD) antikolar ile hücre çekirdeğini görüntülemek için DAPI çekirdek boyası (D9542, Sigma, Almanya) kullanılmıştır. İmmün işaretleme için tüm örneklerden besiyeri uzaklaştırılıp PBS ile yıkama yapılmıştır. Ardından %4 paraformaldehit eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek örnekler fikse edilmiştir. Permeabilizasyon için 15 dakika süreyle %0,3 Triton X-100 içeren PBS örneklere eklenmiştir. Permeabilizasyon işlemi sonrası PBS ile yıkama yapılmıştır. Blokaj için PBS ile %2 BSA, %0,2 Triton X-100 içeren blokaj solüsyonu kullanılarak 60 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

Ardından 1/1000 oranında ZO-1 ve 1/200 oranında asetillenmiş α túbülin primer konjuge antikolarıyla oda sıcaklığında karanlıkta 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından PBS ile yıkama işlemi yapılmış ve 100 ng/ml konsantrasyonda DAPI ile oda sıcaklığında karanlık koşullarda 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 2 kez PBS ile yıkama yapılmış ve konfokal mikroskopta görüntülenmiştir. Deney; kontrol, takrolimus ED50 ve negatif kontrol gruplarının 24 ve 48. saatteki değerlendirmesini içermekte olup her grupta n=3 örnek yer almaktadır. Mikrograflar üzerinde hücre sayısı, alan, intensite ve arka plan ölçümleri yapılarak düzeltilmiş toplam floresan yoğunluğu hesaplanmış ve analiz edilmiştir [125].

$$DTFY = [\text{Entegre Yoğunluk} - (\text{Alan} \times \text{Ortalama Arka Plan Yoğunluğu})] / \text{Alandaki Toplam Hücre Sayısı}$$

3.3.3.2. Fonksiyonel Değerlendirme

HK-2 Hücre Canlılığının WST-1 Tekniği ile Değerlendirilmesi

Hücre canlılığının değerlendirilmesi için canlı hücrelerde mitokondriyon kökenli dehidrogenaz enziminin varlığını kolorimetrik olarak ölçmeyi sağlayan WST-1 (11644807001, Roche, İsviçre) tekniği kullanılmıştır. İki boyutlu modelde, 96 kuyulu plakalara her kuyucuk içine 1×10^4 HK-2 hücresinin ekimi yapılmış ve %70 yoğunluğa ulaştığında 48 saat süreyle 44.69 $\mu\text{g/ml}$ takrolimus uygulandıktan sonra kuyucuklara 11:1 oranında WST-1 eklenmiş ve 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Mikroakışkan platformunda oluşturulan 3B-PT modelinde ise HK-2 hücreleri kanalı kapladıktan sonra 44.69 $\mu\text{g/ml}$ takrolimus verilir 48 saat sonra besiyeri giriş ve çıkış kuyucuklarına 5 μl WST-1 eklenmiş ve mikroakışkan platformu aralıklı salınım cihazının üzerinde iki saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından WST-1 ajanının etkisiyle renk değişimine bağlı optik absorbans, kolorimetrik mikropłaka okuyucuda (VersaMax Microplate Reader, Molecular Device, ABD) 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Deney, kontrol ve takrolimus gruplarını içermekte olup her grupta n=9 örnek yer almaktadır.

Albüminin Geri Alımının Kolorimetrik Olarak Değerlendirilmesi

Albümin geri alımının değerlendirilmesi 3B platform gerektirdiğinden mikroakışkan platformunda değerlendirme yapılmıştır. Üç boyutlu PT yapısında takrolimus

nefrotoksisitesinin albümin geri alımı üzerindeki etkileri HRP konjuge insan serum albümini (HRP-HSA, ab8032, abcam, İngiltere) kullanılarak değerlendirilmiş olup nefrotoksisite modeli oluşturulduktan sonra besiyeri içerisinde 40 µg/ml HRP-HSA perfüzyon kanalına verilmiştir. Ardından deney ve kontrol gruplarına ait besiyeri perfüzesi 1 saat sonunda toplanıp kromojen olarak 3,3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, D3939, Sigma, ABD) eklenip 5 dakika inkübe edildikten sonra perfüzesi içindeki işaretli albümin miktarı 465 nm dalga boyu ile kolorimetrik mikropłaka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür. Deney, kontrol ve takrolimus gruplarını içermekte olup her grupta n=4 örnek yer almaktadır.

Dekstran Moleküllerinin Geçirgenlik İndeksleri ile Epitel Bariyer Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Epitelin bariyer işlevinin farklı boyutlardaki dekstran molekülüne karşı geçirgenlik indekslerinin değerlendirilmesi 3B platform gerektirdiğinden mikroakışkan platformunda değerlendirme yapılmıştır. Kontrol ve takrolimus verilen deney gruplarında TRITC konjuge 155 kDa dekstran ve FITC konjuge 20 kDa dekstran (T1287 ve FD20S Sigma, ABD) molekülleri kanala verildikten sonra 0, 2, 4, 6, 8 ve 10. dakikalarda invert floresan mikroskop aracılığı ile uygun dalga boyunda (Eksitasyon/emisyon; TRITC, 550/573 nm; FITC, 495/517 nm) görüntüleme yapılmıştır. İşaretli molekülün hidrojele sızma miktarı floresan intensitesi ile değerlendirilmiş olup elde edilen sayısal verilerden permeabilite katsayısı formülü (Şekil 3.4) ile epitel bariyerinin permeabilite katsayısı hesaplanmıştır (27). Deney, kontrol ve takrolimus gruplarını içermekte olup her grupta n=6 örnek yer almaktadır.

$$P_{app} \text{ (cm/s)} = (\Delta C_{receiver} \times V_{receiver}) / (\Delta t \times A_{barrier} \times C_{donor})$$

P_{app}: Geçirgenlik indeksi (cm/s)
ΔC_{receiver}: Mikrokanallar arasındaki normalize edilmiş intensite farkı
V_{receiver}: Ekstraselüler matriks mikrokanalının hacmi
Δt: Zaman
A_{barrier}: Mikrokanalların temas ettiği yüzeyin alanı
C_{donor}: Dekstran konsantrasyonu

Şekil 3.4. Permeabilite katsayısı formülü.

3.4. Verilerin İstatistiksel Analizi

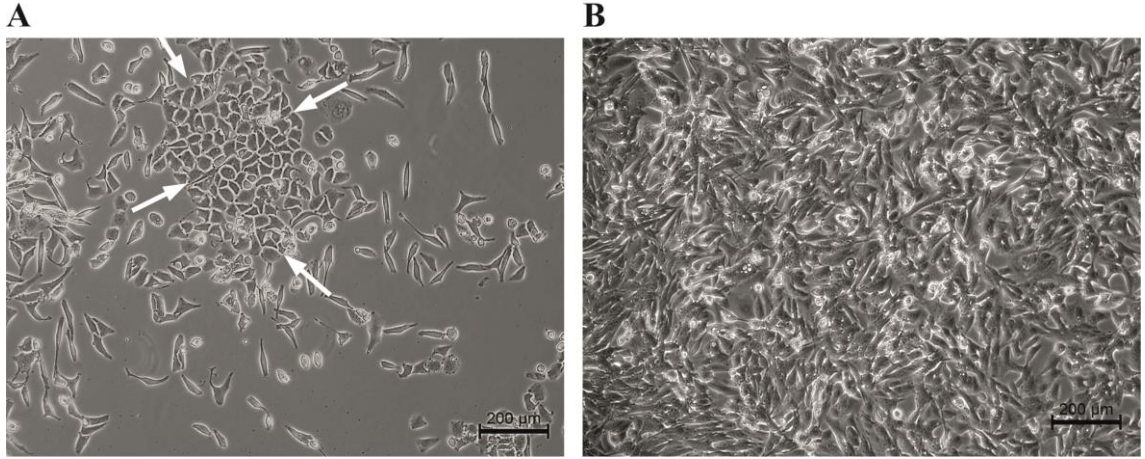
Elde edilen veriler normal dağılım açısından Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren veriler ikili karşılaştırma için t testi, çoklu gruplar için tek yönlü varyans analizi ile normal dağılım göstermeyen veriler ise ikili karşılaştırma için Mann Whitney U testi, çoklu grupların analizi için Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiştir. Tüm iş paketlerinde %95 güven aralığında çalışılmıştır. Tanımsal istatistikler parametrik (ortalama \pm standart hata) ya da parametrik olmayan (ortanca) dağılımlara göre grafiklerde gösterilmiştir. Analiz için IBM SPSS Statistics 25.0 ve grafikler için GraphPad Prism 8 programı kullanılmıştır.

4. SONUÇLAR

4.1. Gerçek Zamanlı Olarak Takrolimusun PTEH'deki Submaksimal Antiproliferatif Etkili Dozunun Belirlenmesi

4.1.1. İnsan Kaynaklı PTEH'in Elde Edilmesi ve Çoğaltılması

Hedeflenen pasajlarda başarıyla çoğaltılan HK-2 hücreleri invertte faz kontrast mikroskopunda genellikle birbiriyle tutunan kaldırım taşı görünümlü kübik ya da poligonal epitel hücre toplulukları olarak izlenmiştir (Şekil 4.1.A). Kültür plağına tutunan hücrelerin 6 ila 12. günde hızla çoğalarak alanı kapladıkları (Şekil 4.1.B). görülmüştür. Hücreler sonraki iş paketlerinde başarıyla kullanılmıştır.



Şekil 4.1. HK-2 hücrelerine ait mikrograflar. x100 orijinal büyütme

4.1.2. İmpedans Temelli Gerçek Zamanlı Proliferasyon Analizi ile Takrolimusun Submaksimal Doz Penceresinin Belirlenmesi

Takrolimusun HK-2 hücrelerine uygulandığı tüm dozlarda (1×10^{-1} , 1, 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 µg/ml) kontrol grubuna göre çoğalmayı azaltıcı etki gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.2.A).

Takrolimus, 12. saatte 1×10^3 µg/ml dozda uygulandığında kontrol grubuna ve daha düşük dozlara göre doz bağımlı maksimum etkiyi gösterdi (sırasıyla $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.0002$, $p = 0.0002$, Şekil 4.2.B).

Takrolimus, 24. saatte $1-1 \times 10^3$ $\mu\text{g/ml}$ doz aralığında kontrol grubuna göre ($p=0.0019$, $p=0.0066$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$) ve 1×10^3 $\mu\text{g/ml}$ dozu daha düşük dozlara göre ($p<0.0001$, $p<0.0004$, $p=0.0001$, $p=0.0336$, Şekil 4.2.B) hücre canlılığını azaltmıştır. Ayrıca 1×10^2 $\mu\text{g/ml}$ takrolimus dozu 1×10^{-1} $\mu\text{g/ml}$ dozuna göre hücre canlılığını azaltmıştır ($p<0.0057$, Şekil 4.2.B).

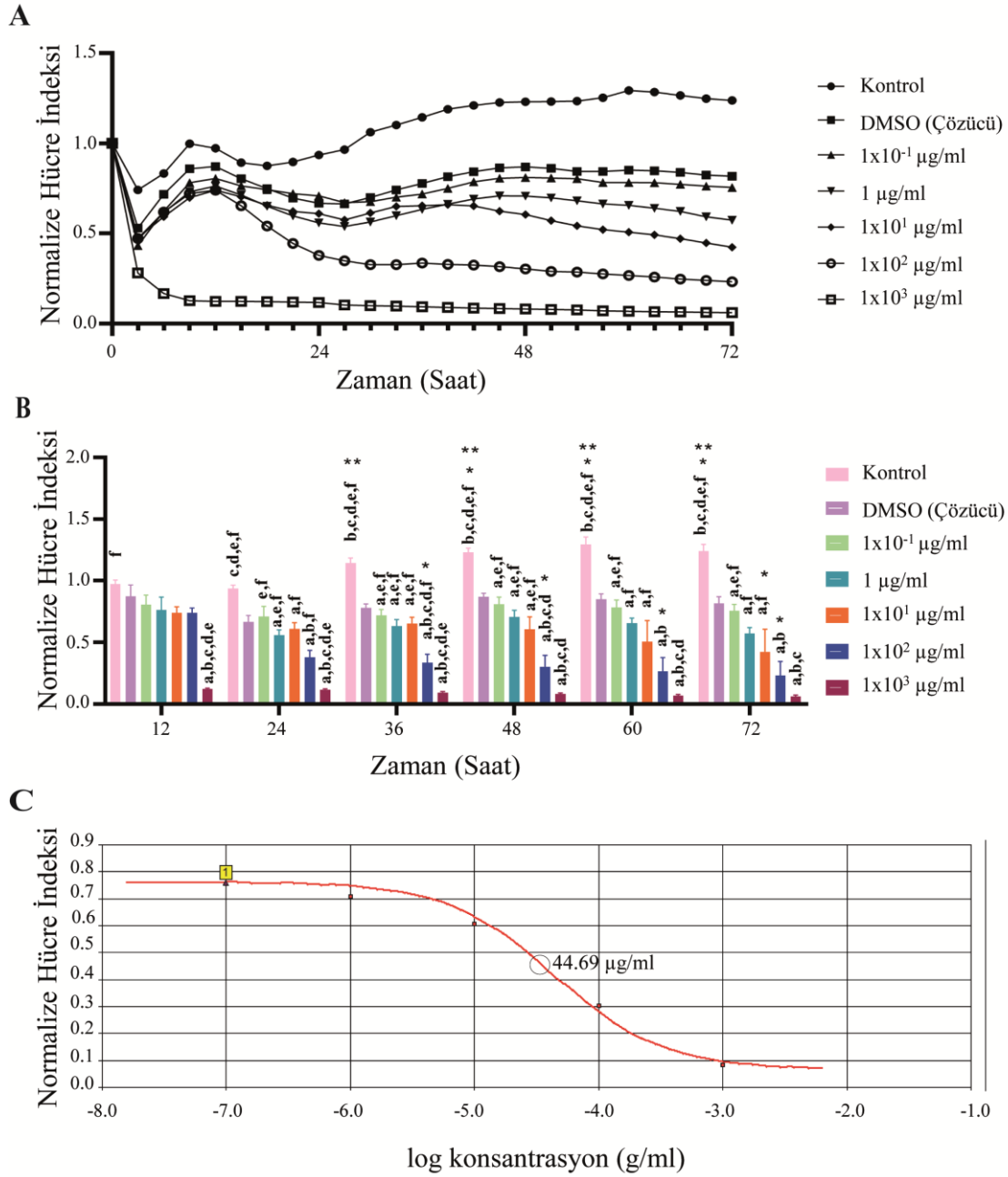
Takrolimus, 36. saatte uygulanan tüm dozlarda ($1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^3$ $\mu\text{g/ml}$) kontrol grubuna göre (sırasıyla $p=0.0002$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$) ve 1×10^3 $\mu\text{g/ml}$ dozu daha düşük dozlara göre (sırasıyla $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0285$, Şekil 4.2.B) hücre canlılığını anlamlı olarak azaltmıştır. Ayrıca 1×10^2 $\mu\text{g/ml}$ takrolimus dozu $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^1$ $\mu\text{g/ml}$ dozlarına göre hücre canlılığını azaltmıştır (sırasıyla $p=0.0006$, $p=0.0058$, $p=0.0033$, Şekil 4.2.B).

Takrolimus, 48. saatte uygulanan tüm dozlarda ($1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^3$ $\mu\text{g/ml}$) kontrol grubuna göre (sırasıyla $p=0.0043$, $p=0.0006$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$) ve 1×10^3 $\mu\text{g/ml}$ dozu $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^1$ $\mu\text{g/ml}$ dozlarına göre (sırasıyla $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p=0.0005$, Şekil 4.2.B) hücre canlılığını azaltmıştır. Ayrıca 1×10^2 $\mu\text{g/ml}$ takrolimus dozu $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^1$ $\mu\text{g/ml}$ dozlarına göre hücre canlılığını azaltmıştır (sırasıyla $p=0.0008$, $p=0.0059$, $p=0.0488$, Şekil 4.2.B).

Takrolimus, 60. saatte uygulanan tüm dozlarda ($1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^3$ $\mu\text{g/ml}$) kontrol grubuna göre (sırasıyla $p=0.0125$, $p=0.0019$, $p=0.0002$, $p<0.0001$, $p<0.0001$) ve 1×10^3 $\mu\text{g/ml}$ dozu $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^1$ $\mu\text{g/ml}$ dozlarına göre (sırasıyla $p=0.0006$, $p=0.0039$, $p=0.0361$, Şekil 4.2.B) hücre canlılığını azaltmıştır. Ayrıca 1×10^2 $\mu\text{g/ml}$ takrolimus dozu 1×10^{-1} $\mu\text{g/ml}$ dozuna göre hücre canlılığını azaltmıştır ($p=0.0116$, Şekil 4.2.B).

