

**KRİYOJEL VE TRANSWELL SİSTEMİNDE ÜÇ
BOYUTLU (3B) PLASENTA MODELİNİN
OLUŞTURULMASI VE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**CONSTRUCTION OF A THREE DIMENTION (3D)
PLACENTA MODEL ON CRYOGEL AND TRANSWELL
SYSTEMS AND INVESTIGATION OF ITS EFFICIENCY**

ÜMMÜGÜL GÖZLEK

PROF. DR. AYSUN KILIÇ SÜLOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

KRİYOJEL VE TRANSWELL SİSTEMİNDE ÜÇ BOYUTLU (3B) PLASENTA MODELİNİN OLUŞTURULMASI VE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

ÜMMÜGÜL GÖZLEK

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: PROF. DR. AYSUN KILIÇ SÜLOĞLU

Haziran 2023, 83 sayfa

Son yıllarda gebelik boyunca kimyasal madde ve ilaç kullanımında yaşanan artışa yönelik olarak güncel plasenta bariyer modelleri ve plasental sistemler oluşturularak yapılacak olan çalışmalara ihtiyaç oldukça artmış olup bugüne kadar yapılan *in vitro* çalışmalar ile standart olarak kabul edilen bir plasenta bariyer modeli henüz bulunmamaktadır.

Bu tezde, insan plasental sitotrofoblast hücresi (BeWo) ve insan göbek kordunu veni makrovasküler endotel hücrelerinin (HUVEC) birarada kullanıldığı kriyojel ve transwell sistem kullanılmıştır. Bu iki hücreye ilave olarak ortama gerekli hormon desteğini sağlamak amacıyla adrenal bez adenokarsinom hücre hattı (H295R) eklenerek *in vivo* ortamı taklit eden daha etkin bir 3B sistem oluşturulmuştur. Gebelikteki kullanımı ile ilgili literatürde yeterli bir bilgiye rastlanmamış bir antidepresan etken maddesi olan vortiksetinin, 3B kriyojel ve transwell ortak-kültür sistemine uygulaması yapılarak etkinliğinin araştırılması sağlanmıştır. Daha önceki çalışmalarla optimize edilmiş kriyojeller hücrelerle birlikte kullanılarak transwell insert sistemine eklenerek, etkinlikleri karşılaştırılmış, vortiksetinin toksisitesi değerlendirilmiştir. Kriyojellere folik asit, tip IV kolajen bağlanarak hücrelerin tutunabileceği hücre dışı maddeyi (HDM) taklit eden ortamlar hazırlanmış ve daha sonra BeWo ve HUVEC hücreleri ile ortak

kültürü yapılmıştır. Tez çalışması kapsamında, optimize edilmiş bu sistem üzerine transwell insert üzerinde kültüre edilmiş H295R hücreleri kullanılarak literatürde ilk defa üçlü ortak kültür sistemi oluşturulmuştur. Oluşturulan sistemin vortioksetin etken maddesine verdiği yanıt hücre canlılık analizi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca grupların taramalı elektron mikroskopunda (SEM) morfolojik görüntüleri incelenmiştir.

HDM bileşenlerini taşıyan kriyojeller üzerinde maternal kısmı temsil eden BeWo ve HUVEC hücreleri ile fetal kısmı temsil eden H295R hücreleri transwell sisteminde bir araya getirilmiş ve hormon metabolizmasındaki değişiklikler insan koryonik gonadotropin (β -hCG), progesteron, dehidroepiandrosteron (DHEA), östriol ve östradiol hormon seviyeleri ölçülerek tespit edilmiştir. Uygun istatistiksel analizler yapılarak plasental hücrelerle oluşturulan kriyojel ve transwell insert içeren 3B ortak-kültür sistemi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

3B kriyojel ortak kültür sistemine 30 μ M vortioksetin dozu uygulaması sonucunda ortak kültürün hücre canlılığında anlamlı bir azalma görülmemiştir. İkili ve Üçlü ortak kültür grubunda β -hCG, östriol, östradiol, progesteron, DHEA hormon miktarı ölçülmüştür. PHEMA+Tip IV Kol+FA kriyojel grubunda PHEMA kriyojel grubuna kıyasla BeWo hücrelerinden sentezlendiği bilinen β -hCG hormonu miktarında artış gözlenmiştir. Çoğu grupta MTT analizi ve hormon sonuçlarına göre vortioksetin doz uygulamasına bağlı olarak anlamlı azalma görülmüştür. SEM görüntülemesi sonuçlarına göre, PHEMA Tip IV Kol+FA grubunda PHEMA grubuna kıyasla hücrelerin proliferasyonu, yayılımı ve yerleşimi bakımında daha iyi uyum sağladığı gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında, PHEMA ve PHEMA kriyojele Tip IV Kolajen ve Folik Asit bağlanarak kriyojel grupları oluşturulmuştur. Plasental trofoblast hücre hattı BeWo, endoteliyal hücre hattı HUVEC ve adrenokortikal hücre hattı H295R hücreleri, ortak kültür ortamında ilk kez PHEMA ve Tip IV Kolajen ve Folik Asit ile kaplanmış kriyojel ve transwell bulunan sistemde üretilmiştir. Oluşturulan 3B kriyojel ve transwell içeren sistem ile gebelikte kullanılan vortioksetin antidepresan etken maddesinin toksisitesi değerlendirilmiştir. Sonuçlar kriyojel ve transwell sisteminin ortak kültürler için biyolojik olarak uyumlu olduğunu göstermiştir. Bu 3B kriyojel sistemi yeni ilaç, doku mühendisliği, kozmetik madde, gıda toksisitesi gibi alanlarda *in vivo*yü yansıtan ve *in vivo*yü oldukça benzer cevaplar veren bir sistem olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: BeWo, HUVEC, H295R, plasental bariyer, kriyojel, ortak-kültür, PHEMA, transwell, vortiooksetin

ABSTRACT

CONSTRUCTION OF A THREE DIMENTION (3D) PLACENTA MODEL ON CRYOGEL AND TRANSWELL SYSTEMS AND INVESTIGATION OF ITS EFFICIENCY

ÜMMÜGÜL GÖZLEK

Master of Biology, Department of Zoology

Supervisor: PROF. DR. AYSUN KILIÇ SÜLOĞLU

June 2023, 83 pages

In recent years, the need for studies to be carried out by creating current placental barrier models and placental systems for the increase in the use of chemicals and drugs during pregnancy has increased considerably, and there is not yet a placental barrier model accepted as a standard with in vitro studies.

In this thesis, a cryogel and transwell system in which human placental cytotrophoblast cell (BeWo) and human umbilical vein macrovascular endothelial cells (HUVEC) are used together were used. In addition to these two cells, an adrenal gland adenocarcinoma cell line (H295R) was added to provide the necessary hormone support to the environment, creating a more effective 3D system that mimics the in vivo environment. The effectiveness of vortioxetine, which is an antidepressant active ingredient for which there is no sufficient information in the literature regarding its use in pregnancy, was

applied to the 3D cryogel and transwell co-culture system to investigate its effectiveness. Cryogels optimized with previous studies were used together with cells and added to the transwell insert system, their effectiveness was compared, and the toxicity of vortioxetine was evaluated. By attaching folic acid and type IV collagen to the cryogels, media mimicking the extracellular substance (HDM) that cells can attach to were prepared and then co-cultured with BeWo and HUVEC cells. Within the scope of the thesis, a triple co-culture system was created for the first time in the literature by using H295R cells cultured on a transwell insert on this optimized system. The response of the created system to the active substance of vortioxetine was evaluated by cell viability analysis. In addition, the morphological images of the groups were examined under scanning electron microscopy (SEM).

BeWo and HUVEC cells representing the maternal part and H295R cells representing the fetal part were assembled on the cryogels carrying HDM components, and the changes in hormone metabolism were measured by measuring the hormone levels of human chorionic gonadotropin (β hCG), progesterone, dehydroepiandrosterone (DHEA), estriol and estradiol. The effects on the 3D co-culture system containing the cryogel formed with placental cells and the transwell insert were investigated by performing appropriate statistical analyzes.

As a result of the application of 30 μ M dose of vortioxetine to the 3D cryogel co-culture system, no significant decrease in cell viability of the co-culture was observed. The amount of β -hCG, estriol, estradiol, progesterone, DHEA hormones were measured in the double and triple co-culture groups. An increase in the amount of β -hCG hormone known to be synthesized from BeWo cells was observed in the PHEMA+Type IV Kol+FA cryogel group compared to the PHEMA cryogel group. According to MTT analysis and hormone results in most groups, a significant decrease was observed depending on vortioxetine dosing. According to the results of SEM imaging, it has been shown that the PHEMA Type IV Arm+FA group has better compliance in terms of proliferation, spread and localization of cells compared to the PHEMA group.

In this thesis, cryogel groups were formed by binding Type IV Collagen and Folic Acid to PHEMA and PHEMA cryogels. Placental trophoblast cell line BeWo, endothelial cell line HUVEC and adrenocortical cell line H295R cells were grown in co-culture medium for the first time in a system with cryogel and transwell coated with PHEMA and Type

IV Collagen and Folic Acid. The toxicity of the antidepressant active substance vortioxetine used during pregnancy was evaluated with the created 3D system. The results showed that the cryogel system is biocompatible for co-cultures, in terms of cytotoxicity, the co-culture groups showed resistance as a result of dose application, and the doses should be higher to reduce viability in dual co-culture groups compared to mono cultures. This 3D cryogel system has shown that it can be used as a system that reflects in vivo and gives similar responses in areas such as new drugs, cosmetics, and food toxicity.

Keywords: BeWo, HUVEC, H295R, placental barrier, cryogel, co-culture, PHEMA, transwell, vortioxetine

TEŞEKKÜR

İlk günden beri bilgi ve tecrübeleriyle yanımda olduğunu hissettiğim, ihtiyacım olan her anda sabırla beni yönlendiren, anlayışlılığı, güler yüzü ve şefkatiyle her zaman motivasyon sağlayan çok kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU'na,
Tez çalışmamda deneylerim için laboratuvarını paylaşarak bana destek olan Sayın Prof. Dr. Işık Perçin DEMİRÇELİK'e,
Tez çalışmalarım boyunca bilgisi ve deneyimlerini her zaman paylaşan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif KARACAOĞLU'na,
Lisans dönemimden beri laboratuvarında tüm süreçleri öğrenmem konusunda bilgisi, deneyimi ve öğreticiliği ile her zaman her koşulda asla desteğini esirgemeyen, sabırla tüm sorularımı yanıtlayan ve ihtiyacım olan her anda motivasyon sağlayan, kıymetli dostluğu ile hayatıma yer eden canım arkadaşım çok değerli Uzm. Biyolog Selen ÖZTÜRK'e,
Bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, deneylerim aşamasında her zaman bana destek olan sevgili Merve DEMİR'e,
Tez çalışmalarımında sabırla desteğini esirgemeyen ve deneylerimde bana destek olan sevgili Gülşen BAYRAK'a,
Aynı laboratuvarı paylaştığım tüm arkadaşlarıma,
Çalışmalarımızı 1001-SBAG / 119S511 projesiyle finansal olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na ve analizlerimin sonuçlanmasında hizmetleriyle destek sağlayan HÜNİTEK Laboratuvarı'na,
Ankara'ya geldiğim günden beri mesafeleri bana hissettirmeyen, her gün beni motive eden ve bana inanan, bu yola çıktığım ilk günden beri hedeflerim ve hayallerimi gerçekleştirmem konusunda desteklerini bir an olsun bile esirgemeyen, hayatımın her aşamasında cesaretli ve sabırlı olmayı bana aşılayan başta çok kıymetli annem olmak üzere babam ve kardeşime,
En içten teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım. İyi ki varsınız.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Plasenta Dokusu	3
2.1.1. BeWo Hücre Hattı.....	4
2.2. HUVEC Hücre Hattı	5
2.3. H295R Hücre Hattı.....	6
2.4. Steroidojenik Etkileşimler	8
2.5. Üç Boyutlu Hücre Kültür Sistemleri.....	17
2.6. Transwell Inert Sistemi	19
2.7. Kriyojeller	10
2.7.1 Kriyojellerin Doku İskelesi Olarak Kullanılması.....	11
2.8. PHEMA	11
2.9. Antidepresanların Gebelikte Kullanımı	13
2.10. Brintelliks ve Etken Maddesi Vortiooksetin	14
2.11. İnsan Koryonik Gonadotropin (β -hCG) Hormonu	14
2.12. Östriol Hormonu	15
2.13. Östradiol Hormonu	15
2.14. Dehidroepiandrosteron (DHEA) Hormonu	16
2.15. Progesteron Hormonu	16
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	18
3.1. Kullanılan Madde ve Malzemeler	18

3.2. Hücre Kültür Koşulları	19
3.2.1. BeWo ve HUVEC Hücrelerinin Üretimi ve Pasajlanması	19
3.2.2. BeWo ve HUVEC Hücrelerinin Çözdürülmesi ve Dondurulması	20
3.2.3. H295R Hücrelerinin Çözdürülmesi ve Dondurulması.....	21
3.3. Vortioxetin Stok Çözeltisinin Hazırlanması	21
3.4. Sterilizasyon.....	22
3.5. Transwell Sistem Kullanarak 3B Hücre Modelinin Oluşturulması.....	22
3.6. MTT Canlılık Analizi	26
3.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi...	28
3.7. Hormon Seviyelerinin ELISA ile Belirlenmesi	28
3.8.1. β -hCG Hormon Seviyesinin ELISA ile Belirlenmesi.....	29
3.8.2. Östriol (E3) Hormon Seviyesinin ELISA ile Belirlenmesi	29
3.8.3. Östradiol (E2) Hormon Seviyesinin ELISA ile Belirlenmesi.....	30
3.8.4. DHEA Hormon Seviyesinin ELISA ile Belirlenmesi.....	31
3.8.5. Progesteron Hormon Seviyesinin ELISA ile Belirlenmesi.....	32
3.9. İstatistiksel Analizler	34
4. SONUÇLAR.....	35
4.1. Kriyojel Sisteminde MTT Hücre Canlılık Sonuçları	35
4.1.1. PHEMA Kriyojel Sisteminde MTT Hücre Canlılık Sonuçları.....	36
4.1.2. PHEMA Tip IV Kol+FA Kriyojel Sisteminde MTT Sonuçları.....	37
4.2. İnsan Koryonik Gonadotropin (β -hCG) Hormonu Elisa Analizi Sonuçları.....	41
4.2.1. PHEMA Kriyojel Sisteminde İnsan Koryonik Gonadotropin (β -hCG) Elisa Hormon Analizi Sonuçları.....	41
4.2.2. PHEMA Tip IV Kol+FA Kriyojel Sisteminde İnsan Koryonik Gonadotropin (β -hCG) Hormonu Elisa Analizi Sonucu	43
4.3. Östriol (E2) Hormonu Elisa Analizi Sonuçları.....	46
4.3.1. PHEMA Kriyojel Sisteminde Östriol (E2) Hormonu Elisa Analizi Sonuçları.....	46
4.3.2. PHEMA Tip IV Kol+FA Kriyojel Sisteminde Östriol (E2) Hormonu Elisa Analizi Sonuçları	48
4.4. Östradiol (E3) Hormonu Elisa Analizi Sonuçları.....	51
4.4.1. PHEMA Kriyojel Sisteminde Östradiol (E3) Hormonu Elisa Analizi	