Takrolimus, 72. saatte uygulanan tüm dozlarda ($1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^3$ $\mu\text{g/ml}$) kontrol grubuna göre (sırasıyla $p=0.0256$, $p=0.0020$, $p=0.0003$, $p<0.0001$, $p<0.0001$) ve 1×10^3 $\mu\text{g/ml}$ dozu $1 \times 10^{-1} - 1$ $\mu\text{g/ml}$ dozlarına göre (sırasıyla $p=0.0013$, $p=0.0170$, Şekil 4.2.B) hücre canlılığını azaltmıştır. Ayrıca 1×10^2 $\mu\text{g/ml}$ takrolimus dozu 1×10^{-1} $\mu\text{g/ml}$ dozuna göre hücre canlılığını azaltmıştır ($p=0.0147$, Şekil 4.2.B).

Kontrol grubunda zaman içindeki değişim incelendiğinde 36. saatte 24. saate göre ve 48. saatte 12 ve 24. saatlere göre hücre indeksi anlamlı olarak artmıştır (p=0.0490, p=0.0134, p=0.0048). Takrolimus dozlarının zaman içindeki etkisinin değişimi incelendiğinde 1×10^{-1} , 1 ve 1×10^3 µg/ml dozlarının uygulaması 12-72 saat arasında büyüme indeksini değiştirmemiştir. Takrolimusun 1×10^1 µg/ml doz uygulamasının zaman içindeki etkisine bakıldığında 12-72. saat arasında (p=0.0204, Şekil 4.2.B), 1×10^2 µg/ml dozunun ise 12-36, 12-48, 12-60 ve 12-72 saat zaman aralıklarında anlamlı fark bulunmuştur (sırasıyla p=0.0484, p=0.0308, p=0.0186, p=0.0113, Şekil 4.2.B). Takrolimusun 48. saatte HK-2 hücrelerindeki gerçek zamanlı ED50'si 44.69 µg/ml olarak saptanmıştır ($R^2=0.98483$, Şekil 4.2.C).



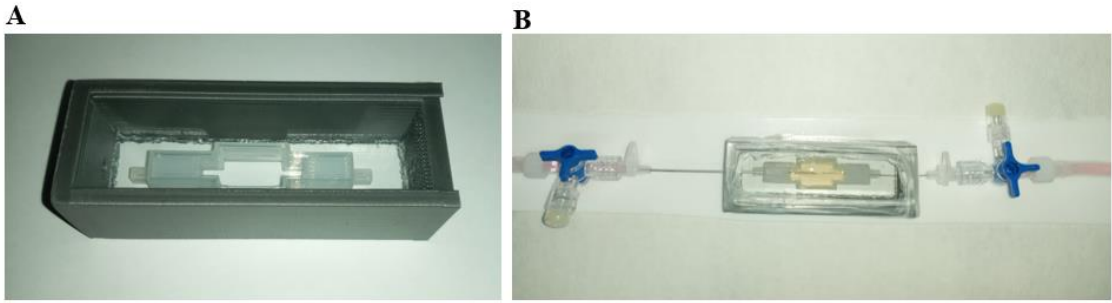
Şekil 4.2. Takrolimusun HK-2 hücrelerindeki antiproliferatif etkisi gerçek zamanlı ve impedans temelli olarak saptanmıştır. A: Zaman içinde değişen doz cevap eğrisi, B: Zamana karşı normalize hücre indeksini her doz için gösteren bar grafiği (a; kontrole göre anlamlı, b; 1×10^{-1} $\mu\text{g/ml}$ doza göre anlamlı, c; 1 $\mu\text{g/ml}$ doza göre anlamlı, d; 1×10^1 $\mu\text{g/ml}$ doza göre anlamlı, e; 1×10^2 $\mu\text{g/ml}$ doza göre anlamlı, f; 1×10^3 $\mu\text{g/ml}$ doza göre anlamlı, *, 12. saate göre anlamlı, **, 24. saate göre anlamlı $p < 0.05$, $n=3$), C: Logaritmik konsantrasyon eğrisi.

4.2. Üç Boyutlu PT Kültür Platformlarının Oluşturulması ve Optimizasyonu

4.2.1 Üç Boyutlu Baskı ile PT Modelinin Tasarımı, Üretimi, Optimizasyonu

4.2.1.1. Üç Boyutlu Baskı ile Kalıbın Tasarımı ve Üretimi

Üç boyutlu yazıcı ile 8x2.9x2.2 cm boyutlarında, üzeri 76x26x1 mm boyutlarındaki cam lam ile kapatılabilen, PLA filamentten oluşan koruyucu çerçeve ve içine konumlandırılan silikon kalıp üretilmiştir (Şekil 4.3).

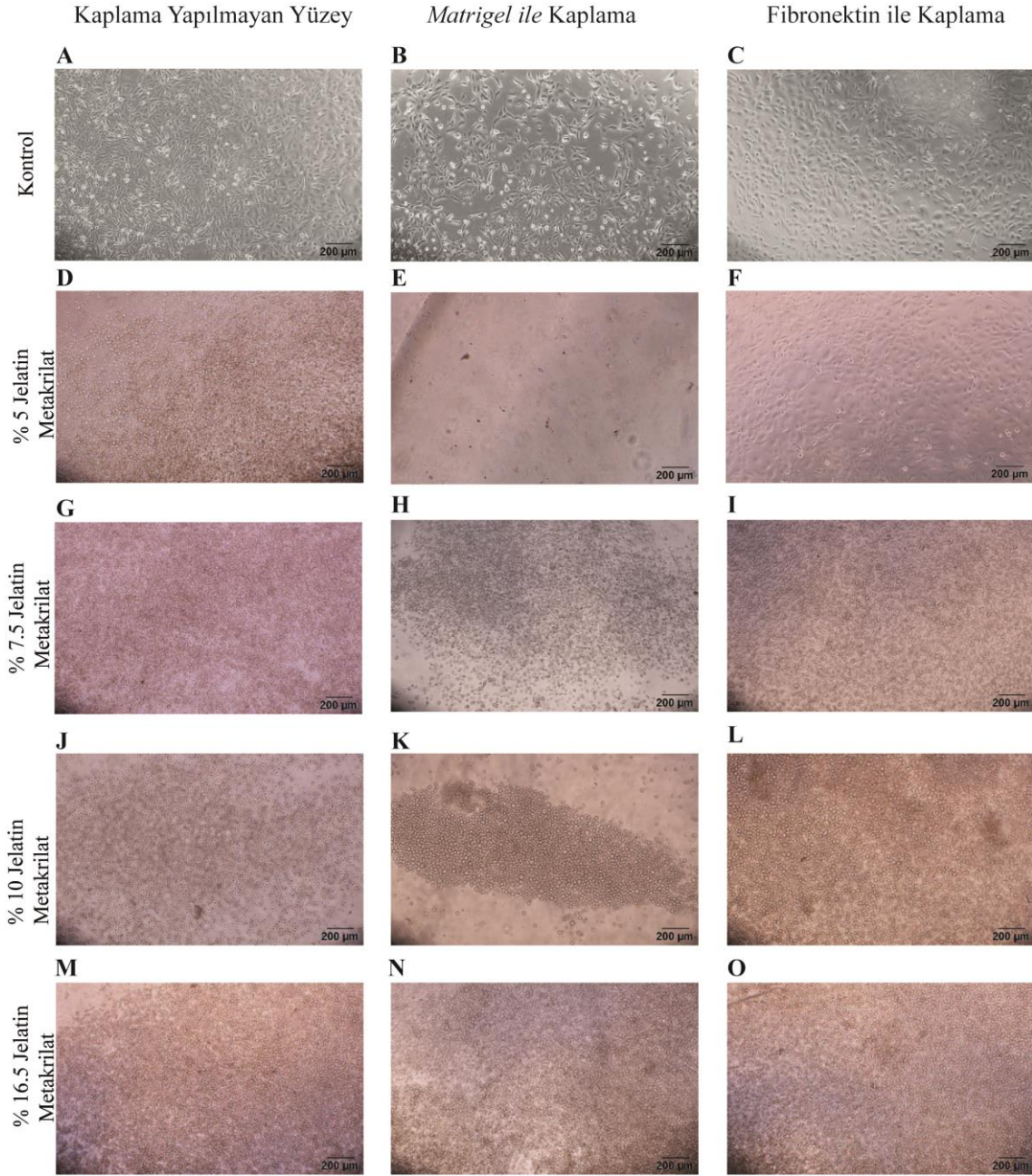


Şekil 4.3. Üç boyutlu yazıcı ile üretilen platform. A: Koruyucu çerçeve (gri) ve içine yerleştirilen silikon kalıp (beyaz), B: Üretilen platforma iğne uçları, üç yollu musluk ve peristaltik kablolar eklendikten sonraki hali gösterilmektedir.

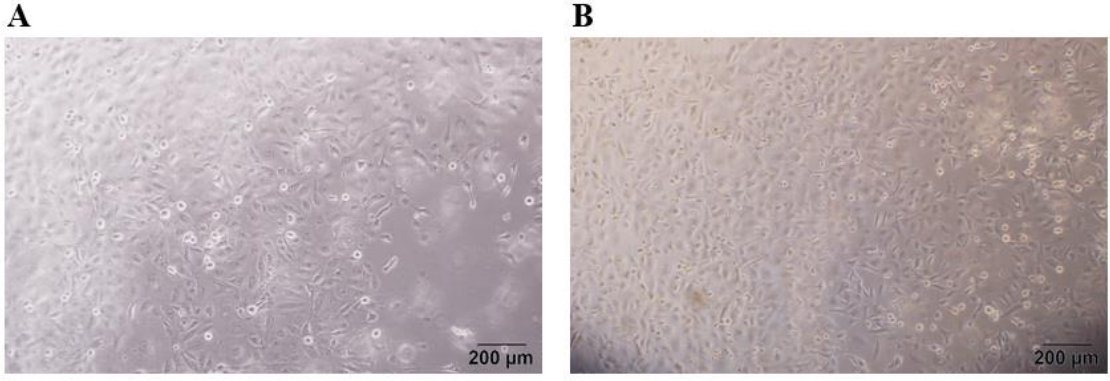
4.2.1.2. Ekstraselüler Matriksin Optimizasyonu

Ekstraselüler matriks olarak kullanılacak uygun malzemenin belirlenmesi için statik kültürde 24 kuyucuklu plakada %5 jelatin metakrilatın fibronektin ile kaplandığı örneklerde HK-2 hücrelerinin 24 saat içinde jel yüzeyine tutunduğu ve 72. saate kadar çoğaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4.F, Şekil 4.5). Fibronektin ile yüzeyi kaplanan %7.5, %10 ve %16,5 jelatin metakrilat konsantrasyonlarının bulunduğu gruplarda HK-2 hücrelerinin 72. saate kadar tutunmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4. I, L, O). Boş kuyucuk içine fibronektin ve *matrigel* ile kaplama yapılan kontrol gruplarında HK-2 hücrelerinin 24 saate kadar tutunduğu ve 72. saate kadar çoğaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4. A-C). Yüzey kaplaması yapılmadan, 24 kuyucuklu hücre kültür plakasına %5 ila %16,5 konsantrasyon aralığında jelatin metakrilatın koyulduğu gruplarda HK-2 hücrelerinin 72. saate kadar jelin yüzeyine tutunmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4. D, G, J, M) Benzer şekilde HK-2 hücrelerinin 72. saate kadar %5 ila %16,5

konsantrasyonları arasında jelatin metakrilatın *matrigel* ile kaplandığı gruplarda HK-2 hücrelerinin jelin yüzeyine tutunmadığı izlenmiştir (Şekil 4.4. E, H, K, N).



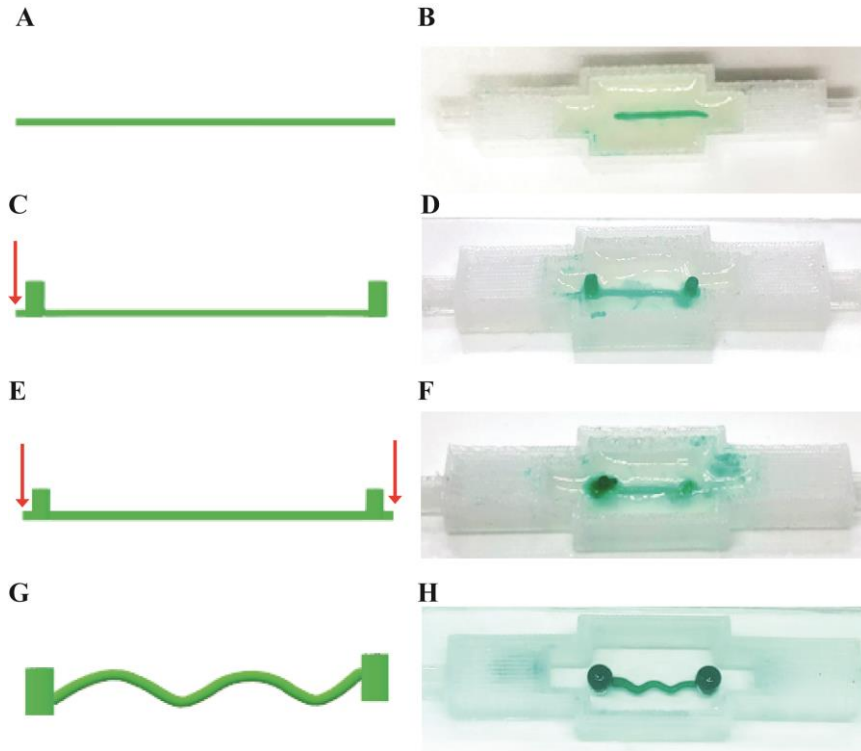
Şekil 4.4. Ekstraselüler matriks üzerine statik koşullarda HK-2 hücrelerinin ekimi. A,B,C,F’de yüzeye tutunan HK-2 hücreleri gösterilmektedir. x100 orijinal büyütme



Şekil 4.5. HK-2 hücrelerinin %5 jelatin metakrilatın fibronektin ile kaplandığı statik koşullarda 48. ve 72. saate ait mikroagrafları. x100 orijinal büyütme

4.2.1.3. Perfüzyon Kanalının Optimizasyonu

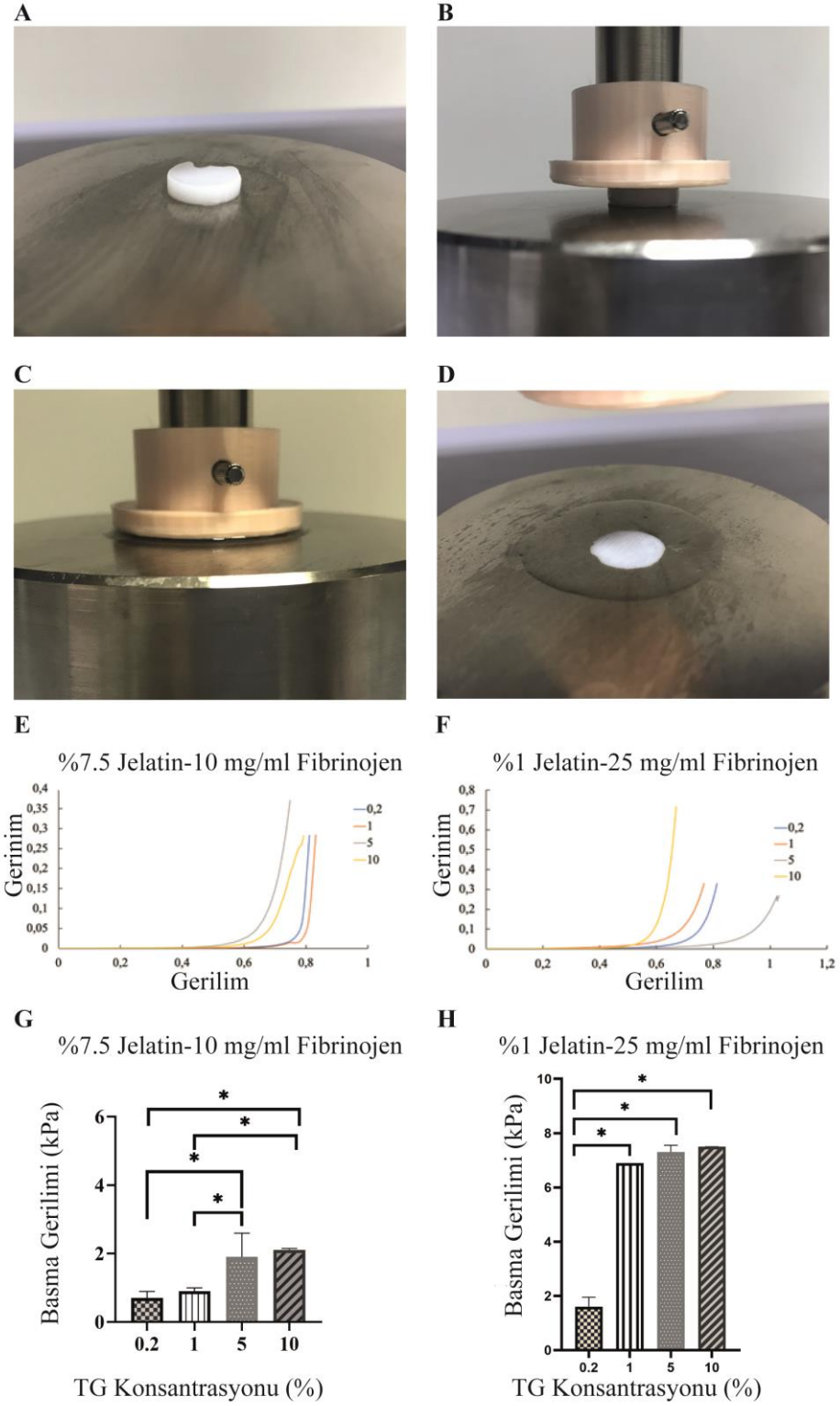
Kanalın ESM üzerindeki 3B baskısının optimizasyonu için 0.2 mm çapında düz kanal modeli (Şekil 4.6.A), tek ve çift yönlü sapma uzunluğu bırakılan düz kanal modelleri (Şekil 4.6. C, E) ve kıvrımlı kanal modeli (Şekil 4.6.G) tasarımları yapılmış ve ESM üzerine 3B baskıları yapıldığında kıvrımlı kanal modeli ve tek yönde sapma uzunluğu bırakılan düz kanal modelinde en optimal baskının elde edildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Perfüzyon kanalının modeli (A, C, E, G) ve kanalın ESM üzerine 3B baskısı (B, D, F, H).

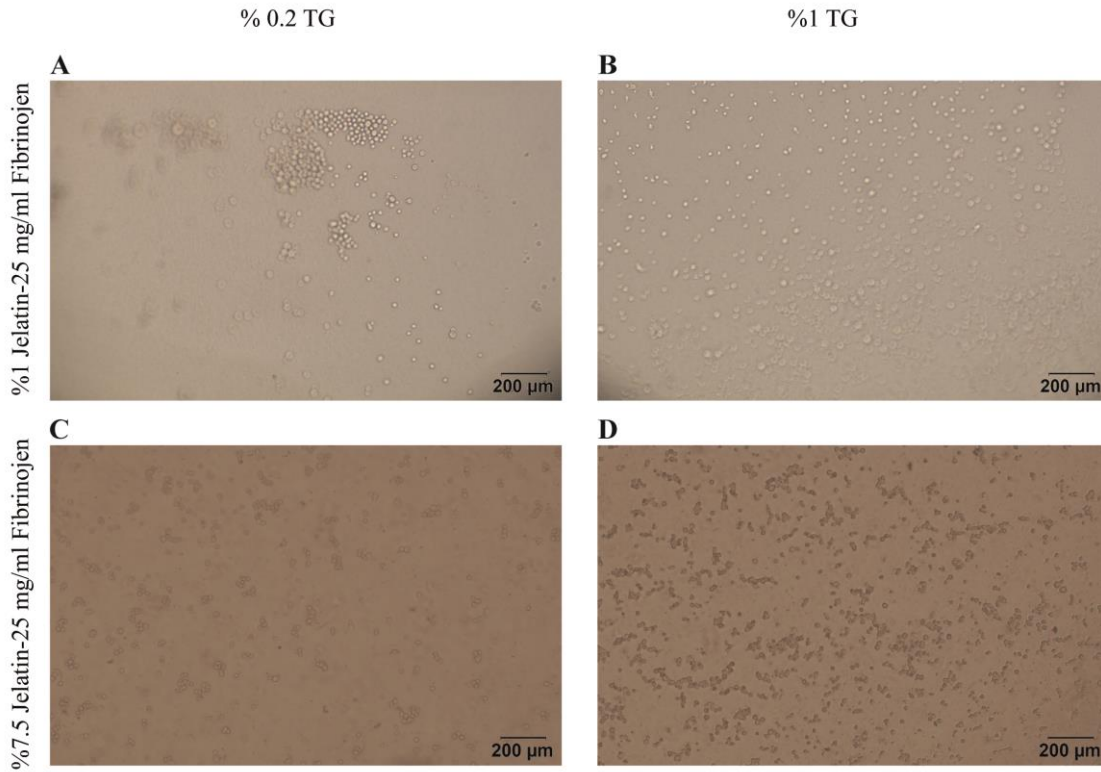
4.2.1.4. Seçilen Ekstraselüler Matriksin Biyomekanik Analizi

Ekstraselüler matriks olarak kullanılan jelatin ve fibrinojen karışımlarının mekanik özellikleri değerlendirildiğinde, jelatin ile enzimatik çapraz bağlanma sağlayan TG konsantrasyonundaki artışın basma geriliminde artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Değişen TG konsantrasyonlarından bağımsız olarak %1 jelatin ve 25 mg/ml fibrinojen içeren ESM'nin %7.5 jelatin ve 10 mg/ml fibrinojen içeren ESM ile mekanik özellikleri karşılaştırıldığında fibrinojen konsantrasyonunun artırılmasının mekanik olarak daha stabil bir ESM yapısı oluşturduğu gözlemlenmiştir. Yük altında şeklini koruyabilme özellikleri değerlendirildiğinde TG konsantrasyondaki artışının basma geriliminde artışa sebep olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$, Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Ekstraselüler matriksin biyomekanik analizi. A-D: Evrensel test makinesinde basma testi uygulaması, E, G: %7.5 jelatin ve 10 mg/ml fibrinojen içeren jelin gerinim/gerilim eğrisi ve jelin basma gerilimi grafiği, F, H: %1 jelatin ve 25 mg/ml fibrinojen içeren jelin gerinim/gerilim eğrisi ve jelin basma gerilimi grafiği.

Biyomekanik analizi yapılan ESM karışımlarında en yüksek iki TG konsantrasyonunun jelin berraklığını etkilemesi ve %1 TG konsantrasyonu ile daha yüksek iki TG konsantrasyonunun mekanik dayanımları arasında fark bulunmaması nedeniyle %0.2 ve %1 TG konsantrasyonlarının statik koşullarda HK-2 hücrelerinin tutunmasına etkisi değerlendirilmiştir. Statik koşullarda 24 kuyucuklu hücre kültür plakasına bırakılan %1 jelatin-25 mg/ml fibrinojen ve %7.5 jelatin-10 mg/ml fibrinojen ile %0.2-%1 TG içeren ESM üzerine HK-2 hücrelerinin tutunmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Değişen konsantrasyonlarda jelatin-fibrinojen karışımlarına statik koşullarda HK-2 hücrelerinin ekiminden 24 saat sonraki mikrografları. x100 orijinal büyütme

4.2.2. Üç Boyutlu PT Mikroakışkan Kültür Platformunda Kanalin Oluşturulması

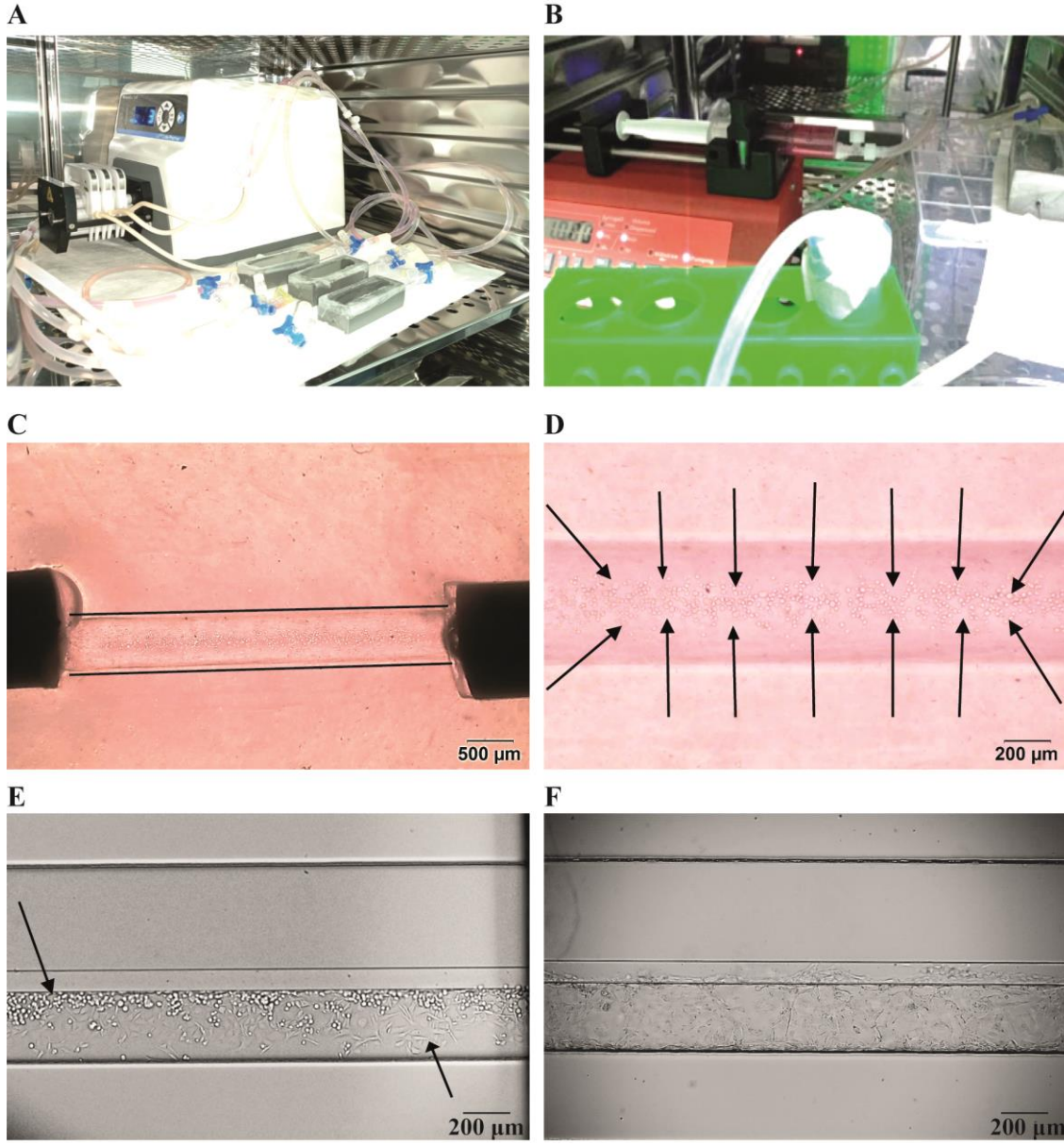
Ekstraselüler matriksin jel kanalına yüklemesi yapıldıktan sonra mikroskopla gözlem penceresinden bakıldığında kanal içerisine doğru yüklendiği, faz ayrımının korunduğu düzgün bir kanal oluşturulduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.9.E).

4.3. Üç Boyutlu PT Modelinde Takrolimus Kaynaklı Akut Hasarın Oluşturulması ve Değerlendirilmesi

4.3.1. Perfüzyon Kanalına HK-2 Hücrelerinin Ekimi ile 3B-PT Modellerinin Oluşturulması

Üç boyutlu baskı ve döküm yöntemi ile oluşturulan kanalın içine ekimi yapılan HK-2 hücrelerinin perfüzyon pompası (Şekil 4.9.A) ile 3 rpm (4.32 ml/dk) akış başlatıldıktan sonra %5-%16,5 jelatin metakrilat konsantrasyonları ve jelatin fibrinojen karışımı olan tüm ESM gruplarında jelin iç yüzeyine tutunmadığı ve üçüncü günden sonra çıkış kısmından toplanan ortam perfüzesinde pelletler halinde hücreler görülmüştür. Şırınga pompası (Şekil 4.9.B) ile dakikada 1 µl akış hızı sağlandığında 12 saat içinde HK-2 hücrelerinin kanalın çıkışına yığılma eğilimi gösterip yaklaşık 24 saat sonra kanalın içinden tamamen uzaklaştıkları görülmüştür. Ekstraselüler matriks optimizasyonunda HK-2 hücrelerinin tutunduğu konsantrasyon olan %5 jelatin metakrilat ile oluşturulan kanalın içerisine fibronektin kaplama işlemi sonrası kanaldaki akış devam ettirilememiş ve dolayısıyla ESM optimizasyonunda statik koşullarda belirlenen özellik 3B platformda sağlanamamıştır. HK-2 hücreleri jel yüzeyine tutunmadığı için (Şekil 4.9.C-D) 3B baskı ile elde edilen platformda ileri deneyler gerçekleştirilememiştir.

Mikroakışkan platformunda perfüzyon kanalına ekimi yapılan HK-2 hücrelerinin 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ koşullarında, nemlendirilmiş inkübatörün içinde 45° açı ile dört saat inkübasyondan sonra tutunmaya başladığı (Şekil 4.9.E) ve altı gün süreyle aralıklı salınım cihazının üzerinde perfüzyon sağlandıktan sonra bariyer bütünlüğünün olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.9.F).



Şekil 4.9. Perfüzyon kanalına HK-2 hücrelerinin ekimi ile 3B-PT modellerinin oluşturulması. A: 3B baskı ile üretilen platformların perfüzyon pompasına bağlandıktan sonra inkübatörün içine yerleştirilmesi, B: 3B baskı ile üretilen platformların şırınga pompası ile inkübatörün içine yerleştirilmesi, C: Kanal içine HK-2 hücrelerinin ekimi yapıldığı sırada kanalın mikrografı (kanalın bulunduğu yer siyah çizgilerle gösterilmiştir), D: Kanal içindeki HK-2 hücreleri (siyah oklar), E: Mikroakışkan platformunda HK-2 hücrelerinin dört saat inkübe edildikten sonra tutunmaya başladıkları (siyah oklar), F: Mikroakışkan platformunda kültürün 6. gününde kanalın tümünü kaplayan HK-2 hücreleri gösterilmiştir. x100 orijinal büyütme

4.3.2. HK-2 Hücre Kültür Platformlarında Takrolimus Nefrotoksisite Modelinin Oluşturulması

Takrolimus uygulaması öncesinde 2B platformda kuyucuğun ve 3B mikroakışkan platformunda kanalın içini karakteristik kaldırım taşı morfolojisinde kapladığı izlenen HK-2 hücrelerinin takrolimus uygulamasının ardından 24. ve 48. saatlerde bu görünümünü kaybederek sayıca azaldığı izlenmiştir (Şekil 4.10, Şekil 4.11).