Sonuçları.....	51
4.4.2. PHEMA Tip IV Kol+FA Kriyojel Sisteminde Östradiol (E3) Hormonu Elisa Analizi Sonuçları.....	53
4.5. DHEA Hormon Analizi Sonuçları	55
4.5.1. PHEMA Kriyojel Sisteminde DHEA Hormonu Elisa Analizi Sonuçları.....	56
4.5.2. PHEMA Tip IV Kol+FA Kriyojel Sisteminde DHEA Hormonu Elisa Analizi Sonuçları.....	58
4.6. Progesteron (Pg) Hormon Analizi Sonuçları	60
4.6.1. PHEMA Kriyojel Sisteminde Progesteron (Pg) Hormonu Elisa Analizi Sonuçları	60
4.7.2. PHEMA Tip IV Kol+FA Kriyojel Sisteminde Progesteron (Pg) Hormonu Elisa Analizi Sonuçları.....	62
4.7. Taramalı Elektron Mikroskopisi Sonuçları	67
5. TARTIŞMA	70
6. YORUM.....	74
7. KAYNAKLAR.....	76
EKLER	82
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	82
ÖZGEÇMİŞ	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsan plasentanın ilk trimesterdeki yapısı ve hücre tipleri.....	4
Şekil 2.2. H295R hücresinin steroidojenik yolağı.....	7
Şekil 2.3. Folik asidin moleküler yapısı.....	12
Şekil 3.1. Tez kapsamında oluşturulan hücre kültür sistemi modelleri.....	26
Şekil 3.2. Genel deney süreci akış şeması.....	34
Şekil 4.1. PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (BeWo:HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası MTT canlılık analizi.....	36
Şekil 4.2. Transwell içerisinde PHEMA kriyojel İki OK ve Üç OK gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası MTT canlılık analizi.....	37
Şekil 4.3. PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (BeWo: HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası MTT canlılık analizi.....	38
Şekil 4.4. Transwell içerisinde PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel İki OK ve Üç OK gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası MTT canlılık analizi.....	39
Şekil 4.5. PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası β -hCG hormon ölçümü.....	42
Şekil 4.6. Transwell içerisinde PHEMA kriyojel ikili ve üçlü ortak kültür gruplarında (3BeWo:1HUVEC \pm H295R) 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası β -hCG hormon ölçümü.....	43
Şekil 4.7. PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası β -hCG hormon ölçümü.....	44
Şekil 4.8. Transwell içerisinde PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel ikili ve üçlü ortak kültür gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası β -HCG hormon ölçümü.....	45
Şekil 4.9. PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası Östtiol hormon ölçümü.....	47

Şekil 4.10. Transwell içerisinde PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası β -hCG hormon ölçümü.....	48
Şekil 4.11. PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası östriol hormon ölçümü.....	49
Şekil 4.11. Transwell içerisinde PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası Östriol hormon ölçümü.....	50
Şekil 4.13. PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası Östradiol hormon ölçümü.....	51
Şekil 4.14. Transwell içerisinde PHEMA İkili ve Üçlü ortak kültür gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası Östriol hormon ölçümü.....	52
Şekil 4.15. PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası Östradiol hormon ölçümü.....	54
Şekil 4.16. Transwell içerisinde PHEMA Tip IV Kol+FA İkili ve Üçlü ortak kültür gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası Östradiol hormon ölçümü.....	55
Şekil 4.17. PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası DHEA hormon ölçümü.....	56
Şekil 4.18. Transwell içerisinde PHEMA İkili ve Üçlü ortak kültür gruplarında 2. 4. ve 7. Gün Vortioksetin uygulaması sonrası DHEA hormon ölçümü.....	57
Şekil 4.19. PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası DHEA hormon ölçümü.....	58
Şekil 4.20. Transwell içerisinde PHEMA İkili ve Üçlü ortak kültür gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası DHEA hormon ölçümü.....	59
Şekil 4.20. PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası Progesteron hormon ölçümü.....	61

Şekil 4.21. Transwell içerisinde PHEMA İkili ve Üçlü ortak kültür gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası Progesteron hormon ölçümü.....	62
Şekil 4.23. PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası Progesteron hormon ölçümü.....	63
Şekil 4.24. Transwell içerisinde PHEMA Tip IV Kol+FA İkili ve Üçlü ortak kültür gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası Progesteron hormon ölçümü.....	64
Şekil 4.25. PHEMA kriyojelin A'da ok ile belirtilen yapı içerisinde hücreler görüntülenmiştir.....	68
Şekil 4.26. PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojelin B'de ok ile belirtilen yapı içerisinde hücreler görüntülenmiştir.....	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Transwelle aktarılan kriyojel içeren deney grupları.....	25
Çizelge 4.1. PHEMA ve PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel grupları arasında MTT analizi sonuçları karşılaştırılması.....	40
Çizelge 4.2. Sistemlerin Hormon Analizi sonuçları karşılaştırılması.....	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat derece
µM	Mikro molar
µl	Mikro litre
M	Molar
kDA	kilodalton

Kısaltmalar

2B	İki Boyutlu
3B	Üç Boyutlu
APS	Amonyum Persülfat
BeWo	İnsan plasenta koryokarsinom hücreleri
β-hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin
CD31	Trombosit Endotel Hücre Yapışma Proteini
CYP 17	17α-hydroxylase
CYP 19	Aromataz Sitokrom P450
DMEM F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Ham's F-12
DMSO	Dimetil Sülfoksit EDTA Etilendiaminotetraasetik asit
E1	Östron
E2	Östradiol
E3	Östriol
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Analizleri
FA	Folik asit

FN	Fibronektin
FSS	Fötal Sığır Serum
HDM	Hücre Dışı Maddeler
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
HUVEC	İnsan Göbek Kordonu Ven Hücreleri
Tip IV Kol	Tip IV Kolajen
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SSRI	Serotonin Geri Alım İnhibitörü
PHEMA	Poli (2-hidroksietil metakrilat)
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilen Diamin
H295R	Adenokortikal Karsinom Hücre Hattı
Pg	Progesteron
DHEA	Dehidroepiandrosteron
DHEA-S	Dehidroepiandrosteron Sülfat
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
LH	Luteinize Edici Hormon
PECAM-1	Trombosit Endotel Hücre Yapışma Molekülü olan CD31 Proteinini Kodlayan Gen
PEGDA	Poli (etilen glikol) Diakrilat
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörünü

1. GİRİŞ

Plasenta bariyer dokusu, gebelik sürecinde besin maddelerinin maternal- fetal geçişini, transfer kapasitesini, geçiş gradiyentini ve fetoplental ile uteroplental kan akışını belirleyen önemli bir yapıdır. Son yıllarda, gebelik süresince kimyasal maddelere ve ilaçlara maruz kalma oranlarında önemli bir artış yaşanmaktadır. Ancak, insan üzerinde etik nedenlerle testler yapılamamaktadır. Bu nedenle, plasenta bariyerinin geçirgenliği hakkındaki eksiklikleri gidermek için güncel plasenta bariyer modellerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, insan plasenta koryokarsinom hücreleri (BeWo) ile insan göbek kordonu ven endotel hücreleri (HUVEC) ve adrenal bez adenokarsinom hücreleri (H295R) hatları bir araya getirilerek plasenta dokusu üç boyutlu (3B) sistemlerde modellenmiştir. Kriyojeller, hücrelerin yüzeye tutunmasını ve proliferasyonunu sağlayabilen birbirine bağlı makro gözeneklerden oluşan materyallerdir.

Bu çalışmada, biyouyumlu poli (2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) kriyojeller kullanılarak hücre dışı matriks (HDM) ile desteklenmiş 3B por yapısına sahip bir sistem oluşturulmuştur. PHEMA kriyojellere folik asit (FA) bağlanmış ve Tip IV Kolajen (Tip IV Kol) yapıyla birleştirilerek *in vitro* ortamda *in vivo* plasenta dokusunu taklit eden bir ortam oluşturulmuştur.

Tez çalışmasında BeWo ve HUVEC hücrelerinin birarada kullanıldığı kriyojel ve transwell sistemleri kullanılmıştır. Bu iki hücreye ilave olarak ortama gerekli hormon desteğini sağlayan H295R hücresi de eklenerek *in vivo* ortamı taklit eden daha etkin bir 3B sistem oluşturmak amaçlanmıştır. Optimize edilmiş kriyojeller hücrelerle birlikte kullanılarak transwell insert sistemine eklenmiş, etkinlikleri karşılaştırılmış ve antidepresan etken maddesi vortiksetinin toksisitesi değerlendirilmiştir. Oluşturulan sistemin vortiksetin etken maddesine verdiği yanıt hücre canlılık analizi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca grupların taramalı elektron mikroskopunda (SEM) morfolojik görüntüleri incelenmiş, alınan supernatantlarda koryonik gonadotropin (β -hCG), progesteron, dehidroepiandrosteron (DHEA), östriol ve östradiol hormon analizleri yapılmıştır.

Sonuçlara göre, PHEMA kriyojele Tip IV Kolajen ve Folik Asit bağlanmasının hücrelerin tutunmasında ve çoğalmasında artış sağladığı gösterilmiştir. Vortiksetinin doz

uygulamasý ile ortak kültürün hücre canllğında azalma görülmüştür. Sonuçlar kriyojel içeren transwell sisteminin ortak kültürler için biyouyumlu olduğunu göstermiştir. Transwell içeren PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel gruplarında β -hCG, progesteron, DHEA, striol ve östradiol hormon miktarlarında artışlar gözlenmiştir. PHEMA Tip IV Kol+FA ve PHEMA gruplarında yapılan SEM analizi sonucunda Tip IV Kolajen ve Folik Asit kaplı kriyojel grubunda hücrelerin uyumlulukları, proliferasyonu ve yayılımı artış göstermiş olup daha belirgin morfolojiye sahip oldukları gözlenmiştir. Bu 3B transwell kriyojel sistemi yeni ilaç denemeleri, kozmetik maddeler, doku mühendisliği çalışmaları gibi alanlarda kullanılabileceği anlaşılmıştır.

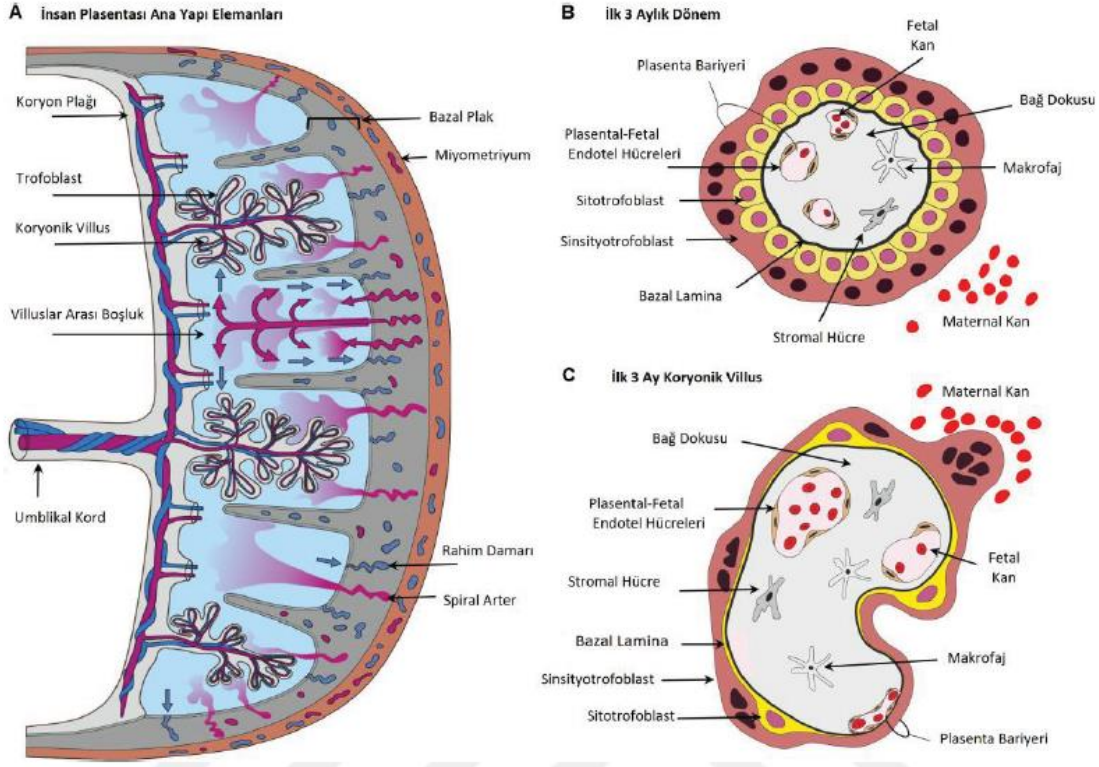
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Plasenta Dokusu

Hemikoryal plasenta, maternal uterusu ait dokular ve maternal dokuya implante olan embriyonun ara yüzeyinde meydana gelen bariyer doku olarak yer almaktadır. Endometriyumun koryonik vezikül, desidua bazalis ve fetal trofoblast kısmında oluşmaktadır ve ayrıca koryon frondosum olarak da bilinmektedir [1].

İnsan plasentasu, anne ve fetüs arasındaki temel yapı olarak fetüsün gelişiminde oldukça önemlidir. Plasenta dokusu, anneden fetüse oksijen ve besinlerin geçişini sağlar, hamileliği desteklemek için hormonlar üretmesinin yanı sıra çeşitli metabolitler ve karbondioksit için bir boşaltım organı işlevi görmektedir. Aynı zamanda, fetüsün maternal dolaşım yoluyla toksik ksenobiyotiklere maruz kalmasının engellenmesinde rol oynamaktadır. Plasentadaki taşıma ve metabolizma süreçleri, fetüsün ksenobiyotiklere maruz kalmasını belirleyebilir. Bu nedenle, ksenobiyotiklerin ortaya çıkardığı fetal maruziyeti tahmin etmeye çalışırken bu süreçlerin anlaşılabilmesi adına çalışmalar oldukça önemlidir [2].

Plasentanın işlevsel birimleri olan kotiledonlar, koryon zarından köken alan villus adı verilen yapıların bir araya gelmesiyle oluşur (Şekil 2.1). Villuslar, plasentanın temel yapı taşlarıdır ve fetal kılcak damarları içeren bol miktarda damarlı bir mezoderm, sitotrofoblast hücrelerini çevreleyen kotiledon yapısı ve en dışta sinsityotrofoblastlardan oluşur [25].



Şekil 2.1. İnsan plasantasının ilk trimesterindeki, plasantanın yapısı ve hücre tipleri gösterilmiştir [3].

İnsan plasentası CYP 17 (17α -hidroksilaz) aktivitesi göstermediği için *de novo* östrojen ve türevi hormonları üretememektedir. Fetal adrenal bez ve karaciğer tarafından üretilen androjen öncüllerine ihtiyaç duymaktadır ve hamilelik esnasında östrojen hormonu öncülü östriolün %90'ının fetal öncüllerden üretildiği bilinmektedir [9].

2.1.1. BeWo Hücre Hattı

JEG-3, JAr ve BeWo hücre hatları, insan koryokarsinomundan türetilen ve in vitro çalışmalarda normal trofoblast hücreleriyle karşılaştırılan morfoloji ve biyokimyasal özelliklere sahip hücre hatlarıdır. Plasenta dokusunda malign tümörü karakterize eden yoğun gonadotropin hormonu üretimi, gebelik sonrası, ortaya çıkabilir. Araştırmalar, bu tümörün farklılaşmamış sitotrofoblast hücrelerinden kaynaklandığını göstermiştir. Sitotrofoblast hücrelerinin in vitro koşullarda kültüre edilerek ölümsüz hale getirilmesi, plasenta hücrelerinin in vitro koşullarda kültüre edilerek ölümsüz hale getirilmesi plasenta üzerinde yapılan çalışmalar için önemlidir. BeWo hücreleri trofoblastları en iyi şekilde karakterize eder ve tek tabaka halinde kültüre edildiğinde yaygın olarak kullanılır. Bu hücreler Hcg, progesteron, östrojen gibi plasental hormonları salgılar. BeWo

hücreleri, forskolin maddesinin uygulanmasıyla sinsityotrofoblast hücrelerine dönüştürülebilir. BeWo hücreleri, gebeliğin ilk trimesterindeki sitotrofoblast hücrelerinin özelliklerini yansıtırken, olgunlaştırıldığında da son trimesterdeki sinsityotrofoblastların özelliklerini gösterir. Bu sebepler BeWo hücrelerinin plasenta araştırmalarında kullanımını artırmaktadır.

Steroidojenik yolda androjenik maddelerden östrojenik maddelere dönüşmesi CYP 19 (Aromataz Sitokrom P450) aktivitesi sayesinde gerçekleşmektedir. BeWo hücrelerinde CYP 19 aktivitesinin olduğu bilinmektedir. Daha önceki yapılan çalışmalarda da gösterildiği gibi fetoplasental ortak kültür modeli hormon üretimi ve fetoplasental steroidojenik etkileşimi temsil eden bir model olarak oluşturulmuştur [10,11].

2.2. HUVEC Hücre Hattı

Endotel hücreleri, damarları içten kaplayarak tek tabaka halinde yer alan hücrelerdir. Mezenşimal kök hücrelerden farklılaşan anjiyoblastlardan gelişen endotel hücreler, dışarıdan aldıkları sinyalleri membran veya sitoplazmalarında bulunan reseptörler aracılığıyla almaktadır [4].

Endotel hücrelerinin hücreler arasındaki etkileşimleri sayesinde doku bütünlüğünün korunması ve sinyalizasyonu sağlama işlevi bulunmaktadır.

Endotel hücreleri yüzey reseptörleri sayesinde vaskülogenez ve anjiyogenez sürecin oluşumunda oldukça önemli rol oynamaktadır. Vaskülogenez damar oluşumunun ilk basamağı olarak bilinmektedir [5].