4.3.3. Takrolimus Nefrotoksisitesinin 2B ve 3B Mikroakışkan Platformunda Yapısal ve Fonksiyonel Olarak Değerlendirilmesi

4.3.3.1. Yapısal Değerlendirme

Lateral Sıkı Bağlantı Birimleri (ZO-1) ve Hücre İskeleti Bileşenlerinin (Asetillenmiş α tübülün) İmmün İşaretleme ile Değerlendirilmesi

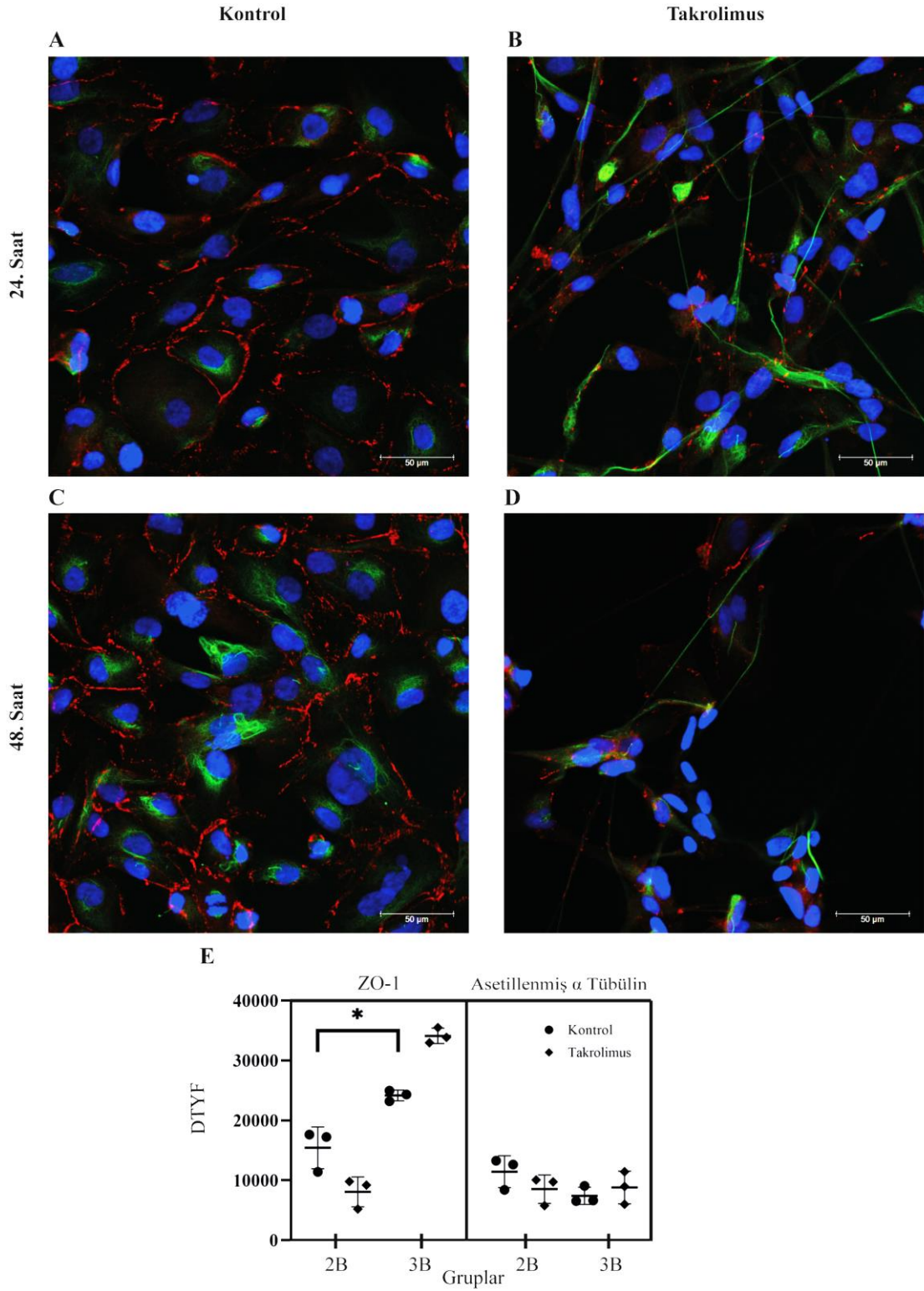
Statik düzenekte takrolimusun ED50'de uygulandığı gruplarda 24. saatte HK-2 hücrelerinin sıkı bağlantı birimlerine spesifik ZO-1 DTFY'sinde kontrole göre anlamlı fark bulunmamaktadır. Statik düzenek ve mikroakışkan platformunda takrolimus verilmeyen kontrol grupları karşılaştırıldığında 24. saatte ZO-1 immün işaretlenme şiddeti mikroakışkan platformunda anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0.0072$, Şekil 4.10)

Statik düzenekte takrolimusun ED50'de uygulandığı gruplarda 24. saatte hücre iskeleti bileşeni asetillenmiş α tübülün için immün işaretlenme şiddetinde kontrole göre anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Statik düzenek ve mikroakışkan platformunda takrolimus verilmeyen kontrol grupları karşılaştırıldığında 24. saatte asetillenmiş α tübülün işaretlenmesinde fark yoktur. Statik düzenekte 48. saatte takrolimus uygulanmayan kontrol gruplarında hücreler canlılığını yitirdiği için statik koşullarda 48. saatte istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

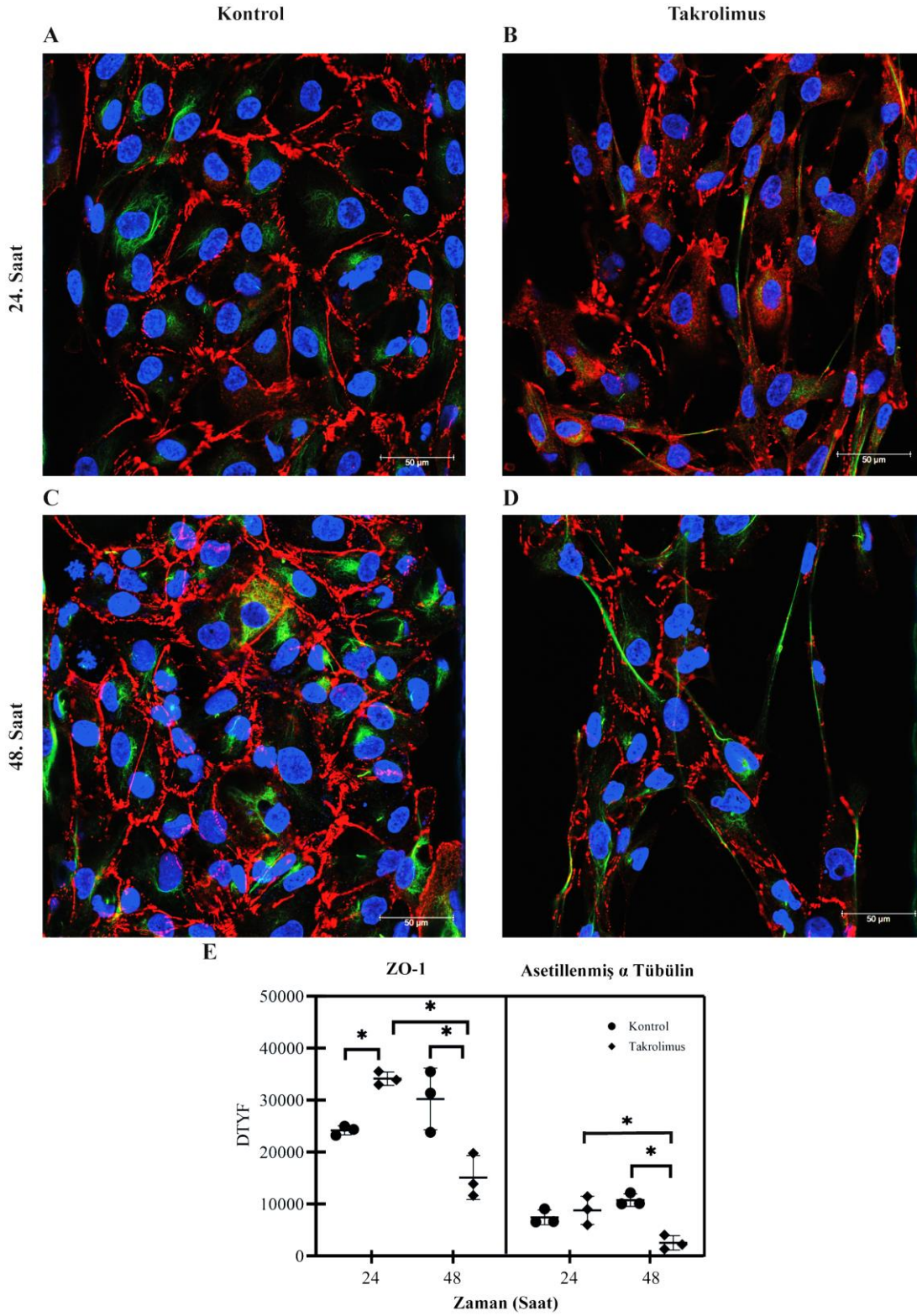
Mikroakışkan platformunda takrolimusun ED50'de uygulandığı gruplarda 24. saatte HK-2 hücrelerinin sıkı bağlantı birimlerine spesifik ZO-1 DTFY'si kontrole göre anlamlı olarak artırmış ($p=0.045$), 48. saatte ise azalmıştır ($p=0.0047$, Şekil 4.11).

Mikroakışkan platformunda takrolimus ED50'de ZO-1 immün işaretlenme şiddetini 48. saatte 24. saate göre azaltmıştır ($p=0.0011$, Şekil 4.11). Bu sonuçlar takrolimusun 48. saatte mikroakışkan platformundaki 3B-PT modelinde sıkı bağlantı birimlerine zarar vererek epitel bariyerini bozduğunu göstermektedir.

Mikroakışkan platformunda takrolimusun ED50'de uygulandığı gruplarda 24. saatte hücre iskeleti bileşeni asetillenmiş α tübülünün immün işaretlenme şiddeti anlamlı bir farklılık göstermezken, 48. saatte önemli derecede azalmıştır ($p=0.0022$, Şekil 4.11). Mikroakışkan platformunda takrolimus ED50'de 48. saatte 24. saate göre asetillenmiş α tübülün immün işaretlenme şiddetini azaltmıştır ($p=0.012$, Şekil 4.11).



Şekil 4.10. Statik 2B kültür platformunda ZO-1 ve asetillenmiş α tübülün immün işaretleme sonuçları. A-D: 2B kültür platformunda immün işaretleme sonrası mikrograflar (mavi: hücre çekirdeği, kırmızı: ZO-1, yeşil: asetillenmiş α tübülün), E: saçılım grafiği (*, $p < 0.05$, $n=3$). x400 orijinal büyütme

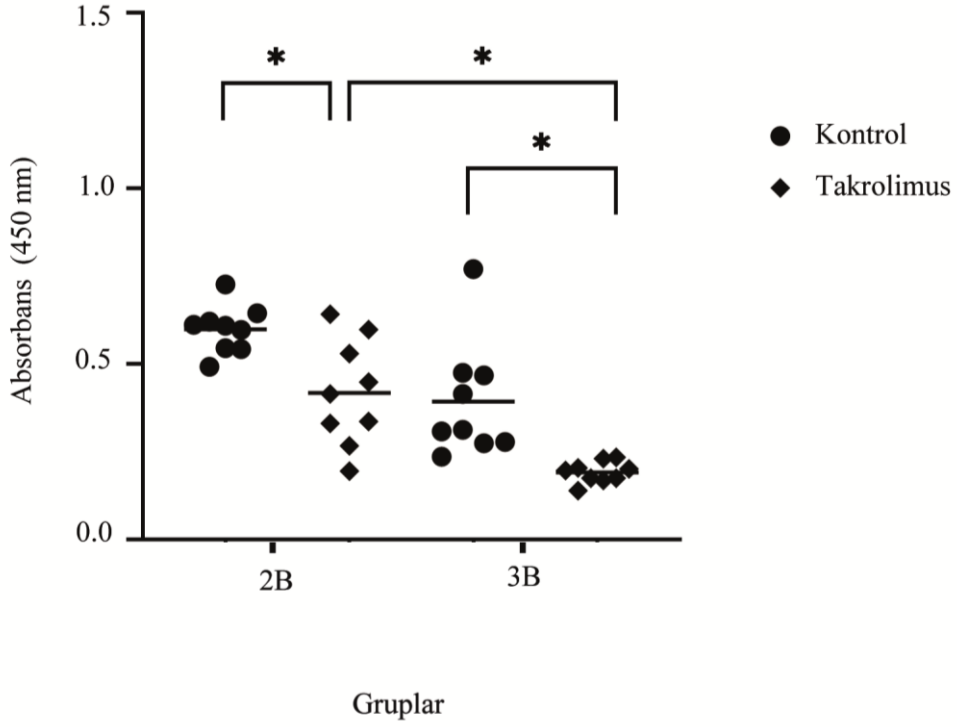


Şekil 4.11. Mikroakışkan platformunda ZO-1 ve asetillenmiş α tübülün immün işaretleme sonuçları. A-D: Mikroakışkan platformunda immün işaretleme sonrası mikrograflar (mavi: hücre çekirdeği, kırmızı: ZO-1, yeşil: asetillenmiş α tübülün), E: saçılım grafiği (*, $p < 0.05$, $n=3$). x400 orijinal büyütme

4.3.3.2. Fonksiyonel Değerlendirme

HK-2 Hücre Canlılığının WST-1 Tekniği ile Değerlendirilmesi

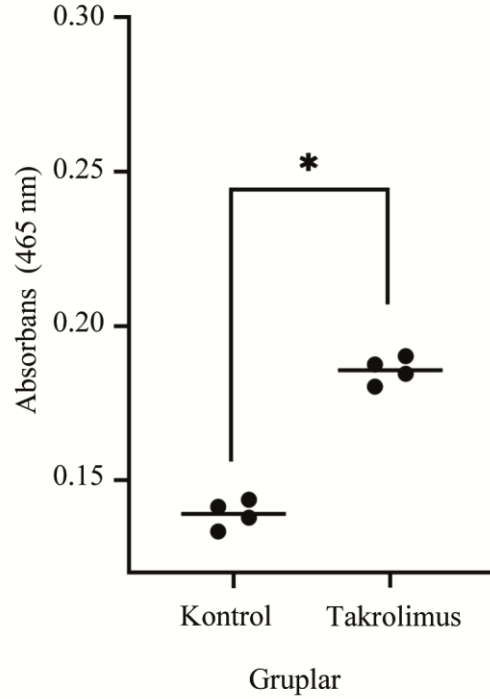
Statik koşullarda takrolimus ED50'de uygulandığında kontrol grubuna göre 48. saatte HK-2 hücrelerinin proliferasyon hızını anlamlı olarak düşürmüştür ($p=0.0138$, Şekil 4.12). Mikroakışkan platformunda takrolimus ED50'de uygulandığında kontrol grubuna göre HK-2 hücrelerinin proliferasyon hızını anlamlı olarak düşürmüştür ($p=0.0053$, Şekil 4.12). İki platformdan elde edilen sonuçlar birbiri ile kontrol gruplarında benzerlik gösterirken takrolimus ED50'de mikroakışkan platformunda statik koşullara göre hücre proliferasyon hızının daha az olduğu gösterilmiştir ($p=0.0016$, Şekil 4.12).



Şekil 4.12. WST-1 ile takrolimusun HK-2 hücrelerinin canlılığına etkisini gösteren saçılım grafiği. Takrolimus kontrol grubuna göre HK-2 hücre canlılığını 2B ve 3B kültür sistemlerinde anlamlı olarak azaltmıştır (*, $p < 0.05$, $n=9$).

Albüminin Geri Alımının Kolorimetrik Olarak Değerlendirilmesi

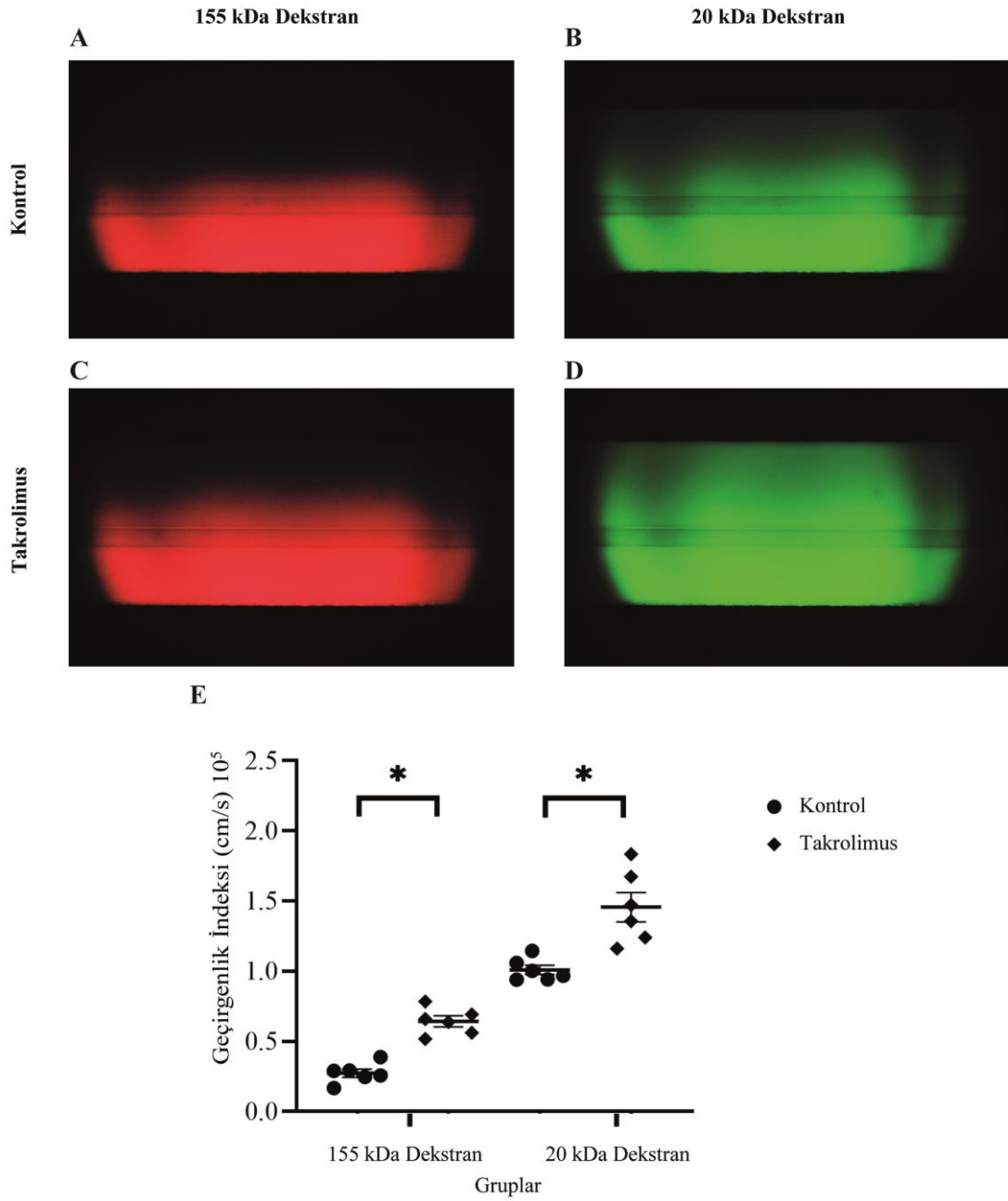
Mikroakışkan platformunda perfüzat içine verilen işaretli albüminin, 1 saat inkübasyonun sonunda toplanan perfüzat içindeki miktarı ED50'de takrolimus uygulandığında kontrol grubuna göre daha yüksek çıkmıştır ($p<0.0001$, Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Takrolimusun mikroakışkan platformunda HK-2 hücrelerinin albümin geri alımına etkisi. Takrolimus uygulaması ile albümin geri alımının kontrol grubuna göre bozulduğu gösterilmektedir ($n=4$, *, $p<0.05$).

Dekstran Moleküllerinin Geçirgenlik İndeksleri ile Epitel Bariyer Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Mikroakışkan platformunda ED50'de uygulandığında takrolimusun 48. saatte 155 kDa dekstran molekülüne karşı geçirgenliği kontrol grubuna göre 2.3 kat arttırdığı gösterilmiştir ($p<0.0001$, Şekil 4.14). Takrolimusun 20 kDa dekstran molekülüne karşı geçirgenliği kontrol grubuna göre 1.4 kat artırdığı gösterilmiştir ($p=0.0072$, Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Dekstran moleküllerinin geçirgenlik indeksleri ile PT epitel bariyer bütünlüğünün değerlendirilmesi. A-D: Takrolimus kaynaklı PT epitel hasarında bariyer bütünlüğünün değerlendirilmesine ilişkin mikrograflar, E: ortalama \pm standart hata grafiği (n=6, *, p<0.05). Takrolimus uygulaması kontrol grubuna göre epitelin bariyer bütünlüğünü bozmaktadır.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında; takrolimusun HK-2 hücrelerindeki etkili doz penceresi 12-36 saat aralığında 1×10^2 µg/ml olarak bulunmuştur. Gerçek zamanlı yarı maksimum antiproliferatif ED50'si 48. saatte 44.69 µg/ml olarak saptanmıştır. Biyomühendislik yaklaşımlarıyla 3B baskı yöntemi ile insan proksimal tübülüne ait perfüzyon kanalı üretilerek akış sağlanmıştır ancak HK-2 hücreleri akış sağlanan kanala ait ESM'ye 72. saate kadar tutunmamıştır. Bu nedenle 3B baskı ile elde edilen PT modelinde ileri deneyler gerçekleştirilememiştir. Mikroakışkan platformunda HK-2 hücreleri ile sızdırmaz epitel bariyerine sahip 3B-PT modeli başarıyla oluşturulmuştur. Submaksimal dozda takrolimus uygulaması sonrası epiteldeki yapısal hasar sıkı bağlantı bileşeni ZO-1 ve hücre iskeleti bileşeni asetillenmiş tübülün immün işaretlenmesindeki azalma ile; fonksiyonel hasar hücre canlılığındaki azalma, albümin geri alımının kaybı ve dekstran moleküllerine olan geçirgenliğin artışı ile ortaya konmuştur. Mikroakışkan platformunda kültüre edilen HK-2 hücrelerinin tübül hasarına statik düzenekte kültüre edilenlere göre daha duyarlı oldukları sonucuna varılmıştır.

1. Araştırma Hedefi: Takrolimusun HK-2 hücrelerindeki etkili doz penceresi 12-36 saat aralığında 1×10^2 µg/ml olarak bulunmuştur. Gerçek zamanlı yarı maksimum antiproliferatif ED50'si 48. saatte 44.69 µg/ml olarak saptanmıştır.

HK-2 hücrelerine 1×10^{-1} - 1×10^4 µg/ml dozlarında takrolimus uygulanmış ve 72 saate kadar hücre indeksi takip edildiğinde 24. saatten itibaren tüm zaman noktalarında ve uygulanan her dozda kontrol grubuna göre hücre canlılığını azalttığı görülmüş ve 48. saatte gerçek zamanlı ED50'si 44.69 µg/ml olarak bulunmuştur. Literatürde takrolimusun tek doz uygulaması ile etkilerini *in vitro* hücre canlılığı testleriyle değerlendiren diğer çalışmalarda HK-2 hücreleri üzerinde 15-60 µg/ml doz aralığında uygulanmış ve uygulanan doz aralığında sitotoksik etkileri bildirilmiştir [69, 70, 72, 73, 75-80, 82, 83]. Bu açıdan 48. saatte belirlediğimiz ED50 dozu literatürde hücre canlılık testi ile sitotoksik etkinin izlendiği doz aralığında yer almasına karşın bu tez çalışmasında geniş bir aralıkta ve logaritmik olarak artan dozlarda takrolimus uygulanmış ve gerçek zamanlı olarak hücre indeksleri değerlendirilerek ED50'si belirlenmiştir.

Literatürde *in vitro* nefrotoksisiteyi değerlendirmek için insan PTEH hattı olan RPTEC/TERT1 ticari hücre hattı üzerinde takrolimusun etkisini 14 gün süreyle gerçek zamanlı değerlendiren çalışma 100 µM (80 µg/ml) dozda etki gösterdiğini bildirmiştir [121]. Bu tez çalışmasında ve söz konusu diğer çalışmada kullanılan hücrelerin her ikisi de insan PTEH olmasına karşın ölümsüzleştirme yolları birbirinden farklıdır ve ölümsüzleştirme yollarının farklılığı PTEH'in ksenobiyotik alım ve salgılanma mekanizmalarında değişikliklere yol açmaktadır [126]. Bu yönüyle sonuçlar arasındaki farklılığın temel sebebi kullanılan hücre hattından kaynaklanıyor olabilir. Öte yandan RPTEC hücrelerinde tek doz takrolimus uygulaması sonrası hücre canlılığı testi yapan diğer bir çalışmada takrolimusun 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarda sitotoksik etkisi, hücrelerin morfolojisinin bozulduğu ve fibrotik belirteçleri indüklediği bildirmiştir [75]. Bu tez çalışmasında kullandığımız ilaç araştırmalarında en sık kullanılan güvenilirliği yüksek bir yöntemdir [127, 128] ve bu açıdan takrolimusun HK-2 hücrelerindeki gerçek zamanlı ED50'sini geçerli ve güvenilir bir yöntem ile bildirmekteyiz.

Araştırma Hedefi 2: Biyomühendislik yaklaşımlarıyla 3B-PT kültür platformunun oluşturulması ve optimizasyonu kapsamında; 3B baskı yöntemi ile perfüzyon sisteminin bağlanabildiği bir platform üretilmiş, ESM optimizasyonunda %5 jelatin metakrilatın fibronektin ile kaplanmasıyla HK-2 hücrelerinin jel yüzeyine tutunduğu belirlenmiş, kanal oluşturulmuş, perfüzyon sağlanmış ancak HK-2 hücreleri akış sağlanan kanala ait ESM'ye 72. saate kadar tutunmamıştır; ticari mikroakışkan platformunda HK-2 hücreleri ile 3B-PT modeli oluşturulmuştur.

Üç boyutlu baskı ile PT modelinin oluşturulması için, 3B yazıcı kullanılarak bir kalıp tasarlanıp üretilmiştir. Literatüre uyumlu şekilde jelatin, fibrinojen, TG, kalsiyum klorür ve trombinden oluşan ESM kullanılmış ve çıkarılabilir mürekkep ile kanal baskısı alınmıştır [25, 27]. Üst ESM katmanı bırakıldıktan ve çapraz bağlanma tamamlandıktan sonra çıkarılabilir mürekkep uzaklaştırılmış ve perfüzyon sağlanmıştır. Hücrelerin ekimi için HK-2 hücreleri kanala verildikten sonra kanal içindeki durumu her gün kontrol edilmiş olmasına karşın HK-2 hücreleri kanal içerisinde tutunmamış ve akış ile birlikte kanaldan uzaklaşmıştır. Hücreler kanal içine tutunmadığı için ESM 24 kuyucuklu hücre plakasına dökülmüş ve statik koşullarda üzerine HK-2 hücrelerinin ekimi yapılmıştır. Ancak statik koşullarda da HK-2 hücreleri ESM üzerine tutunmamıştır. Literatürde 3B baskı yöntemleri ile PT modeli oluşturmak için jelatin, fibrinojen, TG, kalsiyum klorür

ve trombinden oluşan ESM kullanılan, aktif perfüzyonun sağlandığı çalışmalarda RPTEC hücre hattı kullanılmış olup HK-2 hücre hattı kullanılmamıştır [25, 27]. Her iki hücre hattı da PTEH olmasına karşın farklı ölümsüzleştirme yolları ile üretilmiştir. Bu durum hücrelerin polarizasyonunu ve yüzey taşıyıcılarını ifade etme durumlarını etkilemesi sebebiyle ESM üzerinde tutunma ve çoğalma davranışları arasında farklılık olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca jelatin içeren ESM karışımları genel itibariyle hücrelerin tutunduğu biyouyumluluğu yüksek bir malzeme olmasına karşın ESM'nin sertliği, esnekliği ve por yapısının özellikleri PTEH'in jel üzerinde tutunması ve canlılığını devam ettirebilmesini belirleyen önemli parametreler olduğu bildirilmiştir [129, 130]. Ekstraselüler matriksin biyomekanik analizi sonucunda %1 jelatin 25 mg/ml fibrinojen konsantrasyonu içeren ESM'nin dayanımı daha yüksek olduğu belirlenmiş ancak statik koşullarda %1 jelatin 25 mg/ml fibrinojen konsantrasyonunda HK-2 hücreleri tutunmamıştır.

Üç boyutlu baskı ile üretilen düzenekte perfüzyonun peristaltik boruların bağlandığı bir peristaltik pompa veya şırınga pompası ile sağlanması, bir süre sonra akışla birlikte sistem içinde hava kabarcıklarının oluşması ve bu hava kabarcıklarının kanal içine girerek kanalda kontrolsüz bir akış gerçekleşmesine neden olduğu görülmüştür. Bu durum kayma gerilimini değiştirerek HK-2 hücrelerinin kanalda tutunamamasına yol açmaktadır. Bununla ilgili çalışmalarda dinamik sistemlerde kayma gerilimindeki küçük değişimlerin bile PTEH'in tutunması açısından oldukça önemli bir faktör oluşturduğu ve kayma gerilimindeki artışın PTEH'in canlılığını olumsuz etkilediği bildirilmiştir [129]. Hava kabarcıklarının kanal içine kontrolsüz geçişi standart bir kayma gerilimi oluşturulamamasına neden olmaktadır. Hava kabarcıklarının kontrolsüz geçişini önlemek için yöntem bölümünde tarif edildiği gibi sisteme 3 yollu muslukların bağlanıp besiyeri ve hücre ekiminin yapılması sırasında sisteme hava girişi minimuma indirilmiş olmasına karşın bu durumun tamamen önüne geçilememiştir. Bu sorunu önlemek için peristaltik borular giriş ve çıkış noktasına yakın bir noktada klemler ile sıkıştırılabilir ve hava kabarcıklarını toplayan ayrı bir mekanizma sisteme dahil edilebilir [27].

Yöntem bölümünde tarif edildiği üzere ESM optimizasyonu için *matrigel* ve fibronektin ile yüzey kaplamalarını içeren statik koşullarda hücre ekimi yapılmış ve %5 jelatin

metakrilat üzerine fibronektin kaplama yapıldığında HK-2 hücrelerinin tutunup çoğaldığı gözlemlenmiştir. Statik koşullarda HK-2 hücrelerinin tutunduğunu belirlediğimiz fibronektin yüzey kaplaması protokolüne uygun olarak kanalın içi fibronektin ile kaplanmıştır. Ancak fibronektin kaplama yapılmadan önce perfüzyonun sağlandığı bir kanal oluşturulmuş olmasına karşın fibronektin ile kaplama sonrası kanal yapısı bozulmuş ve akışın devamlılığı sağlanamadığı için HK-2 hücrelerinin ekimi yapılamamıştır. Kanal içinin fibronektin ile kaplanabilmesi için perfüze edilerek ve fibronektin konsantrasyonu düşürülerek kaplama çalışmaları da yapılmış olmasına karşın kaplama sonrası kanalda akış elde edilmemiştir. Kanal yapısının fibronektin kaplama sonrası bozulması, küçük bir alan içine verilen fibronektinin kaplama esnasında düzensiz bir yapı oluşturduğunu ve bu nedenle kanalı bozduğunu düşündürmektedir. Fibronektin ile jel üzerinde yüzey kaplamasının HK-2 hücrelerinin tutunması için önemli parametre olduğu belirlendiğinden kanal çapı genişletilerek kaplama denenebilir.

Üç boyutlu PT modelinin oluşturulması için biyomühendislik yaklaşımlarıyla üretilen ticari mikroakışkan kültür platformu ile 3B kültür sisteminde bariyer işlevine sahip PT oluşturulmuştur. HK-2 hücrelerinin 3B mikroakışkan platformunda, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren ortamda, 7° açı ve 8 dakika aralıklı salınım cihazı ile akış sağlanırken altıncı günde sızdırmaz bir bariyer yapısı oluşturduğu belirlenmiştir. Literatürde ticari mikroakışkan plaka ile yapılan önceki çalışmalarda benzer şekilde 7-10 gün arasında bariyer yapısı oluşturduğu bildirilmiştir [21, 22].

Üç boyutlu baskı ile üretilen platformda PT modeli; insandaki yapıya benzer şekilde kıvrımlı bir kanal oluşturan, tübül içinden akışın geçirildiği, ticari mikroakışkan platformlara göre daha az maliyetli ve kolay ulaşılabilir bir sistem sağlayabilir. Öte yandan tübül içinden akış geçirilmesi için peristaltik borular ve pompa sisteminin varlığı, hava kabarcıklarının girişi ile kayma geriliminde standardın oluşturulamaması uygulamayı zorlaştıran faktörlerdendir. Ticari mikroakışkan platformu üzerinde sağlanan perfüzyonda ise peristaltik borular ve bir pompa sistemine gerek duyulmadığından daha kolay ve optimal bir düzenek sağlayarak mikrokanallar içinde standardize bir akış ve kayma gerilimi sağlanmaktadır. Akışın tübül içinden aktif

şekilde geçmiyor olması bir dezavantaj oluşturmasına karşın PTEH'in canlılığı ve morfolojik özelliklerini koruması için kayma geriliminin standardize bir şekilde sağlanması yönüyle avantaja sahiptir.

Literatürde ticari mikroakışkan platformunda farklı ajanlarla nefrotoksisite çalışmaları yapılmış [21, 22, 51, 131, 132] olmasına karşın takrolimus kaynaklı nefrotoksisite 3B-PT modelinde ilk kez bu tez çalışmasında değerlendirilmiştir.