Endotel hücreleri organizmaya ait çeşitli dokularda yer alan kan damarlarından izolasyonu sağlanabilmekte ve biyomedikal uygulamalarda sıklıkla tercih edilmektedirler. Çalışmada kullanılacak endotel hücre çeşidi, kullanılacak dokuya özgü olarak seçilmektedir. HUVEC hücre hattı, in vivo endotel hücrelerini en iyi şekilde taklit ettikleri için çalışmalarda sıkça tercih edilmektedir. HUVEC'ler, endotel hücre özelliklerini taşırlar, elde edilmeleri kolay ve maliyeti düşüktür. Ayrıca in vitro çalışmalara uyum sağlayabilir, proliferasyon yeteneklerini korurlar ve kolayca pasajlanabilirler [22,23]. HUVEC'ler vasküler endotel hücrelerinin fiziksel özelliklerini temsil eder ve pasajlamadan sonra karakteristik özelliklerini korurlar, bu nedenle in vitro pek çok model oluşturmak için kullanılırlar. Endotel hasarı ve onarımı, apoptoz, preeklamsi, kanser, ateroskleroz, pıhtılaşma, doku mühendisliği, biyomateryaller ve rejeneratif tıp gibi çeşitli biyolojik süreçler ve hastalıklarla ilgili çalışmalarda da kullanılmaktadırlar [24].

HUVEC hücreleri, vasküler endotel hücre özelliklerinin ve biyobelirteçlerinin çoğunu taşırlar. Bu hücreler besin maddelerinin, çözünen maddelerin ve elektrolitlerin geçişinde seçici bir bariyer olarak görev alır ve plasenta dokusunun bariyer özelliğine destek sağlamaktadır [24].

2.3. H295R Hücre Hattı

H295R hücre hattı, steroid hormonlar üretebilme potansiyeline sahip epitelyal adenokortikal karsinom hücreleridir. İlk olarak 1980’de adenokortikal karsinom hastası bir kadından izole edilmiştir. İlk tümör hücrelerine ait popülasyonlar hastadan alınarak kültüre edilmiş ve oluşturulan hücre hattı NCI-H295R olarak adlandırılmıştır. Östrojenin öncül maddeleri H295R tarafından sentezlenmektedir. Özellikle endokrin bozucu kimyasalların sebep olduğu etkilerin araştırıldığı çalışmalarda tercih edilen bir hücre hattıdır [6].

Bu hücre hattının en önemli özelliği fetal adrenal bezdeki tüm enzimatik kapasiteye sahip olması ve adrenal androjenleri üretebilmesidir. En dış bölgede aldosteron, orta bölgede kortizol ve iç bölgede adrenal androjenler, DHEA (Dehidroepiandrosteron) ve DHEA-S (Dehidroepiandrosteron Sülfat) sentezlenmektedir. Adrenal korteksteki 3 bölgeninde enzimlerini üretebilmesi ve genlerini ifade edebiliyor olması steroidogenezin *in vitro*’da çalışılabilmesi için kullanışlı bir model oluşmasını sağlamaktadır [7].

In vitro çalışmalarda belirli bölgeye özgü steroid hormon gruplarının sentezinin sağlanabilmesi için hormonal endojen düzenleyicilerle NCI-H295R hücrelerine uygulama yapılarak destek sağlanabilmektedir. Hücrelerin Angiotensin II’ye ve K⁺ uyarımlarına aldosteron üretimini önemli ölçüde artırarak yanıt verdiği gösterilmiştir [7].

Yapılan bir çalışmada, hücre hattındaki steroidojenik gen ekspresyonu ile normal insan yetişkin adrenalindeki ekspresyonu arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, diğer hücre hatlarına kıyasla sitotoksositeye karşı daha az hassasiyetle birlikte H295R hücrelerini adrenokortikal fonksiyonu ve steroidogenezin düzenlenmesini incelemek için en uygun *in vitro* model haline getirmektedir [8].

Mikrovillus içeren fenotipe sahip olmaları, düzensiz, yuvarlak veya oval çekirdekler ile karakterize edilmektedirler. Diğer malign hücreler gibi artmış bir çekirdek/sitoplazma oranına sahiptirler. Hücre salgı aktivitesinin indikatörleri olarak çok sayıda mitokondri içermektedirler [6].

bilinmektedir. İnsan H295R adrenokarsinom hücre hattı, steroid hormon sentezi üzerindeki etkilerin araştırılması için yararlı bir *in vitro* modeldir. H295R hücre hattı, Şekil 2.2’de belirtilen steroidogenez için tüm anahtar enzimleri kodlayan genleri ifade eder. Bu oldukça önemli bir özelliktir çünkü bu genlerin *in vivo* ifadesi, doku ve gelişim aşamasına özgüdür ve tipik olarak steroidogenezde yer alan tüm genleri ifade eden tek bir doku veya bir gelişim aşaması yoktur. H295R hücreleri, bölgesel olarak farklılaşmamış insan fetal adrenal hücrelerinin fizyolojik özelliklerine sahiptir. Hücreler, hem kortikosteroid sentezi hem de androjenler gibi seks steroid hormonlarının üretimi üzerindeki etkilerin test edilmesini sağlayarak yetişkin adrenal korteks ve gonadlarda bulunan tüm steroid hormonlarını üretme yeteneğine sahip oldukları için benzersiz bir *in vitro* sistemi temsil etmektedir [11].

2.4. Steroidojenik Etkileşimler

Steroidojenik yolakta androjenik maddelerden östrojenik maddelere dönüşmesi CYP 19 aktivitesi ile mümkün olmaktadır. BeWo hücrelerinde CYP 19 aktivitesinin olduğu bilinmektedir. Fetoplasental ortak kültür modeli hormon üretimi ve fetoplasental steroidojenik etkileşimi temsil eden bir model olarak oluşturulmuştur [11].

2.5. Üç Boyutlu Hücre Kültür Sistemleri

Hücre kültüründe kullanılan plastik kültür ortamları üzerinde yapışık hücreler kullanan geleneksel yöntem olarak bilinen hücre kültür tekniği, hücre hatlarını pasajlamak, proliferasyonunu sağlamak ve optimize edilmiş ortamda üretilibilmelerini sağlamak hücreleri kullanarak çalışmalar için oldukça etkili bir tekniktir ve uzunca zamandır kullanılmaktadır. Bununla birlikte, iki boyutlu ortamda (2B) ilaçlara, toksinlere veya *in vivo* ortamdaki gibi sinyal değişiklikleri vb. fizyolojik süreçlere hücrelerin cevabı aynı olamamaktadır. Uzun yıllardır çalışmalarda kullanılan hayvan modelleri maliyetli olmakla birlikte, tecrübe gerektirir, uzun süreli besleme ve bakım, kalite-kontrol gerektirir ve etik kaygılar bulundurmaktadır [47].

Deney yapılmak istenen hücre veya doku, deney hayvanı ile insan arasında yapısal özellikler, biyokimyasal yollar, fizyolojik süreçler gibi pek çok yönden farklılıklar gösterebilmektedir [47].

Geleneksel yöntemlerin sınırlılıkları doğal veya sentetik biyomalzemelerin de eklendiği çok hücreli mikro dokuda *in vivo* koşulları sağlamaya çalışan üç boyutlu (3B) kültür sistemleri geliştirilmiştir.

Tarihsel olarak, 3B kültürler ilk olarak kanser biyolojisinde ilaç testi için kullanılmıştır [47]. Üzerinde hücrelerin de üretilebildiği polimer malzemelerden oluşan iskele veya iskelesiz sistemler olarak oluşturulabilmektedir. Tez çalışması kapsamında 3B hücre kültür sistemi olan iskele modeli olarak kriyojel sistem ve transwell insert sistemi kullanılmıştır.

2.6. Transwell Insert Sistemi

Transwell insert olarak adlandırılan 3B hücre kültür ortamı, üst (apikal) ve alt (bazal) olmak üzere iki ayrı bölümden oluşan, hücre kültür ortamı içerisine eklenebilen ve filtre zarı içeren bir sistemdir. Mikro gözenekli filtre zarları, epitel hücrelerini kültüre etmek amacıyla 1950'lerde filtrelerle ayrılmış embriyonik fare dokularının morfogenetik özelliklerini incelemek amacıyla ilk kez kullanılmıştır. Transwell insertler, apikal ve bazal yüzeylerden çeşitli moleküllerin salgılanmasını desteklerken aynı zamanda bazal membrana bağlanmalarını sağlayan hücreler için substratlar sağlayabilmektedir. Bu sayede *in vivo* meydana gelen süreçlere benzer metabolik süreçlerin *in vitro* ortamda modellenmesi için kullanılmaktadır. Transwell insert sistemi, epitel hücre hattı göçü, gelişimi ve doku modellemesi çalışmalarında oldukça etkin bir şekilde hücre tek tabakasının her iki yüzeyinin incelenmesini sağlayan bir modeldir. İnsert gözenek boyutu, bu tekniğin başarısındaki en önemli adımdır. Transwell insert gözenek boyutu çok çeşitli biçimlerde, boyutlarda, kaplamalarda ve gözenek boyutlarında ticari olarak oluşturulmaktadır. Kullanılan hücre tipine ve oluşturulması planlanan deney sistemine bağlıdır. Transwell[®], hücre yapışmasını artırmak için özel bir kolajen kaplamalı kolajenle işlenmiş yapıya sahiptir [49].

2.7. Kriyojeller

Kriyojel sentez süreci çapraz bağlama aşaması ile başlayarak polimerik çözeltinin dondurulması, gözenek oluşumu için donmuş halde tutma, makro gözenekler oluşturan bileşiklerin çapraz bağlanması ve son olarak oda sıcaklığında çözülmesi ile sonlanmaktadır. Kriyojeller, yapısal bütünlüklerini korurken büyük miktarlarda suyu absorbe edebilen polimer zincir ağlarıdır. Biyoyumluluk ve biyobozunurluk, hidrofilitiklik ve canlı dokulara benzerlik gibi arzu edilen pek çok özelliklerinden dolayı

biyomedikal mühendisliği, biyoteknoloji ve doku mühendisliğinde geniş çapta kullanılmaktadır [12,15].

Kriyojeller; kriyojenik yapıya sahip polimer malzeme olarak bilinmektedir. Kriyojellerin avantajları üç boyutlu süper ve makro gözeneğe sahip çapraz bağlı yapısı sebebiyle kimyasal ve yapısal kararlılıklarından kaynaklanmaktadır [13].

Kriyojellerin makrogözenekli yapısı, ozmotik ve mekanik kararlı yapıya sahip olması sayesinde çeşitli biyolojik uygulama alanlarında oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadır ve oldukça önem arz etmektedir. Kriyojeller, çeşitli şekillerde (disk, küre, silindir, monolitik kolon) sentezlenebilen ve farklı alanlarda kullanılabilen biyomalzemelerdir. Bu kriyojeller sentetik veya doğal polimerlerle sentezlenebilme özelliğine sahiptir, bu da kullanımlarını avantajlı hale getirmektedir. Hücreler, virüsler, plazmidler, organeller, proteinler, nükleik asitler gibi biyolojik nanopartiküllerin kromatografisi, DNA saflaştırması, biyopolimer veya hücre immobilizasyonu, ilaç salım sistemleri, moleküler baskılama, biyosensörler ve doku mühendisliği gibi birçok alanda doku iskelesi olarak son yıllarda sıkça kullanılan biyomalzemelerdir [16,17,18].

Kriyojeller, yapısal olarak birbirine bağlantılı gözeneklere sahip, yüksek şişme kapasiteli ve geniş yüzey alanı içeren makro gözenekli hidrojel yapıya sahiptirler. Yapılan bir araştırmada doku mühendisliğinde kullanılan hidrojellerde kademeli gözenek boyutu dağılımının avantajları gösterilmiştir. İnsan vücut dokusu heterojen bir morfoloji sergilediği için doku mühendisliği çalışmalarında kriyojellerin kullanılması oldukça uygun görünmektedir [14].

2.7.1. Kriyojellerin Doku İskelesi Olarak Kullanılması

Doku mühendisliği uygulamaları, hasarlı doku veya organların yenilenmesini ve onarımı için bir alan olup, hücrelerin büyüme faktörleri ile birlikte kullanılarak üç boyutlu destek yapı iskelelerinin üretilmesini ve kullanılmasını amaçlamaktadır. Bu üç boyutlu yapı iskelelerinin, besin ve oksijeninin hücrelere ulaşmasını kolaylaştıran birbirine bağlı gözeneklerle çekillendirilmesi önemlidir. Doku iskeleleri, doğal veya sentetik polimerlerden bağımsız olarak sentezlenebileceği gibi, aynı zamanda birlikte sentezlenebilirler [19].

Hücrelerin hayatta kalabilmeleri için yeterli çoğalma alanına sahip olmaları oldukça önemli bir etmendir. Gözenekler, hücrelerin tutunmasının yanı sıra oksijen ve besin

alışverişini sağlayarak hücrelerin sağlıklı bir şekilde büyümesini destekler. Hipoksi durumunda ise serbest radikallerin oluşması hücrelerin ölümüne neden olabilir. Bu nedenle, geniş gözenekli doku iskelelerinin oluşturulması gereklidir. Kriyojelasyon yöntemi ile üretilen kriyojeller, makro veya süper makro gözeneklere sahip olmaları nedeniyle doku mühendisliği çalışmalarında avantajlıdır. Kriyojeller, doğal ve sentetik biyomalzemelerden yapılan 3 boyutlu mekanik dayanıklı jel matrislerdir ve hücre davranışı en iyi şekilde taklit edebilirler. Heterojen bir yapıya sahip olan kriyojeller hidrojel sınıfına girer ve hidrojellere göre daha avantajlı bir iskele sağlarlar. Ayrıca, doğal biyomalzemeler içermesi sayesinde doku vaskülarizasyonu ve yeni doku oluşumunu daha hızlı bir şekilde gerçekleştirebilirler [20].

2.8. PHEMA

Kriyojellerin monomer içerikleri ve reaksiyon bileşenlerinin konsantrasyonları, kriyojelleşme sürecini önemli ölçüde etkilemektedir. Daha düşük moleküler ağırlıklara sahip monomerlerin, daha büyük moleküler ağırlıklara sahip monomere kıyasla daha büyük gözenekler oluşturması beklenmektedir. Ayrıca reaksiyon bileşenlerinin miktarındaki artış kriyojellerin rijitliğini, kriyojel duvarlarının kalınlığını ve elastikiyetini artırmaktadır. Ayrıca, kriyojelleşme hızı artar ve kriyojelleşme, daha konsantre polimer içeriklerinin kullanılmasıyla daha verimli gerçekleşmektedir. Kriyojellerin hazırlanmasında genellikle suda çözünür monomerler tercih edilmektedir. HEMA, N-izopropilakrilamid (NIPA), akrilik asit (AAc), N',N'-dimetilakrilamid (DMA), N',N'-dietilakrilamid (DEA) ve akrilamid (AAm), kriyojel hazırlama için kullanılan bazı monomer türleridir [21].

Poli (2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA), sentetik bir biyomalzeme olup, 2- hidroksietil metakrilat (HEMA) adlı kimyasal bir bileşiğin çapraz bağlanmasıyla oluşturulur. PHEMA malzemelerinin doku iskelesi olarak kullanılabilirliğini artıran özellikleri yüksek biyoyumluluk, toksik olmama, antijenik özellikler göstermeme, mekanik dayanıklılık ve oksijen geçirgenliği gibi faktörlerdir. PHEMA'lar, olumlu özelliklere sahip olmaları ve doku mühendisliğinde sık tercih edilmelerine rağmen, hücrelerin yüzeyine yeterli şekilde yapışma yeteneğine sahip değildir. Bu nedenle, doku iskelelerinin sentezlenmesinde, PHEMA gibi sentetik malzemelere destek olmak amacıyla doğal malzemeler olan kolajen, jelatin ve fibronektin gibi bileşenler kullanılarak hücrelerin daha iyi tutunabileceği ve canlılıklarını sürdürebileceği bir iskele ortamı

2.9. Antidepresanların Gebelikte Kullanımı

Uluslararası araştırmalar, depresyonun büyük çoğunluğunun 18-44 yaş aralığındaki kadınlarda, özellikle doğurganlık süreçlerini içeren dönemlerde görüldüğünü göstermektedir. Bu süreçlerin hormonal, biyolojik ve psikososyal değişiklerin yaşanması, kaygı ve stres gibi bir çok etkenlerle ilişkilidir. Gebelikte depresyon sıklığı %12-36 arasında değişir ve bu durumla doktorlarına başvuran gebelerin %8-10'u antidepresan ilaç tedavisi almaktadır. Dünya genelinde reçeteli olarak satılan antidepresanlar, en yaygın kullanılan ilaç grubudur ve seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) olarak bilinen ilaçlar (%10) arasında en sık kullanılanıdır. SSRI'ların etki mekanizması, serotonin (5-HT) geri alım taşıyıcısına (SERT) bağlanarak serotoninin presinaptik nöron tarafından tekrar alımını engelleyerek sinaptik boşlukta serotonin seviyelerinin artmasını sağlamaktır [10].

Plasentanın işlevsel birimi olan trofoblastların SSRI (seçici serotonin geri alım inhibitörleri) ile maruziyeti, trofoblast invazyonu, utero-plasental arterlerin yeniden yapılandırılması ve trofoblast farklılaşması gibi çeşitli süreçleri etkileyebilir. Bu durum erken doğum oranlarının artışı, düşük doğum ağırlığı, nöro-davranışsal bozukluklar, gerilemiş fetal gelişim, intrauterin büyüme kısıtlamaları ve preeklampsi gibi sorunlara neden olabilir. Bu nedenle, gebelikte risk oluşturabilecek antidepresanların kullanımına ilişkin endişeler artmış ve gelecek nesillerin sağlığı için daha fazla araştırmanın yapılması gerektiği vurgulanmıştır. Son 10 yıldır, gebelik sırasında kullanılan ilaçların plasenta aracılığıyla fetüse aktarılması ve bu ilaçların postnatal ve embriyonik gelişim üzerindeki etkileri, dünya genelinde ilaç düzenleme ve halk sağlığı kurumları tarafından incelenmektedir [10].

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

2.9.1. Brintelliks ve Etken Maddesi Vortiksetin

Britelliks ilacı, antidepresan özelliğini daha etkili bir şekilde göstermesi amacıyla sentezlenen yeni bir ilaçtır [45].

Brintellix'in etken maddesi olan vortiksetin, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanarak satışa sunulmuştur. Vortiksetin, serotonin, norepinefrin, dopamin, asetilkolin, histamin, glutamat ve gama-aminobütirik asit sistemleri gibi çeşitli

sistemlerde nörotransmisyonu düzenleyerek antidepresan etki gösterir. Bu, majör depresif bozukluk gibi duygudurum ve biliş ile ilişkili bozukluklarda yer alan karmaşık sinir ağlarını düzenlemesini sağlar. Vortioksetin'in farmakolojik etkisine çok az katkıda bulunan metabolitleri Lu AA34443 ve Lu AA39835 kan dolaşımında bulunur, ancak serotonin reseptörlerine bağlanmadıklarından farmakolojik olarak etkisizdir. Vortioksetin, Türkiye'de bir süre reçetesiz olarak satılmıştır, bu yüzden ilaca maruziyetin sonuçlarını araştırmak ve bu konudaki çalışmaları desteklemek, özellikle ülkemiz için büyük önem taşımaktadır. Vortioksetin, 298.45 g/mol ağırlığındadır ve C₁₈H₂₂N₂S-Hbr moleküler formülüne sahiptir. Vortioksetin yüksek oranda plazma proteinlerine bağlanır (%99) ve metabolizması çeşitli sitokrom P450 (CYP2D6) izoenzimleri tarafından gerçekleştirilir. Karaciğerde oksidasyon yoluyla metabolize edilen Vortioksetin, daha sonra idrar yoluyla difosfat glukuronosiltransferaz ile atılır. İlacın yarılanma ömrü 66 saattir ve ortalama biyoyararlanımı %75 olarak bilinmektedir. Vortioksetin gebelikte C kategorisinde yer almaktadır. Gebelerde Vortioksetin'in etkilerini içeren yeterli veri bulunmadığından, bu konuda yapılan sınırlı sayıda hayvan deneyleri fetüs üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceğini göstermektedir [50].

2.10. İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu (β -hCG)

Gebeliğin başlamasından itibaren, embriyonun endometriyuma tutunmasından sonra trofoblast hücreleri tarafından türetilen hCG hormonu, gebeliğin temel hormonu olarak işlev görmektedir. hCG, 14.5 kDA ağırlığında iki farklı alt birimden meydana gelen, kovalent bağlanmış ve toplamda 237 aminoasit içeren glikoprotein yapısında bir hormondur [32].

Literatürde en çok çalışılan trofoblast hormon ürünü hCG'dir. Gebelikte bu glikoprotein, korpus luteumu involüsyondan kurtardığı için kritik öneme sahiptir ve yumurtalık granüloza hücrelerinin progesteron salgılamasını sağlamaktadır [33].

2.11. Östriol Hormonu (E3)

Yirmiden fazla östrojen bulunmasına rağmen, klinik anlamda 3 tanesi önem arz etmektedir. Bu 3 östrojen östron (E1), Östradiol (E2) ve Östriol (E3) olarak isimlendirilmektedir [34].

E3, plasentada farklı türde östrojenlerin salınımını sağlamaktadır fakat üretilen ana hormon östriol'dür. Plasental östrojenlerin temel iki görevi bulunmaktadır; ilki meme dokusunun uyarılması iken, diğer görevi ise rahimin doğuma hazırlanması için gereken oksitosin hormonunun reseptörlerini arttırmaktır [35].

Östriol hamilelik sırasında plasentada en çok salgılanan steroid hormondur ve temel gebelik hormonu olarak geçmektedir. En önemli görevlerinden biri rahim kaslarının kasılmasının baskılanmasıdır. Bu anlamda progesteron ile ters şekilde çalışmaktadırlar. Bu sayede erken doğum veya düşük olma ihtimali engellenebilmektedir [36].

Normal hamilelikte sürekli östrojen salgılanmasında artış görülürken, östriol salgılanması hamileliğin sağlık durumu ve fetüsün genel durumunu değerlendirmede kullanılmaktadır. Bunun nedeni östriol için öncül meddelerin %90'ının fetal adrenallerden gelmesidir. Klinikte fetüsün iyi halini değerlendirmek için östriol hormon ölçümü yapılmaktadır [36].

2.12. Östradiol Hormonu (E2)

Östradiol (E2) kadın cinsiyet özelliklerinin gelişimini ve sürdürülmesini kontrol eder ve bu nedenle kadınlık hormonu olarak adlandırılmaktadır. E2, kadındaki üreme yolları içerisindeki birincil östrojendir ve tüm steroid hormonları gibi kolesterol kökenlidir. Ovaryumdaki granüloza hücrelerinde üretilmektedir. E2, yumurtalıklardan kandaki hedef hücrelere taşınır, esas olarak seks hormonu bağlayıcı globüline bağlanır. Hedef hücrenin plazma membranından difüzyon ile geçer ve sitozolik östrojen reseptörlerine bağlanır. Bunun sonucunda E2-reseptör kompleksi DNA'ya bağlanır ve gen transkripsiyonunu düzenler. E2 seviyesinin düşük olması hipotalamusu uyararak FSH ve LH hormonlarının salınmasını uyarmaktadır. FSH ve LH hormonları ise yumurtalığı uyararak E2'nin daha fazla üretilmesine sebep olur. E2 ovaryumdan sentezlenirken, ovaryum işlevlerini değerlendirmek için kullanılmaktadırlar [34].

2.13. DHEA Hormonu

Dehidroepiandrosteron (DHEA) vücutta en bol bulunan steroid hormonlarından biridir. Cinsiyet steroidleri, östrojenler ve androjenlerin öncül maddesidir. Esas olarak adrenal korteksin en içteki bölgesinden salgılanmakla birlikte beyinden de salgılanmaktadır. Vücutta sülfat bağlı formu (DHEA-SO₄) bulunduğu halde bu formu rezerve edilirken gerektiğinde spesifik hormonlara dönüştürülmektedir [37].

Yetişkinlikte kanda %90 oranı gibi büyük bir oranda bulunmaktadır. Adrenal androjenlerin (DHEA'lar) üretimi forskolin gibi protein-kinaz A yolağının antogonistleri ile uyarılabilir. Kortizol, adrenokortikal hücrelerinden DHEA'nın üretimini uyarabilmektedir. Anne karnında üretilen kortizol plasentada progesteron oluşumunu uyararak fetal adrenal kortekste progesteronun DHEA'ya dönüşümüne neden olur. DHEA, testesteron gibi diğer hormonların üretilmelerini de etkilemektedir. Bunun yanı sıra beyin gelişimini etkileyen glukokortikoidlerin etkinliklerini düzenlemektedir [37].

Fetüsün adrenal bezlerinden büyük miktarda salgılanan DHEA ve DHEA-SO₄ hormonları, plasentada metabolize edilerek gebelik döneminin hakim östrojeni olan östriole dönüştürülmelerinden dolayı oldukça önemlidirler. Ovülasyonun uyarılması amacıyla da kullanılmaktadır. Doğumdan hemen sonra ise iki formun seviyelerinde ciddi bir düşüş görülmektedir [37].

Dolaşım sisteminde DHEA'nın azalması kardiyovasküler dokularda, metabolik ve nöral/merkezi sinir sistemi fonksiyonunda değişikliklere sebep olabilir. DHEA'nın yaşın ilerlemesiyle belirgin şekilde azaldığı bilinmektedir. Bu durumun depresyon ve şizofreni gibi nörolojik hastalıklara neden olduğu bildirilmektedir [38].

2.14. Progesteron Hormonu

Esas olarak korpus luteum ve plasenta tarafından üretilen bir nörosteroid ve nöroaktif bir steroiddir. Progesteron'un (Pg) başlıca işlevleri menstrual döngüyü, gebeliği ve embriyogenezi kapsamaktadır. Hormonun ana rolü ise fetusun gelişimine destek olmaktır [34].

Progesteron'un gebelikteki önemi endometriumu desteklenmesinden kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda hipofiz bezine negatif geri bildirimli inhibisyon yaparak hamilelik süresince yeni bir yumurtlama olmasını engellemektedir. β -hCG'nin, implantasyon sonrası 3-4 hafta boyunca aktif bir şekilde progesteron üretimini teşvik etmesi ile involüsyonu engellemektedir. Pg gebeliğin ilk yarısında bazal vücut ısısını yükseltirken, sodyum ve klorid atılımını da arttırmaktadır [34].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Madde ve Malzemeler

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan 25 cm² (Greiner Bio-One, 690175) ve 75 cm² (Greiner Bio-One, 658175) filtrelili flasklar, hücrelerin yüzeyden kaldırılmasında kullanılan Tripsin/EDTA (%0,25) (Thermo Fisher, 25200056), MTT Analizi için 96 gözlü (Greiner Bio-One, 655180) hücre kültür plakları, fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (Thermo Fisher, 003002), glasyal asetik asit (Carlo Erba, 64-19-7), metanol (Sigma, M10609), toksisitesi incelenen vortiooksetin-hidrobromid (Cayman, 23695), canlılık analizinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]difenilterazolyum bromür (MTT) (Acros organics, 158990010), Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Applichem, 01A3672, 0100), Amonyak (Merck, K13391922) firmalarından temin edilmiştir.

Kriyojel sentezlenmesinde ve analizlerinde kullanılan 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) (Sigma, 477028), poli (etilen glikol) diakrilat (PEGDA) (Sigma, 475629), amonyum persülfat (APS) (Sigma, A9164), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) (Sigma, T9281), gluteraldehit (%25'lik) (Merck, 820.603), kriyojellere HDM elemanları olarak bağlanan, folik asit (FA) (Sigma, F8758) ve Tip IV Kolajen (Tip IV Kol) (Sigma, C7521), SEM analizlerinde kullanılan etanol alkol (Merck, 1.00983.2511), heksametildisilazan (HMDS) (Merck, 8.04324.0250) temin edilmiştir.

Transwell insert deney grubu için (Greiner, 665641) membranı 0.4-µm por genişliğine sahip insertler kullanılmıştır.

ELISA analizlerinde kullanılan Human (Chorionic Gonadotropin) (β-hCG) ELISA Kit (Elabscience, E-ELH0175), E3 (Estriol) ELISA Kit (Elabscience, E-EL-0156), Human/Monkey/Mouse E2 (Estradiol) ELISA Kit (Elabscience, E-EL-0150), Pg (Progesterone) ELISA Kit (Elabscience, E-EL-0154-96T), DHEA (Dehydroepiandrosterone) ELISA Kit Elabscience, E-EL-0115) temin edilmiştir.

3.2. Hücre Kültür Koşulları

Hücre kültür çalışmalarında kullanılmak üzere insan plasenta koryokarsinom hücre hattı Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu'ndan (BeWo, CCL-98™, ATCC®, Manassas, Virginia Eyaleti, Amerika Birleşik Devletleri) temin edilmiştir.

İnsan göbek kordonu ven endotel hücre hattı (HUVEC, CRL-1730, ATCC®) laboratuvarımızda mevcut olup deneylerde kullanmak üzere hücre stokları hazırlanmıştır. İnsan adrenokortikal karsinom hücre hattı Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu'ndan (NCI-H295R, CRL-2128™, ATCC®, Manassas, Virginia Eyaleti, Amerika Birleşik Devletleri) alınmıştır. Pediatrik endokrinoloji/diyabetoloji/metabolik Tıp Üniversitesi Çocuk Kliniği, Bern, İsviçre - Prof. Christa E. Flück tarafından temini sağlanmıştır.

Bu çalışmada ikilenme süreleri sırasıyla BeWo için 39 saat, HUVEC için 25 saat ve H295R için 45 saat olan üç hücre ile ortak kültür modelleri oluşturulmuştur. BeWo hücreleri 20-30, HUVEC hücreleri 20-25, H295R hücreleri ise 25-30 pasaj aralığında kullanılmıştır.

3.2.1. BeWo, HUVEC ve H295R Hücrelerinin Pasajlanması

BeWo hücreleri Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Ham's F-12 (1:1) (DMEM F-12) ortamı içerisinde Cegrogen Biotech (Stadtallendorf, Almanya), %10 fetal sığır serum (FSS) Cegrogen Biotech (Stadtallendorf, Almanya) ve 100 U penisilin/100 µg streptomisin antibiyotik (Capricorn, Scientific) ile desteklenerek üretilmiştir.

HUVEC hücreleri Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Ham's (1:1) (DMEM) ortamında Cegrogen Biotech (Stadtallendorf, Almanya), %10 fetal sığır serum (FSS) Cegrogen Biotech (Stadtallendorf, Almanya) ve 100 U penisilin/100 µg streptomisin antibiyotik (Capricorn, Scientific) ile üretilmiştir.

Hücrelerin ortak kültür edildiği besiyerinin hazırlanması için bazal ortamların besin içerikleri değerlendirilmiştir. DMEM F-12 bazal ortamı, besin içeriği açısından daha zengin bir yapıya sahiptir. HUVEC hücreleri, ortak kültür çalışmaları öncesinde DMEM F-12 besiyerinde üretilerek ortama uyum sağlamışlardır. BeWo hücreleri ile ortak kültür çalışması yapabilmek için HUVEC hücreleri aynı besi ortamında üretilmiştir. Hücreler, flasklarda %80-90 kapasiteye ulaştıklarında tripsinizasyon işlemi uygulanmıştır. Hücrelerin bulunduğu flasklardan atık besiyeri alınmıştır. Kalan besiyeri ortamdaki uzaklaştırmak için 3 mL fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ve birbirlerinden ayrılması için Tripsin/EDTA uygulanmıştır. BeWo ve HUVEC hücreleri, 75 cm²'lik flasklarda üretildikten sonra 2 mL Tripsin/EDTA ile 2 kez yıkanmıştır. Flask içerisinde süspanse hale gelen hücelere önceden 37°C'lik su banyosunda ısıtılmış besi ortamı eklenmiş ve pipetleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücre süspanسیونları yeni flasklara bölünerek taze

besi ortamı eklenmiştir. Hücrelerin kullanıma hazır hale gelmesi için üretimleri, %5 CO₂ ve nem koşullarında, 37°C sıcaklıkta bulunan bir etüvde gerçekleştirilmiştir.

H295R (NCI-H295R, CRL-2128™) insan adrenokortikal karsinom hücre hattı konfluent olana dek 0,5 mM sodyum pirüvat, 1200 mg/L sodyum bikarbonat, 2,5 mM L-glutamin, 5,5 mM HEPES içeren DMEM/F12 besiyerinde %2,5 Nu-serum, %1 ITS karışımı, 100 U penisilin/100 µg streptomisin eklenerek, 37°C de %5 CO₂'li etüvde üretilmiştir.