3. Araştırma Hedefi: Üç boyutlu PT modelinde takrolimus kaynaklı akut hasar oluşturulmuş ve test edilmiştir.

Submaksimal dozda takrolimus uygulaması sonrası mikroakışkan platformunda oluşturulan 3B-PT modelinde, epiteldeki yapısal hasar sıkı bağlantı bileşeni ZO-1 ve hücre iskeleti bileşeni asetillenmiş tübülün immün işaretlenmesindeki azalma ile; fonksiyonel hasar hücre canlılığındaki azalma, albümin geri alımının kaybı ve dekstran moleküllerine olan geçirgenliğin artışı ile ortaya konmuştur.

Takrolimus kaynaklı hasarın yapısal değerlendirmesinde, 3B mikroakışkan platformunda takrolimus ED50'sinin lateral sıkı bağlantı birimlerinin ZO-1 ve aktin filamentlerinin asetillenmiş α tübülün ile immün işaretlemesini kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Farklı nefrotoksik ajanlarla 3B mikroakışkan platformunda yapılan hasar modelinde lateral sıkı bağlantı birimleri ZO-1 ile değerlendirilmiş ve ZO-1 DTFY'sini %20-90 oranında azalttığı bildirilmiştir [117]. Bu tez çalışmasında mikroakışkan platformunda takrolimus ED50 uygulamasının 48. saatte kontrol grubuna göre ZO-1 DTFY'sini %50 azalttığı gösterilmiştir ve bu sonuç mikroakışkan platformunda oluşturulan 3B-PT modelinin lateral sıkı bağlantı birimlerini değerlendirmedeki etkinliğini göstermektedir.

Hücre iskeletinin işaretlenmesi ile epitel hücrelerinin polaritesini gösteren asetillenmiş α tübülün işaretlenme yoğunluğu 3B-PT modelinde 48. saatte ED50 takrolimus verilen grupta kontrol grubuna göre %23 azalmıştır. Bu sonuç takrolimusun HK-2 hücrelerinde aktin filamentlerinin yapısını bozduğunu göstermektedir.

Takrolimus nefrotoksitesinin fonksiyonel değerlendirmesinde HK-2 hücrelerindeki hücre canlılığına etkisi WST-1 yöntemi ile değerlendirilmiş olup 2B ve 3B düzeneklerde 48. saatte ED50 takrolimus kontrol grubuna göre hücre canlılığını azaltmıştır. İki boyutlu statik koşullarda takrolimusun çeşitli PTEH’de kontrol grubuna göre hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığını bildiren çalışmalar mevcuttur [69, 71, 73, 78]. Benzer 3B mikroakışkan platformlarında ilaca bağlı nefrotoksite çalışmalarında farklı ilaçların PTEH’deki antiproliferatif etkileri değerlendirilmiştir [23, 107, 110, 133]. Ancak takrolimusun 3B-PT modelindeki antiproliferatif etkilerine ilişkin bir çalışma mevcut değildir. Takrolimusun gerçek zamanlı olarak belirlenen ED50’sinin 2B ve 3B düzeneklerde HK-2 hücrelerinin canlılığına etkisi karşılaştırmalı olarak ilk kez bu tez çalışmasında değerlendirilmiştir. Takrolimusun hücre canlılığına etkisinde 2B ve 3B koşullarda elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında iki düzenekte kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamış olmasına karşın takrolimus verilen gruplarda aynı doz ve sürede 3B platform 2B koşullara göre hücre canlılığını daha çok azaltmış yani takrolimusa daha duyarlı yanıt vermiştir. Bu bulgumuz ilaçların geliştirilmesinde statik *in vitro* koşulların ilaç toksisitesini değerlendirmek için yetersiz kaldığını destekler niteliktedir. Üç boyutlu modelin daha duyarlı sonuç vermesi PT epitelinin özelleşmiş yapısının statik 2B koşullarda oluşturulamaması, mikroçevreden yoksun olması, polarite oluşturmadığı için ilaç alım mekanizmalarının doğru sağlanamaması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Takrolimusun 3B-PT modelinde fonksiyonel değerlendirmesi için albüminin geri alımı kolorimetrik olarak ölçülmüş ve takrolimusun kontrol grubuna göre albümin geri alım fonksiyonunu anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Literatürde benzer 3B mikroakışkan platformlarında akış hızı değiştirilerek oluşturulan kayma gerilimindeki kontrollü artışın PTEH’in albümin geri alımı fonksiyonu iyileştirdiği bildirilmiştir [22]. Literatürde takrolimus kaynaklı hasarın 3B-PT modelinde albüminin geri alımı fonksiyonuna ilişkin etkilerini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada HRP konjuge insan serum albümini içeren besiyeri 3B-PT modeline verildikten 1 saat sonra perfüzat içinde kalan albümin miktarının belirlenmesi için kanaldan toplanan perfüzat HRP kromojeni olan DAB ile karanlıkta inkübe edilmiş ve perfüzatın içinde kalan albümin miktarı 465 nm dalga boyunda kolorimetrik okuma ile belirlenmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada mikroakışkan platformu üzerinde oluşturulan

nefrotoksisite modelleri için kolorimetrik okuma ile albüminin geri alınımının değerlendirilebildiği bir yöntem tasarlanmış ve optimize edilmiştir.

Takrolimusun 3B-PT modelinin bariyer işlevine olan etkisini değerlendirmek için diğer ilaç nefrotoksisitesi çalışmaları ile benzer şekilde 20 kDa ve 155 kDa dekstran molekülü kullanılmıştır[21, 51]. Burada kullanılan işaretli dekstran moleküllerinden 20 kDa dekstran böbreğin sağlıklı fizyolojik koşullarında glomerül bariyerinden geçen küçük boyutlu molekülleri, 155 kDa dekstran ise böbrekte hasarın başladığı patolojik durumlarda glomerülden sızan büyük boyutlu molekülleri temsil etmektedir [134]. Sonuçta geçirgenlik indeksleri hesaplandığında takrolimus ED50'sinin 48. saatte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında geçirgenliği 155 kDa dekstran molekülüne karşı 2.3 kat ve 20 kDa dekstran 1.4 kat artırdığı dolayısıyla PT epitel bariyerini anlamlı derecede bozduğu bulgusu elde edilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneylerin bazı sınırlamaları mevcuttur. Deneysel çalışmada elde edilen tüm çıktılar *ex vivo* ortamda tek hücre hattıyla oluşturulan test düzeneklerinden elde edilmiş olup *in vivo* koşullarda valide edilmemiştir. Diğer yandan tasarlanan *ex vivo* modeller organizmanın mikroçevresi ve fizyolojik koşullarına uygun olup standart 2B kültür koşullarından daha gerçekçi bir platform oluşturmaktadır. Bu platformlar kişi/hasta temelli olarak vücuda zarar vermeden teranöstitik ajanların fonksiyonel değerlendirmesine imkan sağlamayı hedeflemektedir. Böylece deney hayvanı kullanılmadan insan vücudunun fizyolojik mikroçevresi oluşturularak insan PTEH ile oluşturulan *ex vivo* platformda deney tasarlanmış ve takrolimusun yapısal ve fonksiyonel etkileri değerlendirilmiştir. İlaç geliştirme çalışmalarında bu tür platformların gerekliliği vurgulanmaktadır [18].

Bu çalışmada elde edilen bulgular standardize ancak tek insan PTEH hattı (HK-2) kapsamında geçerlilik taşımaktadır. Test platformlarının geliştirilerek hastalara ait primer hücre örneklerinde test edilerek kişiselleştirilmiş tedavi protokollerinin geliştirilmesi ve nefrotoksisitenin hasta temelli öngörülmesi mümkün olabilecektir [18]. Çalışmada kullanılan HK-2, literatürde sıklıkla tercih edilen bir hücre hattı olmasına karşın son yıllarda nefrotoksisite modellemeleri için organik anyon ve katyon taşıyıcı

ifade eden diğ er ticari hücre hatları da tercih edilebilmektedir [75, 117]. Üç boyutlu PT modelinde perfüzyonun sağ lanması ile birlikte kayma geriliminin oluş ması PTEH'in polarizasyonunu etkileyerek hücre zarına yerleş ik taşıyıcı proteinlerin ifadesini değı ştiriyor olabilir. HK-2 hücreleri laboratuvarımızda başarılı olarak kullanılmakta olup bu çalış mada takrolimusun geniş logaritmik doz aralığı için iyi bir test platformu oluşturmuştur. HK-2 hücrelerinin 3B baskı ile geliştirilen ve perfüze edilebilen 3B-PT modelinde ESM'nin iç yüzeyine tutunmaması ise çalış manın en önemli sınırlamasıdır. Üç boyutlu baskı PT platformunda diğ er PTEH ile tekrar edilmesi gerekmektedir.

Çalış manın ana sınırlılığını oluşturan 3B baskı sisteminin ileri götürülememesi birkaç nedeni içerebilir. Üç boyutlu baskı çalış malarında peristaltik pompa kullanarak devamlı akış sağ lanan sistemlerde RPTEC hücreleri ile başarılı PT modeli oluşturan çalış malar olmasına karşın, literatürde bu sistemler üzerinde HK-2 hücreleri ile çalışılmamıştır. Bu tez çalış masında 3B baskı ile oluşturulan platformda kanal içinde HK-2 hücrelerinin tutunmaması kullandığımız hücre hattı ile ilgili bir diğ er sınırlamadır. Ancak kullanılan hücre hattı çeşitlerinden bağımsız olarak genel itibariyle PTEH'in kayma gerilimindeki artıştan büyük ölçüde etkilendiğı bildirilmiştir [129]. Dolayısıyla burada kullanılan hücre hattından çok perfüzyonun sağ landığı sistemlerde kayma geriliminin rolü öne çıkmaktadır. Ticari mikroakışkan platformunda peristaltik pompa kullanımını olmaksızın aralıklı salınım cihazı ile sağ lanan perfüzyonun oluşturduğı standardize kayma gerilimi HK-2 hücrelerini olumsuz etkilemeden epitelizasyonun sağ lanmasına olanak tanımıştır ve takrolimusun 3B-PT modelindeki etkilerinin değı erlendirilmesi için uygun bir platform oluşturmuştur.

Klinikte organ transplantasyonu sonrası uygulanan tedavi rejiminin en önemli bileş eni olan takrolimusun dar terapötik penceresi ve toksik etkileri nedeniyle uzun dönem maruziyeti azaltmak için kombine tedaviler veya uzun salımlı ilaç formülleri üzerine klinik araştırmalar devam etmektedir [62, 135, 136]. Bu nedenle takrolimusun tedavi rejiminin *ex vivo* koşullarda öngörülmesi ve kişiselleştirilmiş yaklaşımlarla düzenlenmesi, organ transplantasyonu sonrası allogreft reddinin önlenmesindeki başarıyı artırabilir.

Üç boyutlu *ex vivo* model, takrolimusun 3B-PT üzerindeki yapısal ve fonksiyonel etkilerini göstermiştir. Bu doğrultuda 3B *ex vivo* sistem klinikte hastaya özel kişiselleştirilmiş doz-yanıt ilişkisinin öngörülmesini ve bu doğrultuda tedavi rejiminin düzenlenmesini sağlayabilecek bir platform oluşturabilir.

6. SONUÇ

1. Takrolimusun insan PTEH üzerindeki etkili doz penceresi 12 - 36 saat aralığında 1×10^2 µg/ml olarak bulunmuştur. Gerçek zamanlı yarı maksimum antiproliferatif ED50'si 48. saatte 44.69 µg/ml olarak saptanmıştır.

2. Biyomühendislik yaklaşımlarıyla 3B-PT kültür platformunun oluşturulması ve optimizasyonu kapsamında; 3B baskı yöntemi ile perfüzyon sisteminin bağlanabildiği bir platform üretilmiş, ESM optimizasyonunda %5 jelatin metakrilatın fibronektin ile kaplanmasıyla HK-2 hücrelerinin jel yüzeyine tutunduğu belirlenmiş, kanal oluşturulmuş, perfüzyon sağlanmış ancak HK-2 hücreleri akış sağlanan kanala ait ESM'ye 72. Saate kadar tutunmamıştır; ticari mikroakışkan platformunda HK-2 hücreleri ile sızdırmaz epitel bariyerine sahip 3B-PT modeli oluşturulmuştur.

3. Takrolimusun PT epiteli üzerindeki yapısal etkileri lateral sıkı bağlantı birimlerinin ve hücre polarizasyonunun bozulması, fonksiyonel etkileri ise hücre canlılığının azalması, albümin geri alımının bozulması ve dekstran moleküllerine karşı geçirgenliğin artmasıyla belirlenmiştir.

7. KAYNAKLAR

- [1] A. Farrar, Acute Kidney Injury, *Nurs Clin North Am*, 53 (2018) 499-510.
- [2] R. Horton, P. Berman, Eliminating acute kidney injury by 2025: an achievable goal, *Lancet*, 385 (2015) 2551-2552.
- [3] R.L. Mehta, J. Cerdá, E.A. Burdmann, M. Tonelli, G. García-García, V. Jha, P. Susantitaphong, M. Rocco, R. Vanholder, M.S. Sever, D. Cruz, B. Jaber, N.H. Lameire, R. Lombardi, A. Lewington, J. Feehally, F. Finkelstein, N. Levin, N. Pannu, B. Thomas, E. Aronoff-Spencer, G. Remuzzi, International Society of Nephrology's Oby25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology, *Lancet*, 385 (2015) 2616-2643.
- [4] P.H. Bawaskar, P.H. Bawaskar, H.S. Bawaskar, Eliminating acute kidney injury by 2025: an achievable goal for India, *Lancet*, 386 (2015) 855.
- [5] J. Jacob, J. Dannenhoffer, A. Rutter, Acute Kidney Injury, *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 47 (2020) 571-584.
- [6] J. Gameiro, J.A. Fonseca, C. Outerelo, J.A. Lopes, Acute Kidney Injury: From Diagnosis to Prevention and Treatment Strategies, *Journal of Clinical Medicine*, 9 (2020) 1704.
- [7] J.N. Patel, I.S. Hamadeh, Pharmacogenetics and tacrolimus administration in stem cell transplantation, *Pharmacogenomics*, 21 (2020) 419-426.
- [8] R. Oberbauer, O. Bestard, L. Furian, U. Maggiore, J. Pascual, L. Rostaing, K. Budde, Optimization of tacrolimus in kidney transplantation: New pharmacokinetic perspectives, *Transplant Rev (Orlando)*, 34 (2020) 100531.
- [9] C. Tron, F. Lemaitre, C. Verstuyft, A. Petitcollin, M.C. Verdier, E. Bellissant, Pharmacogenetics of Membrane Transporters of Tacrolimus in Solid Organ Transplantation, *Clin Pharmacokinet*, 58 (2019) 593-613.
- [10] Y. Bentata, Tacrolimus: 20 years of use in adult kidney transplantation. What we should know about its nephrotoxicity, *Artificial organs*, 44 (2020) 140-152.
- [11] D.A. Kalt, Tacrolimus: A Review of Laboratory Detection Methods and Indications for Use, *Lab Med*, 48 (2017) e62-e65.
- [12] J.Y.C. Soo, J. Jansen, R. Masereeuw, M.H. Little, Advances in predictive in vitro models of drug-induced nephrotoxicity, *Nature Reviews Nephrology*, 14 (2018) 378-393.
- [13] E. Kwiatkowska, L. Domański, V. Dziedziejko, A. Kajdy, K. Stefańska, S. Kwiatkowski, The Mechanism of Drug Nephrotoxicity and the Methods for Preventing Kidney Damage, *International journal of molecular sciences*, 22 (2021).
- [14] H.H. Birdsall, T.G. Hammond, Role of Shear Stress on Renal Proximal Tubular Cells for Nephrotoxicity Assays, *J Toxicol*, 2021 (2021) 6643324.
- [15] J. Faria, S. Ahmed, K.G.F. Gerritsen, S.M. Mihaila, R. Masereeuw, Kidney-based in vitro models for drug-induced toxicity testing, *Arch Toxicol*, 93 (2019) 3397-3418.
- [16] E.J. Kelly, Z. Wang, J.L. Voellinger, C.K. Yeung, D.D. Shen, K.E. Thummel, Y. Zheng, G. Ligresti, D.L. Eaton, K.A. Muczynski, J.S. Duffield, T. Neumann, A. Tourovskaia, M. Fauver, G. Kramer, E. Asp, J. Himmelfarb, Innovations in preclinical biology: ex vivo engineering of a human kidney tissue microperfusion system, *Stem cell research & therapy*, 4 Suppl 1 (2013) S17.