Ortak kültür besiyeri içeriği, %2,5 Nu Serum (BD Bioscience, 355500), %1 pridoksin (Sigma, P6280), %1 stripped FBS (Sigma, F6765) %1 ITS Premix (BD Bioscience, 354352) ve antibiyotikli DMEM F-12 ile tamamlanarak hazırlanmıştır (Thibeault vd., 2014). Farklı ortam ve sistemlerde üç ayrı hücre bu besiyeri ile desteklenip başarılı bir şekilde üretimi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. BeWo ve HUVEC Hücrelerinin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Hücre stoklarının depolanabilmesi ve aynı pasaj numarasına sahip hücrelerin deneysel çalışmalarda kullanılabilmesi için dondurma işlemi uygulanmıştır. Uzun süreli depolama için, sıvı azot tankları (-196°C) tercih edilmiştir. Hücrelerin dondurularak zarar görmesini önlemek amacıyla kriyoprotektan maddeler kullanılmıştır. Kriyoprotektanlar, hücre içinde buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek hücreyi mekanik hasardan korur ve hücre membranını stabilize etmektedir. Hücreleri dondurmak için, dondurma solüsyonu adı verilen bir çözelti kullanılmıştır. Dondurma solüsyonu, DMSO ve FSS gibi kriyoprotektan maddelerini içermektedir.

Hücre kültürleri, logaritmik (log) fazdayken dondurulmuştur. Hücreler, kültür kabını %80-90 oranında kapladıklarında dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreler, tripsin ile ayrıştırılarak flask yüzeyinden kaldırılmıştır. Süspansiyon haline getirilen hücreler, santrifüj tüpüne aktarılmıştır ve 5 dakika boyunca 800 rpm hızda santrifüj edilmiştir (Eppendorf Centrifuge, 5810R). Santrifüj sonrası, süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre peleti, önceden hazırlanmış olan dondurma solüsyonu (%90 FSS, %10 DMSO) ile birleştirilerek pipetlenir ve kriyotüplere 1 mL hacminde dağıtılmıştır. Hücre bilgileri kriyotüplerin üzerine yazılmıştır. Hücrelerin aşamalı olarak dondurulması için kriyotüpler, başlangıçta -80°C'de tutulmuş ve 1-2 gün sonra kriyotüpler, sıvı azot tankına aktarılmıştır.

Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere -196°C sıvı azot tankından çıkarılan hücrelerin, 37°C'lik su banyosunda 2-3 dakika çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen hücreler, 5 dakika

boyunca 800 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, süpernatant uzaklaştırılarak elde edilen hücre peletinin üzerine önceden su banyosunda ısıtılmış besi ortamı eklenmiş ve pipetlenmiştir. Hücreler, besi ortamı içeren 75 cm² kültür flasklarına aktarılır ve %5 CO₂ ve 37°C sıcaklıktaki bir etüve (Sanyo, MCO18AC) yerleştirilmiştir. Hücrelerin besi ortamı 2 günde bir değiştirilmiştir.

3.2.3. H295R Hücresinin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Tripsinizasyon işlemi ile hücreler yapışık oldukları flask yüzeyinden kaldırılmıştır. Süspanse edilen hücreler santrifüj tüpüne aktarılarak 5 dakika 800 rpm hızda (Eppendorf Centrifuge, 5810R) santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre peleti önceden hazırlanmış olan (%7,5 Nu-Serum, %5 DMSO) besiyeri ile tamamlanarak hazırlanmış dondurma vasatı ile bir araya getirilerek pipetajı yapılmıştır ve 1 mL olacak şekilde kriyotüplere paylaştırılmıştır. Hücre ile ilgili bilgiler kriyotüplerin üzerine yazılmıştır. Hücrelerin kademeli dondurulması için kriyotüpler ilk olarak -80°C'de tutulmuştur. 1-2 gün sonra kriyotüpler sıvı azot tankına aktarılmıştır.

Deneysel çalışmalarda kullanabilmek için -196°C sıvı azot tankından çıkarılan hücrelerin 37°C'lik su banyosunda 2-3 dakika çözülmesi sağlanmıştır. Çözülmesi sağlanan hücreler 5 dakika 800 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak elde edilen hücre peletinin üzerine önceden su banyosunda ısıtılmış olan besi ortamı eklenmiştir ve pipetaj yapılmıştır. Hücreler içerisinde besi ortamı bulunan 75cm²'lik kültür flasklarına aktarılarak %5 CO₂ ve 37°C sıcaklıktaki etüve (Sanyo, MCO18AC) kaldırılmıştır. Hücrelerin besi ortamı 2 günde bir değiştirilmiştir.

3.3. Vortiooksetin Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılmak üzere, toz halindeki vortiooksetin etken maddesinin 5 mg'lık ana stoğu 1 mL DMSO içerisinde çözdürülerek elde edilmiştir. Deneyslerde kullanılmak üzere, Vortiooksetin (Cayman, Amerika) etken maddesinin 5 mg'lık ana stoğu 1 mL DMSO içerisinde çözdürülerek elde edilmiştir. Hazırlanan ana stok serumsuz besiyerleri ile seyreltilerek 1. ara stok (100 µM konsantrasyon) hazırlanmıştır. Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun besiyerindeki son konsantrasyonu en fazla % 0,1 olacak şekilde belirlenmiştir.

Yapılan ön çalışmalarda 7,5 µM ve 15 µM doz sonuçları değerlendirilerek elde edilen sonuçlar doğrultusunda oluşturulan sistemde apikal kısımda bulunan kriyojel üzerinde üretilen BeWo ve HUVEC hücresi ve bazal kısımda tek tabakalı olarak üretilen H295R

hücresi göz önüne alındığında, üç hücreye de uygun olduğu gözlemlenen 30 µM doz seçilerek deneylere devam edilmiştir. Vortiooksetinin 30 µM uygulaması seçilmiş ve ana stoktan serumsuz besiyeri ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Doz uygulaması hücrelerin ikilenme zamanlarına uygun olarak 2. Gün, 4. Gün ve 7. Gün olmak üzere üç farklı inkübasyonda uygulanmıştır.

3.4. Sterilizasyon

12 kuyucuklu plakaları kaplacak şekilde parafilm kesilerek 20 dakika boyunca %70 lik alkol içerisinde bekletilmiştir. Parafilm steril distile su ile muamele edilerek kuyucuklara yerleştirilmiştir.

Kriyojeller ve transwell insertlerin sterilizasyonu için örnekler plakaların kapaklarına yerleştirilerek 45 dakika boyunca UV altında sterilizasyonu sağlanmıştır. Sterilizasyon sonrası kriyojellere %10'luk FBS ve %1'lik penisilin ve streptomisin içeren DMEM/F12 besiyeri 1000 µL eklenerek 2 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası besiyeri kriyojellerden uzaklaştırılarak hücre ekimi gerçekleştirilmiştir.

3.5. Transwell Sistem Kullanarak Kriyojel Üzerinde 3B Hücre Modelinin Oluşturulması

Her jel üzerine 1×10^6 hücre olacak şekilde hücre ekimi tekli kültür için tek aşamada, ortak kültür için iki aşamada gerçekleştirilmiştir ve hücreler pelet halinde kriyojellerin üzerine ekilmiştir. BeWo hücrelerinin ekiminden sonra jellerin üzerine besiyeri eklenmeden 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra HUVEC hücrelerinin ekimi gerçekleştirilmiştir ve jellerin üzerine besiyeri eklenmeden 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. 1 saatlik inkübasyonun sonunda her kriyojelin üzerine 1000 µL besiyeri eklenmiştir.

Kriyojel üzerinde tekli kültürler için, BeWo hücreleri için her jel üzerine 1×10^6 hücre, HUVEC hücreleri için ise her jel üzerine 25×10^4 hücre içerecek şekilde hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonları 5 dakika 800 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar döküldükten sonra peletlerin toplam µL hacmi hesaplanmıştır. Toplam peletin µL hacmi kriyojel sayısına bölünerek jellerin üzerine hücreler ekilmiştir.

Kriyojel üzerinde ortak kültür için 3:1 (BeWo:HUVEC) İki OK, Transwell içerisinde kriyojel içeren gruplar için apikal kısımda BeWo ve HUVEC, bazal kısımda H295R

olacak şekilde (Üç OK grubu) Üç OK ve Transwell içerisinde kriyojel içeren gruplar için apikal kısımda BeWo ve HUVEC içeren İki OK grupları hazırlanmıştır. Şekil 3.2’de detaylı olarak deney akış süreci gösterilmiştir.

BeWo hücreleri her kriyojel üzerine 75×10^4 olacak şekilde, HUVEC hücreleri her kriyojel üzerine 25×10^4 hücre içerecek şekilde hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonları 5 dakika 800 rpm’de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar döküldükten sonra hücre peletlerinin toplam hacmi μL olarak hesaplanmıştır. Toplam peletin μL hacmi kriyojel sayısına bölünerek jellerin üzerine hücreler ekilmiştir. İlk olarak BeWo hücreleri jellerin üzerine ekildikten sonra besiyeri eklenmeden 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra HUVEC hücre ekimi gerçekleştirilmiştir ve yine jellerin üzerine besi ortamı eklenmeden 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. 1 saatlik inkübasyonun sonunda kriyojellerin üzerine 1000 μL DMEM/F12 besiyeri eklenmiştir. 2. 4. ve 7. gün olmak üzere inkübasyona bırakılmıştır. Jellerin üzerindeki besiyeri ortamının %50’si iki günde bir olacak şekilde değiştirilmiştir.

Ön çalışma sonuçlarına göre en yüksek canlılık değerlerine sahip ve en ideal doku iskelesi olarak belirlediğimiz PHEMA ve PHEMA+Tip IV Kollajen+Folik Asit bağladığımız kriyojeller, transwell insert ile birlikte oluşturacağımız sistem için seçilmiştir, bu kriyojel grupları ile deneylere devam edilmiştir [43].

12 kuyucuklu plakaya uygun insert içerisine yerleşecek şekilde uygun boyutta sentezlenmiştir. Tez kapsamında transwell insertlere yerleştirilecek kriyojel gruplarının üzerine BeWo ve HUVEC hücreleri daha önceki kriyojel optimizasyon deneylerimizde kullandığımız ortak kültür miktarı olan 3:1 (BeWo:HUVEC) şekilde gerçekleştirilmiştir. Kriyojel grupları 12 kuyucuklu plakalar içerisindeki insertlere boyut açısından uygun olacak şekilde sentezlenmiştir ve steril edilmiştir. Sterilizasyonu sağlanan kriyojellere ve transwellere hücre ekimi yapılmadan önce kriyojeller hücrenin üreme koşullarına uygun ortamda bekletilmiştir ve bu sayede ideal koşulları alması sağlanmıştır. Kriyojeller BeWo ve HUVEC hücreleri için %10’luk FSS ve %1’lik penisilin/streptomisin içeren DMEM F-12 besi ortamı içerisinde 2 saat bekletilmiştir. Kriyojel gruplarına 3:1 (BeWo:HUVEC) hücre oranıyla ikili ortak kültür oluşturulmuştur. Hücreler kriyojellere hücre peleti olarak ekilmiştir. 3:1 (BeWo:HUVEC) oran için önce BeWo hücresi daha sonra HUVEC hücresinin ekimi iki aşamada ekilmiştir. Kriyojel başına ortak kültür 3:1 oranına toplamda 1×10^6 hücre/jel gelecek şekilde BeWo için 75×10^4 hücre/jel, HUVEC hücreleri için 25×10^4 hücre/jel sayılarında hücre ekimi yapılmıştır. İlk olarak şartlandırma besiyeri

kriyojellerden aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Hücre ekimi için BeWo hücreleri tripsinize edilmiştir ve hücre sayımı yapılmıştır. Sayım sonuçlarına göre hücre süspansiyonları 2, 4 ve 7 gün için üçe bölünerek 15 mL'lik tüplere aktarılmıştır. 5 dakika 800 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernantlar dökülerek her tüpteki hücre peletinin miktarı hesaplanmıştır. Tüplerdeki hücre peletleri kriyojel sayılarına bölünerek jellere ekilmiştir. Kriyojel grupları hücre ekiminden sonra besi ortamı eklenmeden 1 saat %5 CO₂ nem koşullarında ve 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kriyojellere HUVEC hücrelerinin ekimi yapılmıştır. HUVEC hücrelerinin ekimi için aynı işlemler uygulanmıştır. 3:1 ortak kültür kriyojel grupları besi ortamı eklenmeden 1 saat %5 CO₂ nem koşullarında ve 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 3:1 ortak kültür kriyojel gruplarının üzerine 800 µL %10'luk FBS ve %1'lik penisilin/streptomisin içeren DMEM F-12 besi ortamı eklenerek inkübasyona bırakılmıştır.

H295R hücreleri hücre süspansiyonu 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde hazırlanmıştır ve kuyucuk başına 1000 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Hücre grupları (kriyojel) H295R içeren ve içermeyen transwell sistemleri olarak belirlenmiştir. H295R içermeyen kriyojel transwell grubu H295R'nin sisteme katkısını gözlemek amacıyla seçtiğimiz kontrol grubudur (Çizelge 3.1).

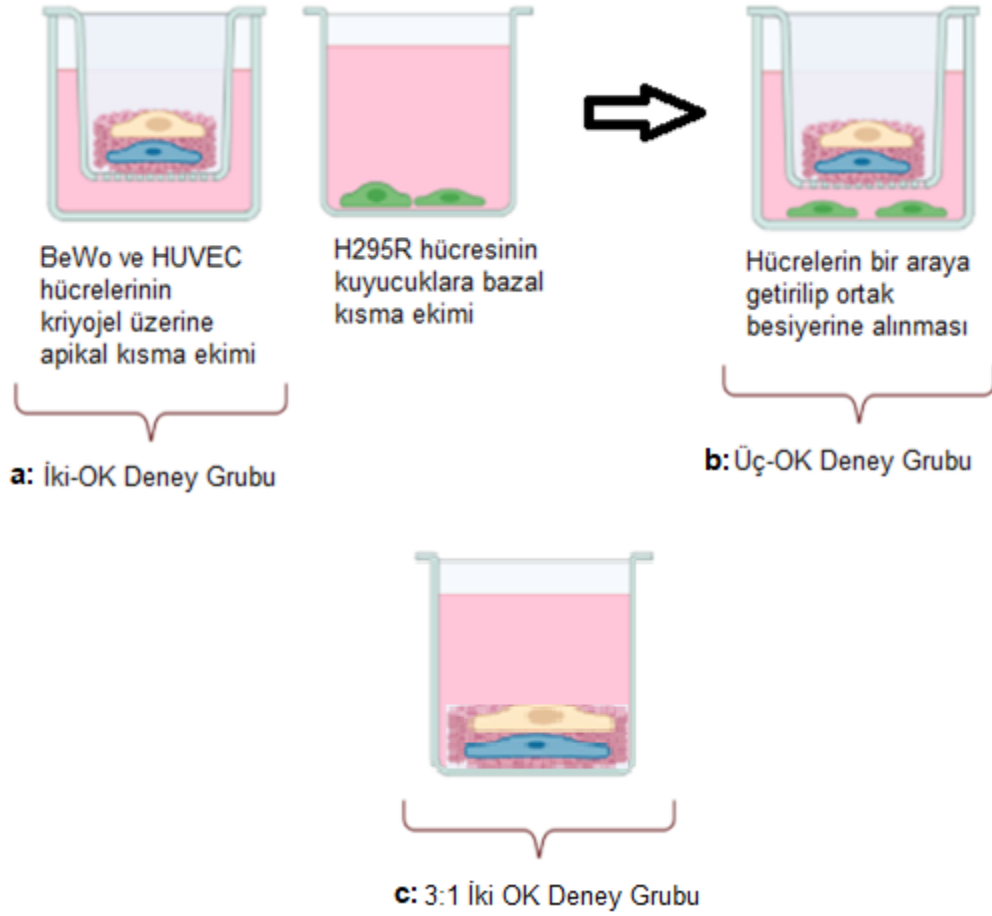
Plaka içerisinde ayrı ayrı kültüre edilen (kriyojel üzerindeki ortak kültür ve H295R) hücre gruplarının ekiminden 24 saat sonra hücrelerin üzerinde bulunan besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Öncelikle H295R bulunan kuyucuklara 1000 µl ortak kültür besiyeri eklenmiştir. Steril pens kullanılarak içerisinde kriyojel bulunan insertler deney düzeneğine uygun olacak şekilde H295R içeren kuyucuğa yerleştirilmiştir. Kriyojel bulunan insert içerisine 800 µl ortak kültür besiyeri eklenmiştir. Bu sayede aynı besiyeri içerisinde üçlü ortak kültür sistemi oluşturulmuştur.

Çizelge 3.1. Transwell'e aktarılan kriyojel içeren deney grupları (3:1 oranı BeWo:HUVEC hücre ortak kültürü oranını göstermektedir).

Kriyojel Grupları	Deney Grubu	Hücre		
		BeWo	HUVEC	H295R
PHEMA	İkili Ortak Kültür (İki-OK) Apikal	+	+	-
	Üçlü Ortak Kültür (Üç-OK) Apikal	+	+	+
	Üçlü Ortak Kültür (Üç-OK) Bazal	-	-	+
	3:1 İkili Ortak Kültür (3:1 İki-OK)	+	+	-
PHEMA Tip IV Kolajen + Folik Asit	İkili Ortak Kültür (İki-OK)	+	+	-
	Üçlü Ortak Kültür (Üç-OK)	+	+	+
	Üçlü Ortak Kültür (Üç-OK) Bazal	-	-	+
	3:1 İkili Ortak Kültür (3:1 İki-OK)	+	+	-

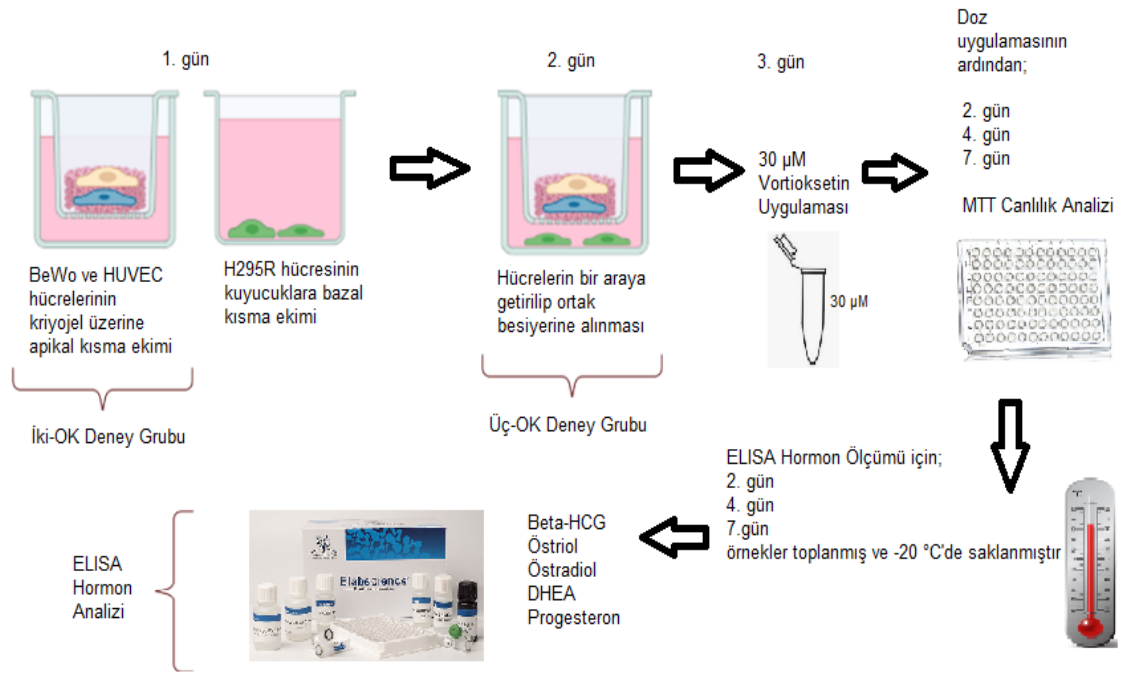
Kriyojellerin Transwell Sistemlere Aktarılması

BeWo ve HUVEC hücreleri ile Transwell sistemi üzerinde oluşturulmuş ortak kültür modelleri literatürde yer almaktadır. Fetal bölmeyi temsil eden H295R hücrelerinin de ortak kültür modeline dahil edilmesi ve kriyojel sistemle bu tez kapsamında birleştirilmesi ise ilk kez gerçekleştirilmiştir. Transwell'e aktarılmış bir iskele olan kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücrelerinin bir arada bulunması hücrelerin büyümesi ve gelişmesi için oldukça uygun ortam sağlamaktadır (Şekil 3.1.)



Şekil 3.1. Tez kapsamında oluşturulan hücre kültür sistemi modelleri. a: İki-OK deney grubu (Transwell içerisindeki kriyojelin üzerinde BeWo ve HUVEC hücrelerinin bulunduğu sistem). b: Üç-OK deney grubu (Kuyucuk içerisinde tek tabakalı H295R hücresi). c: 3:1 İki-OK Deney grubu (Kuyucuk içerisindeki kriyojellerde 3:1 (BeWo:HUVEC) kültür sistemi).

Çalışmamız kapsamında PHEMA ve hücre dışı maddeler (HDM) açısından desteklenerek *in vivo*'ya daha yakın bir sistem oluşturmayı amaçlayarak PHEMA Tip IV Kolajen+Folik Asit bağlı olan iki farklı kriyojel iskele üzerinde BeWo ve HUVEC hücrelerinin başarılı bir şekilde üretilmiştir. Çalışmamızın devamında bu kriyojel iskele gruplarını Transwell insert sistemi içerisine alıp aynı ortama üçüncü hücre olarak fetal bölmeği temsil etmek amacıyla H295R hücrelerini dahil ederek *in vitro* ortamda üç farklı hücrenin bir arada başarılı bir şekilde üremesi ve hormon üretmesi sağlanmıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.2. Genel deney süreci akış şeması

3.6. MTT Canlılık Analizi

Satın alınan, MTT (Sigma, Amerika) transwell ve kriyojel içeren sistemlerde canlılık oranının belirlenmesi için kullanılmıştır. İki-OK ve Üç-OK deney gruplarında canlılıkların belirlenmesi için MTT canlılık analizi kullanılmıştır.

Daha öncesinde gerçekleştirilmiş deneylerde en yüksek canlılık değerlerine sahip ve en ideal doku iskelesi olarak belirlediğimiz PHEMA ve PHEMA+Tip IV Kollajen+Folik Asit bağladığımız kriyojel doku iskelesinde 3:1 ortak kültür grubuna Vortioxetin doz uygulaması yapılmıştır ve MTT canlılık analizi ile incelenmiştir [43].

Hücre ekiminden 2 gün sonra (hücrelerin kriyojellere tutunması için geçen süre) doz uygulaması yapılmıştır. Doz uygulaması için besiyerinde hazırlanan 30 µM Vortioxetin kriyojel başına 800 µl olacak şekilde uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise jel başına 800 µl besiyeri eklenmiştir. Tüm kriyojel gruplarının 2, 4 ve 7 gün boyunca doz uygulamasının MTT canlılık analizleri değerlendirilmiştir. Doz uygulanan kriyojellerin inkübasyon süreleri sonunda Vortioxetin ortamdan aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Kriyojel başına 800 µl ve üzerine 80 µL MTT reaktif eklenerek 3 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında oluşan formazan kristallerini çözmek için hazırlanan

DMSO/Amonyak (%95 DMSO, %5 Amonyak) çözeltisi jel başına 800 µL olacak şekilde jellere eklenmiştir ve 15 dakika çalkalanmıştır. Mor renge dönüşen çözeltiden 100 µL çekilerek 96 gözlü steril plakaya aktarılmış ve 550 nm’de mikropalak okuyucuda (BIOTEK, µQuant) spektrofotometrik ölçümü yapılmıştır.

Hücre ekiminden 2 gün sonra 12 kuyucuklu plakada bulunan H295R hücrelerinin üzerinde bulunan ilaçlı besiyeri uzaklaştırılmıştır. Kuyucuk başına 1 mL taze besiyeri ve üzerine 100 µL MTT reaktifi eklenerek 3 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında DMSO/Amonyak (%95 DMSO, %5 Amonyak) çözeltisi jel başına 1000 µL gelecek şekilde jellere eklenmiş ve 15 dakika çalkalanmıştır. Mor renge dönüşen çözeltiden 100’er µL çekilerek 96 gözlü steril plakaya aktarılmış ve 550 nm’de mikropalak okuyucuda (BIOTEK, µQuant) spektrofotometrik ölçümü yapılmıştır. Ölçüm sonucunda açığa çıkan OD (optik dansite) değerleri ile kuyucuklara ekilen H295R hücrelerinin % canlılığı hesaplanmıştır.

Farklı özellikler ile hazırlanmış olan kriyojel doku iskelesine üçlü ortak kültür grubuna Vortiooksetin doz uygulaması yapılmıştır ve MTT canlılık analizi ile incelenmiştir.

Deney gruplarındaki canlılık miktarı formülü:

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

3.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi

İkili Ortak Kültür ve Üçlü Ortak Kültür hücre gruplarında, PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojellerin hücrelerle etkileşimlerini, hücrelerin kriyojel yüzeyine tutunma yeteneklerini ve farklı jellerdeki proliferasyon yeteneklerini anlamak amacıyla hücre ekimi sonrası 7 günün ardından SEM (ZEISS, EVO 50) analizi kullanılarak kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanılabilirliği incelenmiştir. Kriyojellerin gözenek yapısını ve yüzey yapılarını incelemek için, hücre ekimi yapılmamış boş PHEMA ve kriyojellere KOL Tip IV bağlanmasının gözenek boyutları, gözenek duvarları, yüzey ve yığın yapıları üzerindeki etkisini incelemek ve karşılaştırmak amacıyla PHEMA+KOL Tip IV kriyojelin de SEM görüntüleri alınmıştır. Kriyojel gruplarının SEM analizi için her jel grubuna toplamda 1x10⁶ hücre/jel (BeWo 75x10⁴ hücre/jel, HUVEC 25x10⁴ hücre/jel) ekimi yapılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca, kriyojellerin besiyerinin %50’si 2 günde bir değiştirilmiştir. İnkübasyon sonrası, fiksasyon işlemi için öncelikle besiyeri

kriyojellerden uzaklaştırılmış ve jeller PBS ile yıkanmıştır. Kriyojel başına 1 mL %2,5 (v/v) gluteraldehit fiksativi hazırlanarak jellerin üzerine eklenmiş ve jeller +4°C'de karanlıkta 30 dakika boyunca fiksasyona bırakılmıştır. Fiksatif çözeltisi kriyojellerden uzaklaştırılmış ve jeller PBS ile yıkanmıştır. Dehidrasyon işlemi için kriyojeller, %30, %50, %70 ve %100 alkol serilerinde sırasıyla 5 dakika bekletilmiştir. Kriyojel başına 600 µl hekzametildisilazan (HMDS) solüsyonu eklenerek 10 dakika bekletilmiştir. Sonrasında, jeller HMDS içerisinde çıkarılarak oda sıcaklığında kurutulmuş ve SEM görüntüleri alınmıştır. Hücresiz kriyojellerin SEM görüntüleri için HÜNİTEK'ten hizmet alınmıştır (JEOL, JEM 1200 EX, Tokyo, Japonya).

3.8. Hormon Seviyelerinin ELISA ile Belirlenmesi

İkili ortak kültür (BeWo+HUVEC) ve üçlü ortak kültür (BeWo+HUVEC+H295R) süpernatantlar alınarak alikotlanmış ve -20°C'de saklanmıştır.

Transwell'e aktarılmış kriyojel gruplarında kontrol ve 30 µM vortiooksetin uygulanan kültürlerinde 2, 4 ve 7. günlerde süpernatantlar toplanmış ardından ELISA yöntemiyle ikili ortak kültür (BeWo+HUVEC) ve üçlü ortak kültür (BeWo+HUVEC+H295R) süpernatantlar alınarak alikotlanmış ve -20°C'de saklanmıştır.

Hormon kitleri için standart eğri grafiği çıkartılmıştır. Kit protokollerine göre uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kitler Elabscience marka; β-hCG (E-EL-H0175), progesteron (E-EL-0154), Dehidroepiandrosteron (DHEA) (E-EL-0115), östriol (E3) (E-EL-0156), östradiol (E2) (E-OSEL-H0005) olarak belirlenmiştir.

3.8.1. β -hCG Hormon Seviyesinin ELISA ile Belirlenmesi

β-hCG hormon miktarının ELISA yöntemiyle ölçülebilmesi için PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarına hücre ekimi yapılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda jeller PBS ile yıkanmış ve ardından 30 µM vortiooksetin uygulanmıştır.

Deney gruplarından kontrol grubu ve 30 µM vortiooksetin ile inkübasyon süresi 2, 4 ve 7 gün olan gruplardan kültür ortamları alınmıştır. Alınan süpernatantlar -20°C'de saklanmıştır.

β-hCG hormon kitinin talimatları doğrultusunda standart eğri grafiği oluşturulmuştur. Süpernatantlardaki hormon miktarını ölçmek için üreticinin belirttiği protokol izlenerek ilenmiştir.

- Süpernatantlar ve kit solüsyonları, kullanımdan 30 dakika önce oda sıcaklığına getirilmiştir.

- Örnekler, 4°C'de 1000 x g hızında 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir (Hettich, Mikro 22R, Zentrifüjgen, Almanya).

-100 µL örnek, antijen kaplı 96 kuyucuklu ELISA plakalarına eklenmiş ve 37°C'de 90 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

- İnkübasyon süresinin sonunda, kuyulardaki sıvı aspiratörle çekilerek uzaklaştırılmıştır. Yıkama yapılmadan kuyulara 100 µL biyotinle etiketlenmiş tespit çalışma solüsyonu eklenmiş ve 37°C'de 60 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

- Kuyular boşaltılmış ve her bir kuyu 350 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır.

- Her bir kuyuya 100 µL konsantre horse radish peroksidaz (HRP) konjugat çalışma solüsyonu eklenmiş ve 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyular boşaltılmış ve her bir kuyu 350 µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkanmıştır. Kuyulara 90 µL substrat solüsyonu eklenerek, karanlıkta 37°C'de 15 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından her bir kuyuya reaksiyonu durdurmak için 50 µL durdurma solüsyonu eklenmiştir.

- Örneklerin optik yoğunluk (OD) ölçümleri ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Standart eğri grafiğindeki absorbans-konsantrasyon (OD) değerleri için 4-parametrelili lojistik eğri grafiği kullanılmıştır.

3.8.2. Östriol (E3) Hormon Seviyesinin ELISA ile Belirlenmesi

Östriol hormon miktarının ELISA ile ölçülmesi için PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarına İki-OK Apikal, Üç-OK Apikal ve Bazal, 3:1 İki-OK deney grupları için hücre ekimi yapılmıştır. İnkübasyon sonrası jeller PBS ile yıkanmıştır ve sonrasında 30 µM vortiooksetin uygulaması yapılmıştır.

Deney gruplarından kontrol, 30 µM vortiooksetin ile 2, 4 ve 7 günlük inkübasyon sonunda kültür ortamları alınmıştır. Alınan süpernatantlar -20°C'de saklanmıştır.

Östriol hormon kiti için üreticinin talimatları izlenerek standart eğri grafiği oluşturulmuştur. Süpernatantlardaki hormon miktarının ölçümü için aşağıda yer alan üreticinin belirtmiş olduğu protokol uygulanmıştır.

- Süpernatantlar ve kit solüsyonları kullanılmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına çıkartılmıştır.

- Örnekler 4°C 1000 x g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir (Hettich, Mikro 22R, Zentrifüjgen, Almanya).

- Standart çalışma her bir konsantrasyonu, yan yana (her kuyucuk için 50 µL) bir kuyucuğa iki tekrarlı şekilde eklenmiştir. Örnekler her kuyucuğa 50 µL olacak şekilde eklenmiştir. Hemen ardından her kuyucuğa 50 µL Biotinylated Detection Ab çalışma solüsyonu eklenmiştir. 37°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir.

- Tüm kuyucuklardan solüsyon boşaltılmıştır. Tüm kuyucuklara 350 µL yıkama tamponu eklenmiştir. 1-2 dakika beklendikten sonra, yıkama tamponu tüm kuyucuklardan boşaltılmış ve kurutma kağıdı yardımıyla kurutulmuştur. Bu yıkama adımı 3 kez tekrarlanmıştır.

- Her kuyucuğa 100 µL HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklenmiş ve 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.

- Tüm kuyucuklardan solüsyon boşaltılmış ve 2. adımda belirtildiği gibi yıkama işlemi 5 kez tekrarlanmıştır.

- Her kuyucuğa 90 µL Substrat Reaktifi eklenmiş ve 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu aşamada plakanın ışıkla temas etmemesi gerekmektedir.

- Her kuyucuğa 50 µL Durdurma Solüsyonu eklenmiştir.

- 450 nm'ye ayarlanmış bir mikro plaka okuyucu ile her kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) ölçülmüştür.