- [17] Y. Cong, X. Han, Y. Wang, Z. Chen, Y. Lu, T. Liu, Z. Wu, Y. Jin, Y. Luo, X. Zhang, Drug Toxicity Evaluation Based on Organ-on-a-chip Technology: A Review, *Micromachines* (Basel), 11 (2020).
- [18] R. Mittal, F.W. Woo, C.S. Castro, M.A. Cohen, J. Karanxha, J. Mittal, T. Chhibber, V.M. Jhaveri, Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications, *J Cell Physiol*, 234 (2019) 8352-8380.
- [19] J. Lee, S. Kim, Kidney-on-a-Chip: A New Technology for Predicting Drug Efficacy, Interactions, and Drug-induced Nephrotoxicity, *Curr Drug Metab*, 19 (2018) 577-583.
- [20] R. Paoli, J. Samitier, Mimicking the Kidney: A Key Role in Organ-on-Chip Development, *Micromachines* (Basel), 7 (2016).
- [21] M.K. Vormann, L. Gijzen, S. Hutter, L. Boot, A. Nicolas, A. van den Heuvel, J. Vriend, C.P. Ng, T.T.G. Nieskens, V. van Duinen, B. de Wagenaar, R. Masereeuw, L. Suter-Dick, S.J. Trietsch, M. Wilmer, J. Joore, P. Vulto, H.L. Lanz, Nephrotoxicity and Kidney Transport Assessment on 3D Perfused Proximal Tubules, *The AAPS journal*, 20 (2018) 90.
- [22] J. Vriend, J.G.P. Peters, T.T.G. Nieskens, R. Škovroňová, N. Blaimschein, M. Schmidts, R. Roepman, T.J.J. Schirris, F.G.M. Russel, R. Masereeuw, M.J. Wilmer, Flow stimulates drug transport in a human kidney proximal tubule-on-a-chip independent of primary cilia, *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1864 (2020) 129433.
- [23] L. Suter-Dick, L. Mauch, D. Ramp, M. Caj, M.K. Vormann, S. Hutter, H.L. Lanz, J. Vriend, R. Masereeuw, M.J. Wilmer, Combining Extracellular miRNA Determination with Microfluidic 3D Cell Cultures for the Assessment of Nephrotoxicity: a Proof of Concept Study, *The AAPS journal*, 20 (2018) 86.
- [24] K.A. Homan, N. Gupta, K.T. Kroll, D.B. Kolesky, M. Skylar-Scott, T. Miyoshi, D. Mau, M.T. Valerius, T. Ferrante, J.V. Bonventre, J.A. Lewis, R. Morizane, Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro, *Nature Methods*, 16 (2019) 255-262.
- [25] N.Y.C. Lin, K.A. Homan, S.S. Robinson, D.B. Kolesky, N. Duarte, A. Moisan, J.A. Lewis, Renal reabsorption in 3D vascularized proximal tubule models, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116 (2019) 5399.
- [26] N.K. Singh, W. Han, S.A. Nam, J.W. Kim, J.Y. Kim, Y.K. Kim, D.-W. Cho, Three-dimensional cell-printing of advanced renal tubular tissue analogue, *Biomaterials*, 232 (2020) 119734.
- [27] K.A. Homan, D.B. Kolesky, M.A. Skylar-Scott, J. Herrmann, H. Obuobi, A. Moisan, J.A. Lewis, Bioprinting of 3D Convolved Renal Proximal Tubules on Perfusable Chips, *Scientific reports*, 6 (2016) 34845.
- [28] P.K. Li, E.A. Burdmann, R.L. Mehta, Acute kidney injury: global health alert, *Kidney Int*, 83 (2013) 372-376.
- [29] C. Ronco, R. Bellomo, J.A. Kellum, Acute kidney injury, *Lancet*, 394 (2019) 1949-1964.
- [30] J.A. Kellum, C. Ronco, R. Bellomo, Conceptual advances and evolving terminology in acute kidney disease, *Nature Reviews Nephrology*, 17 (2021) 493-502.
- [31] E.A.J. Hoste, J.A. Kellum, N.M. Selby, A. Zarbock, P.M. Palevsky, S.M. Bagshaw, S.L. Goldstein, J. Cerdá, L.S. Chawla, Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury, *Nat Rev Nephrol*, 14 (2018) 607-625.
- [32] J.A. Kellum, P. Romagnani, G. Ashuntantang, C. Ronco, A. Zarbock, H.J. Anders, Acute kidney injury, *Nat Rev Dis Primers*, 7 (2021) 52.

- [33] S. Negi, D. Koreeda, S. Kobayashi, T. Yano, K. Tatsuta, T. Mima, T. Shigematsu, M. Ohya, Acute kidney injury: Epidemiology, outcomes, complications, and therapeutic strategies, *Semin Dial*, 31 (2018) 519-527.
- [34] Notice, *Kidney International Supplements*, 2 (2012) 1.
- [35] S.E. Orr, C.C. Bridges, Chronic Kidney Disease and Exposure to Nephrotoxic Metals, *International journal of molecular sciences*, 18 (2017) 1039.
- [36] M.A. Perazella, M.H. Rosner, Drug-Induced Acute Kidney Injury, *Clin J Am Soc Nephrol*, 17 (2022) 1220-1233.
- [37] N. Petejova, A. Martinek, J. Zadrazil, V. Teplan, Acute toxic kidney injury, *Ren Fail*, 41 (2019) 576-594.
- [38] A.M. Uber, S.M. Sutherland, Nephrotoxins and nephrotoxic acute kidney injury, *Pediatr Nephrol*, 35 (2020) 1825-1833.
- [39] J. Malyszko, K. Kozłowska, L. Kozłowski, J. Malyszko, Nephrotoxicity of anticancer treatment, *Nephrol Dial Transplant*, 32 (2017) 924-936.
- [40] S.C. Ong, R.S. Gaston, Thirty Years of Tacrolimus in Clinical Practice, *Transplantation*, 105 (2021) 484-495.
- [41] M. Meersch, S. Volmering, A. Zarbock, Prevention of acute kidney injury, *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 31 (2017) 361-370.
- [42] Y. Koza, Acute kidney injury: current concepts and new insights, *J Inj Violence Res*, 8 (2016) 58-62.
- [43] Y. Qu, F. An, Y. Luo, Y. Lu, T. Liu, W. Zhao, B. Lin, A nephron model for study of drug-induced acute kidney injury and assessment of drug-induced nephrotoxicity, *Biomaterials*, 155 (2018) 41-53.
- [44] W. Leowattana, Antiviral Drugs and Acute Kidney Injury (AKI), *Infect Disord Drug Targets*, 19 (2019) 375-382.
- [45] M. Shi, K.L. McMillan, J. Wu, N. Gillings, B. Flores, O.W. Moe, M.C. Hu, Cisplatin nephrotoxicity as a model of chronic kidney disease, *Laboratory Investigation*, 98 (2018) 1105-1121.
- [46] A. Li, W. Zhang, L. Zhang, Y. Liu, K. Li, G. Du, X. Qin, Elucidating the time-dependent changes in the urinary metabolome under doxorubicin-induced nephrotoxicity, *Toxicology Letters*, 319 (2020) 204-212.
- [47] B. Medić, M. Stojanović, B. Rovčanin, D. Kekić, S.R. Škodrić, G.B. Jovanović, K.S. Vujović, N. Divac, R. Stojanović, M. Radenković, M. Prostran, Pioglitazone attenuates kidney injury in an experimental model of gentamicin-induced nephrotoxicity in rats, *Scientific reports*, 9 (2019) 13689.
- [48] A.G. Casanova, L. Vicente-Vicente, M.T. Hernández-Sánchez, M. Pescador, M. Prieto, C. Martínez-Salgado, A.I. Morales, F.J. López-Hernández, Key role of oxidative stress in animal models of aminoglycoside nephrotoxicity revealed by a systematic analysis of the antioxidant-to-nephroprotective correlation, *Toxicology*, 385 (2017) 10-17.
- [49] Y. Liu, Y. Han, T. Fang, S.-M. Chen, X. Hu, L. Song, H. Shen, H. Dong, Y.-Y. Jiang, Z. Zou, Y. Li, M.-M. An, Turning weakness into strength: Albumin nanoparticle-redirected amphotericin B biodistribution for reducing nephrotoxicity and enhancing antifungal activity, *Journal of Controlled Release*, 324 (2020) 657-668.
- [50] A. Cez, I. Brocheriou, F.-X. Lescure, C. Adam, P.-M. Girard, G. Pialoux, S.K. Moestrup, S. Fellahi, J.-P. Bastard, P. Ronco, E. Plaisier, Decreased expression of megalin and cubilin and altered mitochondrial activity in tenofovir nephrotoxicity, *Human Pathology*, 73 (2018) 89-101.
- [51] M.K. Vormann, J. Vriend, H.L. Lanz, L. Gijzen, A. van den Heuvel, S. Hutter, J. Joore, S.J. Trietsch, C. StuuT, T.T.G. Nieskens, J.G.P. Peters, D. Ramp, M. Caj, F.G.M.

- Russel, B. Jacobsen, A. Roth, S. Lu, J.W. Polli, A.A. Naidoo, P. Vulto, R. Masereeuw, M.J. Wilmer, L. Suter-Dick, Implementation of a Human Renal Proximal Tubule on a Chip for Nephrotoxicity and Drug Interaction Studies, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110 (2021) 1601-1614.
- [52] A.A.A. Oyouni, S. Saggu, E. Tousson, H. Rehman, Immunosuppressant drug tacrolimus induced mitochondrial nephrotoxicity, modified PCNA and Bcl-2 expression attenuated by *Ocimum basilicum* L. in CD1 mice, *Toxicology reports*, 5 (2018) 687-694.
- [53] L.M.A. Barnett, B.S. Cummings, Nephrotoxicity and Renal Pathophysiology: A Contemporary Perspective, *Toxicological Sciences*, 164 (2018) 379-390.
- [54] L. Edgar, T. Pu, B. Porter, J.M. Aziz, C. La Pointe, A. Asthana, G. Orlando, Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation, *Br J Surg*, 107 (2020) 793-800.
- [55] C.D. Holt, Overview of Immunosuppressive Therapy in Solid Organ Transplantation, *Anesthesiol Clin*, 35 (2017) 365-380.
- [56] F. Liu, J.H. Mao, Calcineurin inhibitors and nephrotoxicity in children, *World J Pediatr*, 14 (2018) 121-126.
- [57] H. Ekberg, H. Tedesco-Silva, A. Demirbas, S. Vítko, B. Nashan, A. Gürkan, R. Margreiter, C. Hugo, J.M. Grinyó, U. Frei, Y. Vanrenterghem, P. Daloz, P.F. Halloran, Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation, *The New England journal of medicine*, 357 (2007) 2562-2575.
- [58] K. Yang, M. Zhang, B. Zhang, Y. Zhang, Q. Zhao, Systematic review and meta-analysis of calcineurin inhibitors on long-term prognosis of renal transplant patients, *Transpl Immunol*, 75 (2022) 101741.
- [59] H.M. El Hennawy, A.S.A. Faifi, W. El Nazer, A. Mahedy, A. Kamal, I.S. Al Faifi, H. Abdulmalik, O. Safar, M.F. Zaitoun, A.E. Fahmy, Calcineurin Inhibitors Nephrotoxicity Prevention Strategies With Stress on Belatacept-Based Rescue Immunotherapy: A Review of the Current Evidence, *Transplantation proceedings*, 53 (2021) 1532-1540.
- [60] V. Katabathina, C.O. Menias, P. Pickhardt, M. Lubner, S.R. Prasad, Complications of Immunosuppressive Therapy in Solid Organ Transplantation, *Radiol Clin North Am*, 54 (2016) 303-319.
- [61] M. Yu, M. Liu, W. Zhang, Y. Ming, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Pharmacogenetics of Tacrolimus in Kidney Transplantation, *Curr Drug Metab*, 19 (2018) 513-522.
- [62] F. Shihab, U. Christians, L. Smith, J.R. Wellen, B. Kaplan, Focus on mTOR inhibitors and tacrolimus in renal transplantation: pharmacokinetics, exposure-response relationships, and clinical outcomes, *Transpl Immunol*, 31 (2014) 22-32.
- [63] A.C. Webster, R.C. Woodroffe, R.S. Taylor, J.R. Chapman, J.C. Craig, Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data, *BMJ (Clinical research ed.)*, 331 (2005) 810.
- [64] F. Nevens, J. Pirenne, Renal disease in the allograft recipient, *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 46-47 (2020) 101690.
- [65] B.M. Shrestha, Two Decades of Tacrolimus in Renal Transplant: Basic Science and Clinical Evidences, *Exp Clin Transplant*, 15 (2017) 1-9.
- [66] A.A. Araya, Y. Tasnif, Tacrolimus, *StatPearls*, StatPearls Publishing

- [67] B. Banas, B.K. Krämer, B. Krüger, N. Kamar, N. Undre, Long-Term Kidney Transplant Outcomes: Role of Prolonged-Release Tacrolimus, *Transplantation proceedings*, 52 (2020) 102-110.
- [68] D. Williams, L. Haragsim, Calcineurin nephrotoxicity, *Adv Chronic Kidney Dis*, 13 (2006) 47-55.
- [69] K. Luo, S.W. Lim, J. Jin, L. Jin, H.W. Gil, D.S. Im, H.S. Hwang, C.W. Yang, Cilastatin protects against tacrolimus-induced nephrotoxicity via anti-oxidative and anti-apoptotic properties, *BMC nephrology*, 20 (2019) 221.
- [70] P. Gao, X. Du, L. Liu, H. Xu, M. Liu, X. Guan, C. Zhang, Astragaloside IV Alleviates Tacrolimus-Induced Chronic Nephrotoxicity via p62-Keap1-Nrf2 Pathway, *Frontiers in pharmacology*, 11 (2020) 610102.
- [71] H.L. Zheng, H.Y. Zhang, C.L. Zhu, H.Y. Li, S. Cui, J. Jin, S.G. Piao, Y.J. Jiang, M.Y. Xuan, J.Z. Jin, Y.S. Jin, J.P. Lee, B.H. Chung, B.S. Choi, C.W. Yang, C. Li, L-Carnitine protects against tacrolimus-induced renal injury by attenuating programmed cell death via PI3K/AKT/PTEN signaling, *Acta Pharmacol Sin*, 42 (2021) 77-87.
- [72] S.W. Lim, L. Jin, K. Luo, J. Jin, Y.J. Shin, S.Y. Hong, C.W. Yang, Klotho enhances FoxO3-mediated manganese superoxide dismutase expression by negatively regulating PI3K/AKT pathway during tacrolimus-induced oxidative stress, *Cell Death & Disease*, 8 (2017) e2972-e2972.
- [73] S. Cui, K. Luo, Y. Quan, S.W. Lim, Y.J. Shin, K.E. Lee, H.L. Kim, E.J. Ko, J.H. Kim, S.J. Chung, S.K. Bae, B.H. Chung, C.W. Yang, Water-soluble coenzyme Q10 provides better protection than lipid-soluble coenzyme Q10 in a rat model of chronic tacrolimus nephropathy, *The Korean journal of internal medicine*, 36 (2021) 949-961.
- [74] N.O. Al-Harbi, F. Imam, M.M. Al-Harbi, M. Iqbal, A. Nadeem, M.M. Sayed-Ahmed, A.D. Alabidy, A.F. Almukhallafi, Olmesartan attenuates tacrolimus-induced biochemical and ultrastructural changes in rat kidney tissue, *BioMed research international*, 2014 (2014) 607246.
- [75] C. Vandenbussche, C. Van der Hauwaert, E. Dewaeles, J. Franczak, M.-F. Hennino, V. Gnemmi, G. Savary, Q. Tavernier, N. Nottet, A. Paquet, M. Perrais, D. Blum, B. Mari, N. Pottier, F. Glowacki, C. Cauffiez, Tacrolimus-induced nephrotoxicity in mice is associated with microRNA deregulation, *Archives of Toxicology*, 92 (2018) 1539-1550.
- [76] J.H. Yu, S.W. Lim, K. Luo, S. Cui, Y. Quan, Y.J. Shin, K.E. Lee, H.L. Kim, E.J. Ko, B.H. Chung, J.H. Kim, S.J. Chung, C.W. Yang, Coenzyme Q(10) alleviates tacrolimus-induced mitochondrial dysfunction in kidney, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33 (2019) 12288-12298.
- [77] H.-l. Zheng, H.-y. Zhang, C.-l. Zhu, H.-y. Li, S. Cui, J. Jin, S.-g. Piao, Y.-j. Jiang, M.-y. Xuan, J.-z. Jin, Y.-s. Jin, J.-p. Lee, B.-h. Chung, B.-s. Choi, C.-w. Yang, C. Li, L-Carnitine protects against tacrolimus-induced renal injury by attenuating programmed cell death via PI3K/AKT/PTEN signaling, *Acta Pharmacologica Sinica*, 42 (2021) 77-87.
- [78] J. Jin, L. Jin, K. Luo, S.W. Lim, B.H. Chung, C.W. Yang, Effect of Empagliflozin on Tacrolimus-Induced Pancreas Islet Dysfunction and Renal Injury, *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 17 (2017) 2601-2616.
- [79] L. Li, H. Zhao, B. Chen, Z. Fan, N. Li, J. Yue, Q. Ye, FXR activation alleviates tacrolimus-induced post-transplant diabetes mellitus by regulating renal gluconeogenesis and glucose uptake, *Journal of translational medicine*, 17 (2019) 418.

- [80] J. Bennett, H. Cassidy, C. Slattery, M.P. Ryan, T. McMorrow, Tacrolimus Modulates TGF- β Signaling to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells, *J Clin Med*, 5 (2016).
- [81] D. Guerrieri, N.G. Ambrosi, H. Romeo, J. Salaberry, M.F. Toniolo, C. Remolins, C. Incardona, D. Casadei, E. Chuluyan, Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor Protects Acute Kidney Injury Through Immune and Non-Immune Pathways, *Shock*, 56 (2021).
- [82] C.S. Park, H.J. Jang, J.H. Lee, M.Y. Oh, H.J. Kim, Tetrahydrocurcumin Ameliorates Tacrolimus-Induced Nephrotoxicity Via Inhibiting Apoptosis, *Transplantation proceedings*, 50 (2018) 2854-2859.
- [83] D. Lee, D.-S. Lee, K. Jung, G.S. Hwang, H.L. Lee, N. Yamabe, H.-J. Lee, D.-W. Eom, K.H. Kim, K.S. Kang, Protective effect of ginsenoside Rb1 against tacrolimus-induced apoptosis in renal proximal tubular LLC-PK1 cells, *Journal of Ginseng Research*, 42 (2018) 75-80.
- [84] J.W. Kim, S.A. Nam, E. Seo, J.Y. Lee, D. Kim, J.H. Ju, S.W. Lim, H.L. Kim, H.W. Kim, C.W. Yang, J. Kim, D.S. Kim, Y.K. Kim, Human kidney organoids model the tacrolimus nephrotoxicity and elucidate the role of autophagy, *The Korean journal of internal medicine*, (2021).
- [85] N.O. Al-Harbi, F. Imam, M.M. Al-Harbi, M. Iqbal, A. Nadeem, O.A. Al-Shahrah, H.M. Korashy, K.A. Al-Hosaini, M. Ahmed, S. Bahashwar, Treatment with aliskiren ameliorates tacrolimus-induced nephrotoxicity in rats, *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*, 16 (2015) 1329-1336.
- [86] Z. Gai, T. Gui, G.A. Kullak-Ublick, Y. Li, M. Visentin, The Role of Mitochondria in Drug-Induced Kidney Injury, *Front Physiol*, 11 (2020) 1079.
- [87] A.L. Kierszenbaum, L. Tres, *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology E-Book*, Elsevier Health Sciences 2019.
- [88] M.H. Ross, W. Pawlina, *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*, 6th ed. ed., Philadelphia : Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health 2011.
- [89] L.P. Gartner, *Textbook of histology*, Fifth edition. ed., Elsevier, Philadelphia, PA, 2021.
- [90] W.K. Ovalle, P.C. Nahirney, *Netter's Essential Histology: with Student Consult Access*, Elsevier Health Sciences 2013.
- [91] B.M. Koeppen, B.A. Stanton, 2 - Structure and Function of the Kidneys, in: B.M. Koeppen, B.A. Stanton (Eds.) *Renal Physiology (Fifth Edition)*, Mosby, Philadelphia, 2013, pp. 15-26.
- [92] A. Madrazo-Ibarra, P. Vaitla, *Histology, Nephron*, StatPearls, StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL), 2021.
- [93] L. Oxburgh, *Kidney Nephron Determination*, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 34 (2018) 427-450.
- [94] I. Murray, M.A. Paolini, *Histology, Kidney and Glomerulus*, StatPearls, StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL), 2021.
- [95] C.J. Lote, *Principles of Renal Physiology*, Springer New York 2012.
- [96] B.M. Koeppen, B.A. Stanton, 4 - Renal Transport Mechanisms: NaCl and Water Reabsorption Along the Nephron, in: B.M. Koeppen, B.A. Stanton (Eds.) *Renal Physiology (Fifth Edition)*, Mosby, Philadelphia, 2013, pp. 45-71.
- [97] M.A. Perazella, Drug-induced acute kidney injury: diverse mechanisms of tubular injury, *Current Opinion in Critical Care*, 25 (2019) 550-557.

- [98] J.L. Zhuo, X.C. Li, Proximal nephron, *Comprehensive Physiology*, 3 (2013) 1079-1123.
- [99] A. Mescher, *Junqueira's Basic Histology Text & Atlas* (14th ed.), 2016.
- [100] A. Ivanyuk, F. Livio, J. Biollaz, T. Buclin, Renal Drug Transporters and Drug Interactions, *Clin Pharmacokinet*, 56 (2017) 825-892.
- [101] K.M. Morrissey, S.L. Stocker, M.B. Wittwer, L. Xu, K.M. Giacomini, Renal transporters in drug development, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53 (2013) 503-529.
- [102] X. Yang, L. Han, Roles of Renal Drug Transporter in Drug Disposition and Renal Toxicity, *Adv Exp Med Biol*, 1141 (2019) 341-360.
- [103] M.J. Wilmer, C.P. Ng, H.L. Lanz, P. Vulto, L. Suter-Dick, R. Masereeuw, Kidney-on-a-Chip Technology for Drug-Induced Nephrotoxicity Screening, *Trends Biotechnol*, 34 (2016) 156-170.
- [104] T.T. Nieskens, M.J. Wilmer, Kidney-on-a-chip technology for renal proximal tubule tissue reconstruction, *Eur J Pharmacol*, 790 (2016) 46-56.
- [105] A.M. Hall, F. Trepiccione, R.J. Unwin, Drug toxicity in the proximal tubule: new models, methods and mechanisms, *Pediatr Nephrol*, 37 (2022) 973-982.
- [106] N. Ashammakhi, K. Wesseling-Perry, A. Hasan, E. Elkhammas, Y.S. Zhang, Kidney-on-a-chip: untapped opportunities, *Kidney Int*, 94 (2018) 1073-1086.
- [107] C.M. Sakolish, B. Philip, G.J. Mahler, A human proximal tubule-on-a-chip to study renal disease and toxicity, *Biomicrofluidics*, 13 (2019) 014107.
- [108] E.J. Weber, K.A. Lidberg, L. Wang, T.K. Bammler, J.W. MacDonald, M.J. Li, M. Redhair, W.M. Atkins, C. Tran, K.M. Hines, J. Herron, L. Xu, M.B. Monteiro, S. Ramm, V. Vaidya, M. Vaara, T. Vaara, J. Himmelfarb, E.J. Kelly, Human kidney on a chip assessment of polymyxin antibiotic nephrotoxicity, *JCI insight*, 3 (2018).
- [109] J. Theobald, M.A. Abu El Maaty, N. Kusterer, B. Wetterauer, M. Wink, X. Cheng, S. Wölfl, In vitro metabolic activation of vitamin D3 by using a multi-compartment microfluidic liver-kidney organ on chip platform, *Scientific reports*, 9 (2019) 4616.
- [110] C. Maass, N.B. Sorensen, J. Himmelfarb, E.J. Kelly, C.L. Stokes, M. Cirit, Translational Assessment of Drug-Induced Proximal Tubule Injury Using a Kidney Microphysiological System, *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology*, 8 (2019) 316-325.
- [111] M. Wilmer, J. Vriend, T. Nieskens, H. Lanz, M. Vormann, L. Gijzen, D. Ramp, L. Suter-Dick, R. Masereeuw, P. Vulto, Renal toxicity biomarker analysis upon compound exposures in a kidney-on-a-chip, *Toxicology letters*, 280 (2017) S140-S140.
- [112] D.B. Kolesky, K.A. Homan, M. Skylar-Scott, J.A. Lewis, In vitro human tissues via multi-material 3-D bioprinting, *Altern Lab Anim*, 46 (2018) 209-215.
- [113] S.M. King, J.W. Higgins, C.R. Nino, T.R. Smith, E.H. Paffenroth, C.E. Fairbairn, A. Docuyanan, V.D. Shah, A.E. Chen, S.C. Presnell, D.G. Nguyen, 3D Proximal Tubule Tissues Recapitulate Key Aspects of Renal Physiology to Enable Nephrotoxicity Testing, *Frontiers in Physiology*, 8 (2017).
- [114] K.T. Lawlor, J.M. Vanslambrouck, J.W. Higgins, A. Chambon, K. Bishard, D. Arndt, P.X. Er, S.B. Wilson, S.E. Howden, K.S. Tan, F. Li, L.J. Hale, B. Shepherd, S. Pentoney, S.C. Presnell, A.E. Chen, M.H. Little, Cellular extrusion bioprinting improves kidney organoid reproducibility and conformation, *Nature Materials*, 20 (2021) 260-271.
- [115] A.D. Graham, S.N. Olof, M.J. Burke, J.P.K. Armstrong, E.A. Mikhailova, J.G. Nicholson, S.J. Box, F.G. Szele, A.W. Perriman, H. Bayley, High-Resolution Patterned Cellular Constructs by Droplet-Based 3D Printing, *Scientific reports*, 7 (2017) 7004.

- [116] M. Adler, S. Ramm, M. Hafner, J.L. Muhlich, E.M. Gottwald, E. Weber, A. Jaklic, A.K. Ajay, D. Svoboda, S. Auerbach, E.J. Kelly, J. Himmelfarb, V.S. Vaidya, A Quantitative Approach to Screen for Nephrotoxic Compounds In Vitro, *J Am Soc Nephrol*, 27 (2016) 1015-1028.
- [117] J. Vriend, M.K. Vormann, H.L. Lanz, J. Joore, S.J. Trietsch, F.G.M. Russel, B. Jacobsen, A. Roth, S. Lu, J.W. Polli, A.A. Naidoo, R. Masereeuw, M.J. Wilmer, L. Suter-Dick, Nephroscreen: A robust and versatile renal tubule-on-a-chip platform for nephrotoxicity assessment, *Current Opinion in Toxicology*, 25 (2021) 42-48.
- [118] K. Troendle, L. Rizzo, R. Pichler, F. Koch, A. Itani, R. Zengerle, S.S. Lienkamp, P. Koltay, S. Zimmermann, Scalable fabrication of renal spheroids and nephron-like tubules by bioprinting and controlled self-assembly of epithelial cells, *Biofabrication*, (2021).
- [119] H. Rastin, B. Zhang, J. Bi, K. Hassan, T.T. Tung, D. Losic, 3D printing of cell-laden electroconductive bioinks for tissue engineering applications, *Journal of Materials Chemistry B*, 8 (2020) 5862-5876.
- [120] H. Rastin, B. Zhang, A. Mazinani, K. Hassan, J. Bi, T.T. Tung, D. Losic, 3D bioprinting of cell-laden electroconductive MXene nanocomposite bioinks, *Nanoscale*, 12 (2020) 16069-16080.
- [121] P.F. Secker, N. Schlichenmaier, M. Beilmann, U. Deschl, D.R. Dietrich, Functional transepithelial transport measurements to detect nephrotoxicity in vitro using the RPTEC/TERT1 cell line, *Archives of Toxicology*, 93 (2019) 1965-1978.
- [122] G. Yang, Z. Xiao, X. Ren, H. Long, H. Qian, K. Ma, Y. Guo, Enzymatically crosslinked gelatin hydrogel promotes the proliferation of adipose tissue-derived stromal cells, *PeerJ*, 4 (2016) e2497.
- [123] J. Corona-Gomez, X. Chen, Q. Yang, Effect of Nanoparticle Incorporation and Surface Coating on Mechanical Properties of Bone Scaffolds: A Brief Review, *J Funct Biomater*, 7 (2016).
- [124] T. Xia, W. Liu, L. Yang, A review of gradient stiffness hydrogels used in tissue engineering and regenerative medicine, *J Biomed Mater Res A*, 105 (2017) 1799-1812.
- [125] J. Dubisova, J.S. Burianova, L. Svobodova, P. Makovicky, N. Martinez-Varea, A. Cimpean, J.W. Fawcett, J.C.F. Kwok, S. Kubinova, Oral treatment of 4-methylumbelliferone reduced perineuronal nets and improved recognition memory in mice, *Brain Res Bull*, 181 (2022) 144-156.
- [126] L. Aschauer, G. Carta, N. Vogelsang, E. Schlatter, P. Jennings, Expression of xenobiotic transporters in the human renal proximal tubule cell line RPTEC/TERT1, *Toxicology in Vitro*, 30 (2015) 95-105.
- [127] E. Bilgic, E. Guzel, S. Kose, M.C. Aydin, E. Karaismailoglu, I. Akar, A. Usubutun, P. Korkusuz, Endocannabinoids modulate apoptosis in endometriosis and adenomyosis, *Acta Histochem*, 119 (2017) 523-532.
- [128] Ö. Boyacıoğlu, E. Bilgiç, C. Varan, E. Bilensoy, E. Nemitlu, D. Sevim, Ç. Kocaefe, P. Korkusuz, ACPA decreases non-small cell lung cancer line growth through Akt/PI3K and JNK pathways in vitro, *Cell Death Dis*, 12 (2021) 56.
- [129] D. Wang, M. Gust, N. Ferrell, Kidney-on-a-Chip: Mechanical Stimulation and Sensor Integration, *Sensors (Basel)*, 22 (2022).
- [130] W.C. Chen, H.H. Lin, M.J. Tang, Regulation of proximal tubular cell differentiation and proliferation in primary culture by matrix stiffness and ECM components, *Am J Physiol Renal Physiol*, 307 (2014) F695-707.
- [131] A. Englezakis, E. Gozalpour, M. Kamran, K. Fenner, E. Mele, K. Coopman, Development of a hollow fibre-based renal module for active transport studies, *J Artif Organs*, 24 (2021) 473-484.

- [132] T.T.G. Nieskens, M. Persson, E.J. Kelly, A.K. Sjögren, A Multicompartment Human Kidney Proximal Tubule-on-a-Chip Replicates Cell Polarization-Dependent Cisplatin Toxicity, *Drug Metab Dispos*, 48 (2020) 1303-1311.
- [133] N. Lin, X. Zhou, X. Geng, C. Drewell, J. Hübner, Z. Li, Y. Zhang, M. Xue, U. Marx, B. Li, Repeated dose multi-drug testing using a microfluidic chip-based coculture of human liver and kidney proximal tubules equivalents, *Scientific reports*, 10 (2020) 8879.
- [134] M.G. Lawrence, M.K. Altenburg, R. Sanford, J.D. Willett, B. Bleasdale, B. Ballou, J. Wilder, F. Li, J.H. Miner, U.B. Berg, O. Smithies, Permeation of macromolecules into the renal glomerular basement membrane and capture by the tubules, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114 (2017) 2958-2963.
- [135] D.H. Peters, A. Fitton, G.L. Plosker, D. Faulds, Tacrolimus, *Drugs*, 46 (1993) 746-794.
- [136] H. Parlakpınar, M. Gunata, Transplantation and immunosuppression: a review of novel transplant-related immunosuppressant drugs, *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 43 (2021) 651-665.

EKLER

EK 1 – Tezden Türetilmiş Bildiriler

Nazlıhan Gürbüz, Sefa Burak Çam, Fahriye Şeyda Gökyer, Pınar Yılğör Huri, Petek Korkusuz, Takrolimus nefrotoksisitesinin değerlendirmesi için üç boyutlu böbrek proksimal tübül modelinin geliştirilmesi, 15th National and 1st International Congress of Histology and Embryology (NICHE 2022), Poster Sunumu.