Standart eğri grafiğindeki absorbans-konsantrasyon (OD) değerleri için 4-parametrelili lojistik eğri grafiği seçilmiştir.

3.8.3. Östradiol (E2) Hormon Seviyesinin ELISA ile Belirlenmesi

Östradiol hormon miktarının ELISA ile ölçülmesi için PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarına hücre ekimi yapılmıştır. İnkübasyon sonrası jeller PBS ile yıkanmıştır ve sonrasında 30 µM vortiooksetin uygulaması yapılmıştır.

Deney gruplarından kontrol, 30 µM vortiooksetin ile 2, 4 ve 7 günlük inkübasyon sonunda kültür ortamları alınmıştır. Alınan süpernatantlar -20°C'de saklanmıştır.

Östriol hormon kiti için üreticinin talimatları izlenerek standart eğri grafiği oluşturulmuştur. Süpernatantlardaki hormon miktarının ölçümü için aşağıda yer alan üreticinin belirtmiş olduğu protokol uygulanmıştır.

- Süpernatantlar ve kit solüsyonları kullanılmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına çıkartılmıştır.
- Örnekler 4°C 1000 x g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir (Hettich, Mikro 22R, Zentrifijgen, Almanya).
- Her kuyucuğa 50 µL standart grupları ve örnekler eklenmiştir. Tüm kuyucuklara Biotinlenmiş Ab solüsyonu eklenmiştir. 37°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir.
- Kuyucuklar boşaltılmış ve 3 kez yıkama yapılmıştır.
- Her kuyucuğa 100 µL HRP Konjugatı eklenmiş ve 30 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir.
- Kuyucuklar boşaltılmış ve 5 kez yıkanmıştır.
- 90 µL Substrat Reaktifi eklenmiş ve 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
- 50 µL Durdurma Solüsyonu eklenmiş ve 450 nm'de okuma yapılarak sonuçlar hesaplanmıştır.

3.8.4. DHEA Hormon Seviyesinin ELISA ile Belirlenmesi

DHEA hormon miktarının ELISA ile ölçülmesi için PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarına hücre ekimi yapılmıştır. İnkübasyon sonrası jeller PBS ile yıkanmıştır ve sonrasında 30 µM vortiooksetin uygulaması yapılmıştır.

Deney gruplarından kontrol, 30 µM vortiooksetin ile 2, 4 ve 7 günlük inkübasyon sonunda kültür ortamları alınmıştır. Alınan süpernatantlar -20°C'de saklanmıştır.

DHEA hormon kiti için üreticinin talimatları izlenerek standart eğri grafiği oluşturulmuştur. Süpernatantlardaki hormon miktarının ölçümü için aşağıda yer alan üreticinin belirtmiş olduğu protokol uygulanmıştır.

- Süpernatantlar ve kit solüsyonları kullanılmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına çıkartılmıştır.
- Örnekler 4°C 1000 x g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir (Hettich, Mikro 22R, Zentrifijgen, Almanya).
- Kuyucuklara örnekler ve standart grupları 50 µL olacak şekilde eklenmiştir.

- Hemen ardından kuyucuğa 50 µL Biotinylated Detection Ab çalışma solüsyonu eklenmiş ve 37°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir.

- Tüm kuyucuklardan solüsyon boşaltılmış, 350 µL yıkama tamponu eklenir, 1 dakika bekletildikten sonra solüsyon boşaltılmıştır. Bu yıkama adımı 3 kez tekrarlanmıştır.

- Her kuyucuğa 100 µL HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklenmiştir ve 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir.

- Tüm kuyucuklardan çözelti boşaltılmıştır ve 2.adımda belirtilen yıkama adımı 5 kez tekrarlanmıştır.

- Her kuyucuğa 90 µL Substrat Reaktifi eklenmiştir ve 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Doğru sonuç elde edilebilmesi için bu aşamada plakanın ışıktan korunması oldukça önemlidir.

6. Her kuyucuğa 50 µL Durdurma Solüsyonu eklenmiştir.

7. 450 nm'ye plaka okuyucu ile her kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) ölçülmüştür.

3.8.5. Progesteron Hormon Seviyesinin ELISA ile Belirlenmesi

Progesteron hormon miktarının ELISA ile ölçülmesi için PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojel gruplarına hücre ekimi yapılmıştır. İnkübasyon sonrası jeller PBS ile yıkanmıştır ve sonrasında 30 µM vortiooksetin uygulaması yapılmıştır.

Deney gruplarından kontrol, 30 µM vortiooksetin ile 2, 4 ve 7 günlük inkübasyon sonunda kültür ortamları alınmıştır. Alınan süpernatantlar -20°C'de saklanmıştır.

Progesteron hormon kiti için üreticinin talimatları izlenerek standart eğri grafiği oluşturulmuştur. Süpernatantlardaki hormon miktarının ölçümü için aşağıda yer alan üreticinin belirtmiş olduğu protokol uygulanmıştır.

- Süpernatantlar ve kit solüsyonları kullanılmadan 30 dakika önce oda sıcaklığına çıkartılmıştır.

- Örnekler 4°C 1000 x g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir (Hettich, Mikro 22R, Zentrifüjgen, Almanya).

- Her kuyucuğa 50 µL standart grupları ve örnekler eklenmiştir. Hemen 50 µL Biotinlenmiş Ab solüsyonu eklenmiştir. 37°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir.

- Kuyucuklar boşaltılmış ve 3 kez yıkanmıştır.

- Her kuyucuğa 100 μ L HRP Konjugat eklenmiştir ve 30 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir.
- Kuyucuklar boşaltılmış ve 5 kez yıkama işlemi uygulanmıştır.
- 90 μ L Substrat Reaktifi eklenmiş ve 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
- 50 μ L Durdurma Solüsyonu eklenmiş ve 450 nm'de OD hesaplanmıştır.

3.9. İstatistiksel Analizler

Tez çalışmasının istatistiksel analizleri, STATISTICA 13 ve IBM SPSS Statistics 23 istatistik programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Önem kontrolü $P \leq 0,05$ düzeyinde yapılmıştır. Vortioksetin uygulamasının analizi için Statistica programında varyans analizi (ANOVA) yöntemi kullanılmıştır. Deneylerde 2., 4. ve 7. gün inkübasyon süreleri incelendiği için varyans analizi modeli oluşturulurken her bir parametre için "vortioksetin konsantrasyonu" ve "inkübasyon süresi" ve olmak üzere iki değişken seçilmiştir. Bu nedenle, çok-yönlü varyans analizi (Factorial ANOVA) kullanılmıştır. Verilerin anlamlılığına bağlı olarak ileri (post hoc) testler uygulanmış ve eşit örneklem büyüklüğüne dayalı Tukey testi kullanılmıştır.

4. SONUÇLAR

4.1. Kriyojel Sisteminde MTT Hücre Canlılık Sonuçları

Hücrelerin daha iyi tutunabilmesi ve çoğalabilmesi için PHEMA temelli sentezlenen kriyojellere kolajen tip IV ve folik asit eklenerek jellere fonksiyon kazandırılmıştır. PHEMA ve PHEMA+Tip IV Kolajen+Folik asit olmak üzere iki farklı kriyojel grubu hazırlanmıştır. Polimerizasyon çözeltilerinde çapraz bağlayıcılar kullanılarak bu kriyojeller sentezlenmiştir. Daha sonra, her iki kriyojel grubuna 24 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde folik asit bağlanması gerçekleştirilmiştir. Bu sürecin ardından PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA olarak adlandırılan iki farklı kriyojel doku iskelesi oluşturulmuştur.

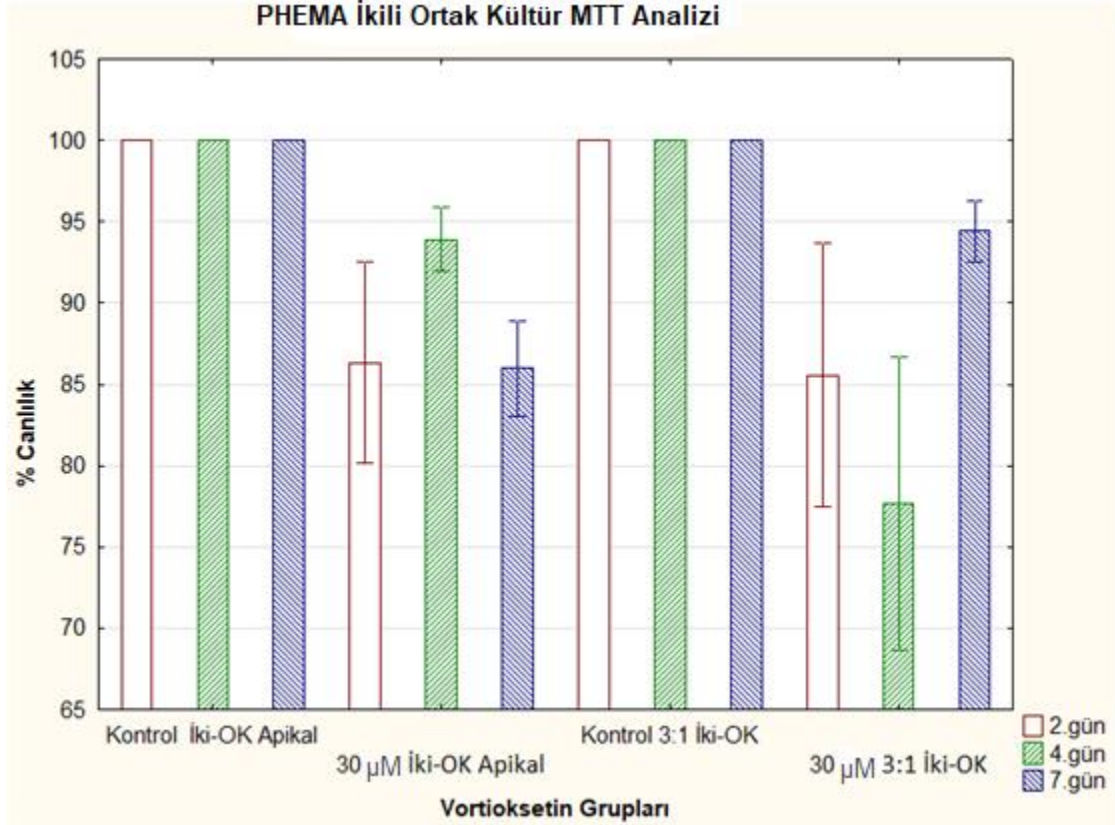
Laboratuvarımızda daha önce yapılan biyoyumluluk analizlerinde PHEMA kriyojel kontrol grubu olarak seçilmiş ve fonksiyon kazandırılan PHEMA+KOL Tip IV, PHEMAGEL, PHEMAGEL+FN, PHEMA+FA, PHEMA+KOL Tip IV+FA, PHEMAGEL+FA ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel grupları ile karşılaştırılmıştır. BeWo hücrelerinin MTT analiz sonuçlarına göre, jelatin, fibronektin, kolajen tip IV ve folik asit ile fonksiyon kazandırılmış kriyojel grupları, kontrol grubu olan PHEMA kriyojel ile karşılaştırıldığında özellikle 7. gün için tüm kriyojellerde hücre canlılık yüzdelerinin PHEMA kriyojeline kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir. PHEMA+KOL Tip IV, PHEMA+FA ve özellikle PHEMA+KOL Tip IV+FA jel gruplarının hücre canlılıkları, jelatin içeren PHEMAGEL, PHEMAGEL+FN, PHEMAGEL+FA ve PHEMAGEL+FN+FA kriyojel gruplarına kıyasla 7. günde belirgin bir artış göstermiştir. Bu sonuçlar, kolajen tip IV ve folik asitin hücre tutunmasını ve çoğalmasını artırdığını göstermektedir.

Bu karşılaştırma sonucunda en iyi sonuçlar elde edilen PHEMA ve PHEMA Tip IV Kol+FA grupları, tez çalışması kapsamında deneylere devam edilmek üzere seçilmiştir.

4.1.1. PHEMA Kriyojel Sisteminde MTT Hücre Canlılık Sonuçları

Transwell'e aktarılan PHEMA kriyojellerde ikili ortak kültür grubu MTT analizi sonucunda 3:1 (BeWo: HUVEC) ikili ortak kültür grubuna kıyasla kontrol ve 30 µM doz uygulaması sonucunda anlamlı bir farklılık olmadığı sonucu elde edilmiştir (Şekil 4.1.).

Deney çalışmalarımız kapsamında transwell içerisine kriyojel eklenerek oluşturulan sistemin (İki-OK), kuyucuk içerisinde kriyojel bulunan (3:1 İki-OK) grubuna kıyasla benzer sonuçlar elde edilmesi oluşturmuş olduğumuz sistemin kontrolünü sağlamıştır.



Şekil 4.1. PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (BeWo:HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası MTT canlılık analizi.

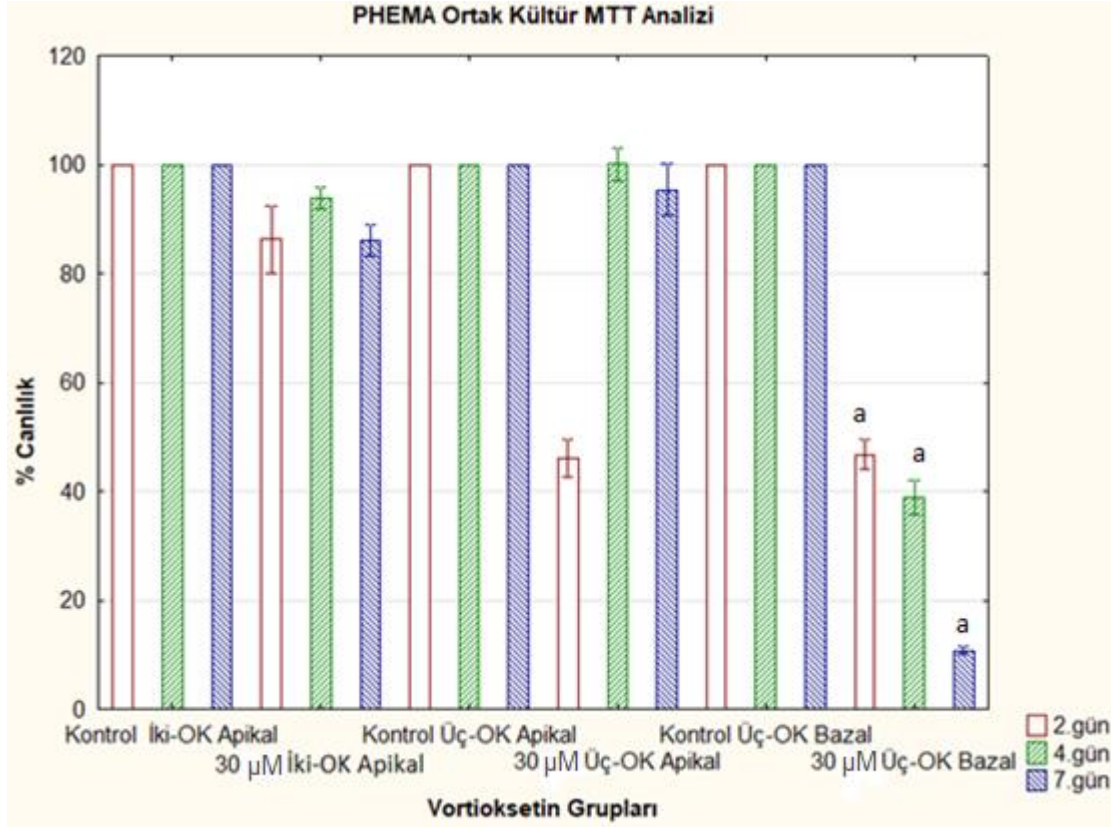
Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol 3:1 İki OK: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK : Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Transwell'e aktarılan PHEMA kriyojellerde MTT analizi sonucunda 30 µM doz uygulanan H295R grubunda kontrole göre 2. 4. ve 7.günlerde canlılık yüzdesinde azalma olduğu görülmektedir (Şekil 4.2.) 2. günün sonunda canlılık yüzdesi %50'ye gerilerken, 4. günün sonunda %40'a kadar, 7.günün sonunda %10'a gerilemiştir.



Şekil 4.2. Transwell içerisinde PHEMA kriyojel İki OK ve Üç OK gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası MTT canlılık analizi. a, Üç OK Bazal 30 µM Vortioksetin uygulanan gruplar kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioksetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioksetin uygulanmış

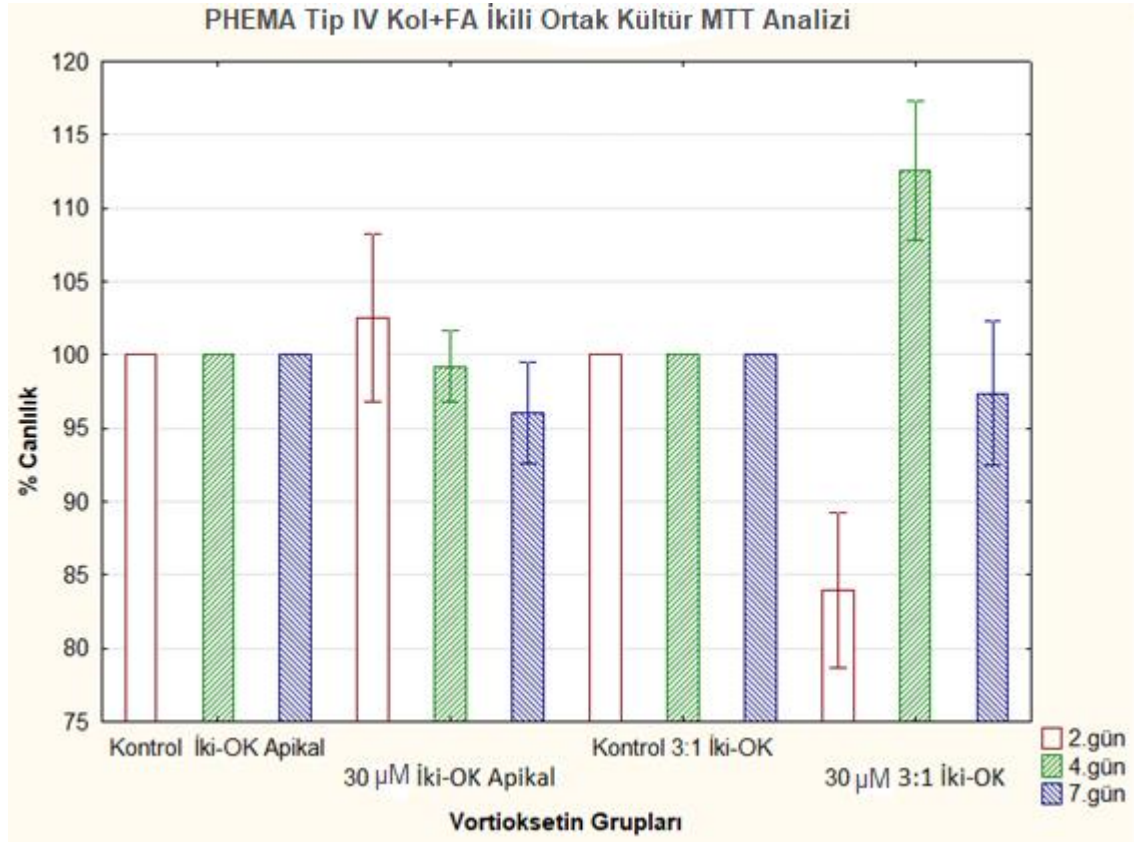
Kontrol Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, doz uygulanmamış

30 µM Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, 30 µM Vortioksetin uygulanmış

4.1.2. PHEMA Tip IV Kol+FA Kriyojel Sisteminde MTT Hücre Canlılık Sonuçları

Transwell'e aktarılan PHEMA+Tip IV Kol+FA kriyojellerde ikili ortak kültür grubu MTT analizi sonucunda 3:1 (BeWo: HUVEC) ikili ortak kültür grubuna kıyasla kontrol ve 30 µM doz uygulaması sonucunda anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur (Şekil 4.3.).

Deney çalışmalarımız kapsamında transwell içerisine kriyojel eklenerek oluşturulan sistemin (İki-OK), kuyucuk içerisinde kriyojel bulunan (3:1 İki-OK) grubuna kıyasla benzer sonuçlar elde edilmesi oluşturmuş olduğumuz sistemin kontrolünü sağlamıştır.



Şekil 4.3. PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (BeWo: HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioksetin uygulaması sonrası MTT canlılık analizi.

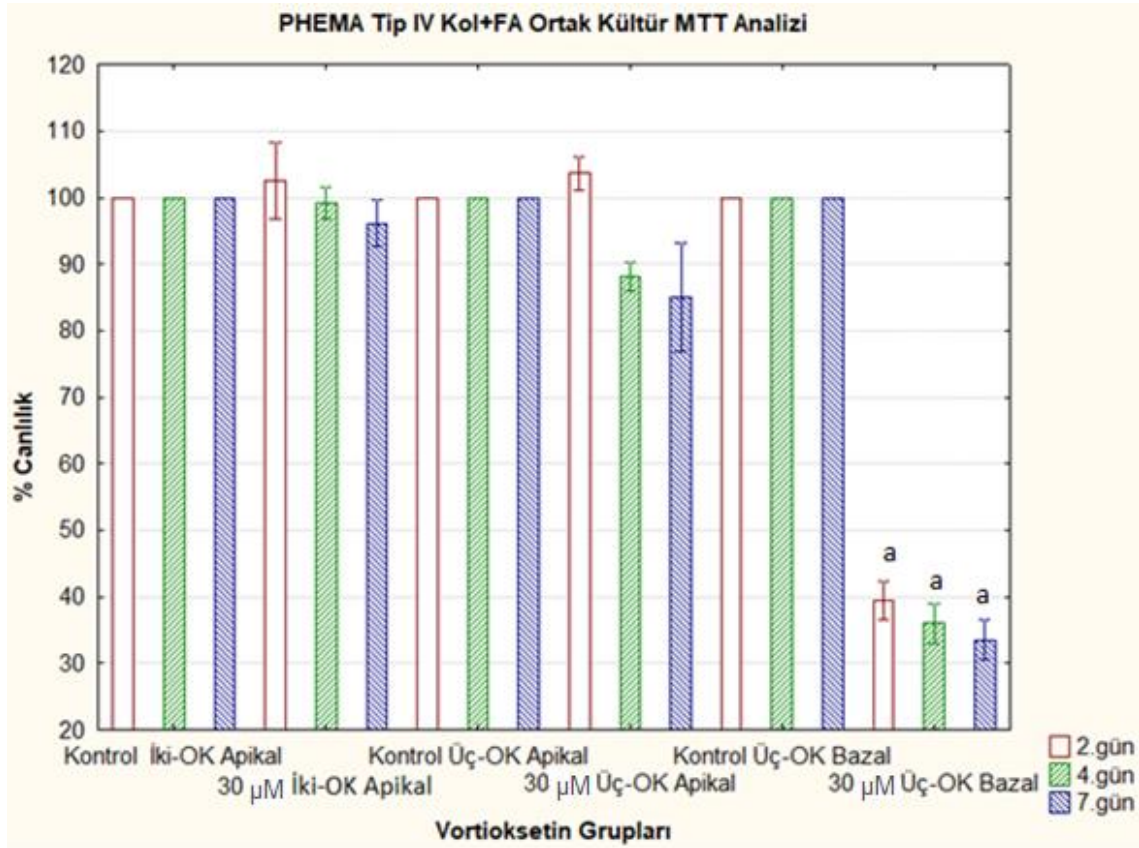
Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioksetin uygulanmış

Kontrol 3:1 İki OK: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK : Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, 30 µM Vortioksetin uygulanmış

Transwell'e aktarılan PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojellerde MTT analizi sonucunda 30 µM doz uygulanan H295R grubunda kontrole göre 2. 4. ve 7. günlerde canlılık yüzdesinde azalma olduğu görülmektedir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Transwell içerisinde PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel İki OK ve Üç OK gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası MTT canlılık analizi. a, Üç OK Bazal 30 µM Vortioxetin uygulanan gruplar kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, doz uygulanmamış

30 µM Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

SİSTEM						
	Kriyojel Grubu	Doz	İki- OK Apikal	3:1 İki - OK	Üç-OK Apikal	Üç-OK Bazal
MTT Analizi Sonucu	PHEMA	Kontrol	düşüş	düşüş	düşüş	düşüş
	PHEMA	30 µM	değişmedi	değişmedi	değişmedi	düşüş
	PHEMA Tip IV Kol+FA	Kontrol	artış	artış	artış	artış
	PHEMA Tip IV Kol+FA 30 µM	30 µM	değişmedi	değişmedi	değişmedi	düşüş

Çizelge 4.1. PHEMA ve PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel grupları arasında MTT analizi sonuçları karşılaştırılması. (Her grup kendi içerisinde (PHEMA ve PHEMA Tip IV Kol+FA) karşılaştırılmıştır.)

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortiksetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortiksetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, doz uygulanmamış

30 µM Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, 30 µM Vortiksetin uygulanmış

4.2. İnsan Koryonik Gonadotropin (β -hCG) Hormonu Elisa Analizi Sonuçları

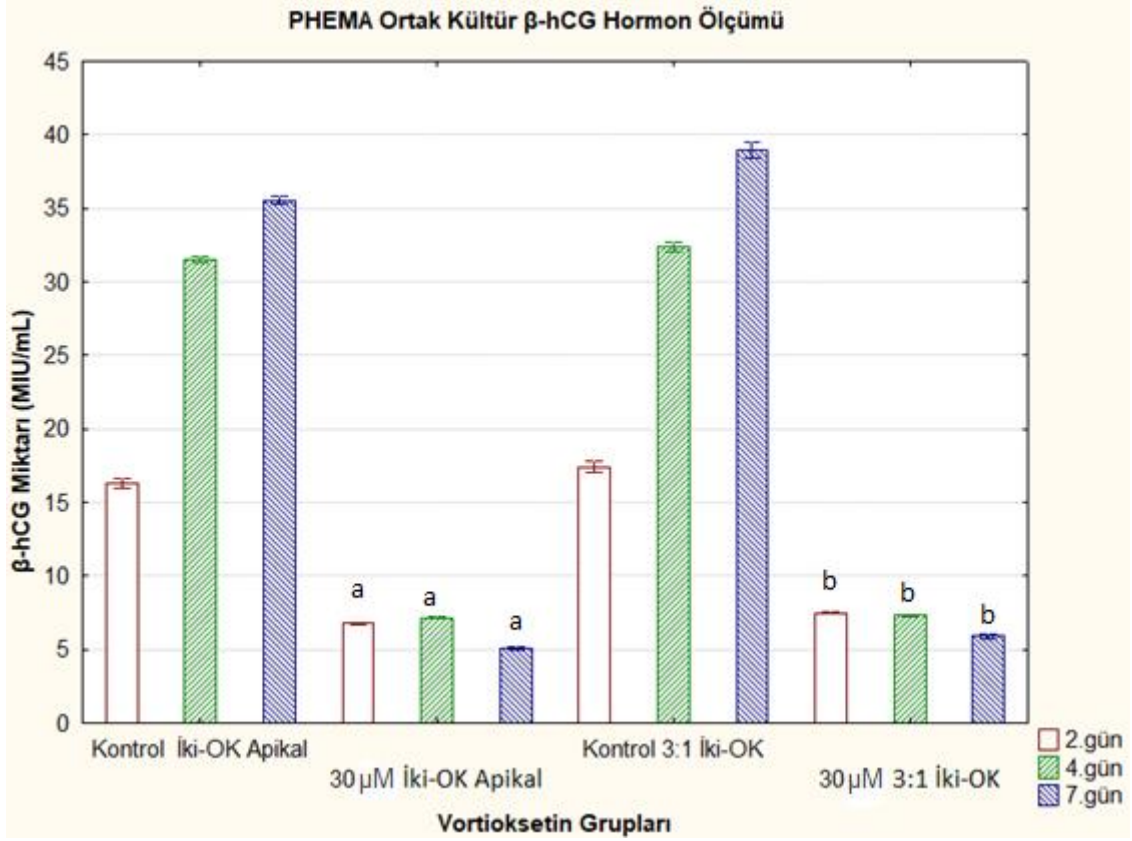
Hamileliğin temel hormonu olan β -hCG hormonu trofoblast hücrelerden salgılanmaktadır. Tez kapsamında kullanılan BeWo hücrelerinin İki OK, Üç OK ve 3:1 (BeWo-HUVEC) hücre oranı ile ortak kültüründeki β -hCG hormonu üretimi PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojellerde incelenmiştir.

4.2.1. PHEMA Kriyojel Sisteminde İnsan Koryonik Gonadotropin (β -hCG) Hormonu Elisa Analizi Sonucu

İki OK Apikal, 3:1 İki OK hücre gruplarının PHEMA kriyojel gruplarındaki β -hCG hormon seviyeleri Şekil 4.5’de verilmiştir.

Transwell’e aktarılan PHEMA kriyojel gruplarında β -hCG hormon ölçümü analizinde İki-OK apikal ve 3:1 İki OK kontrol gruplarına kıyasla 30 μ M doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.5.). İki-OK apikal ve 3:1 İki OK gruplarının her ikisinde de 30 μ M doz uygulanan gruplarda kontrole kıyasla belirgin bir azalma meydana gelmiş olup İki OK ve 3:1 İki OK grubu için 30 μ M doz uygulanan iki deney grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Deney çalışmalarımız kapsamında transwell içerisine kriyojel eklenerek oluşturulan sistemin (İki-OK), kuyucuk içerisinde kriyojel bulunan (3:1 İki-OK) grubuna kıyasla benzer sonuçlar elde edilmesi oluşturmuş olduğumuz sistemin kontrolünü sağlamıştır.



Şekil 4.5. PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası β -hCG hormon ölçümü. a, İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, 3:1 İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

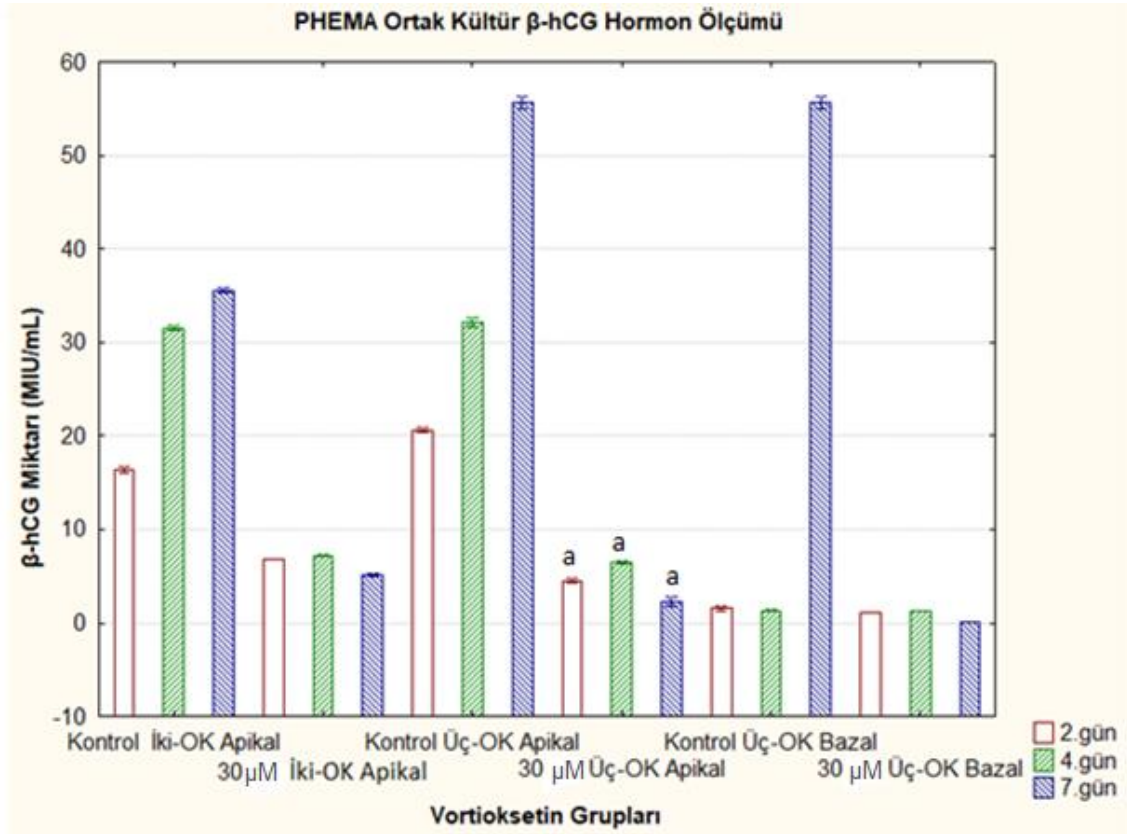
30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol 3:1 İki OK: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK : Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Vortioxetin dozları uygulanan İki OK Apikal, Üç OK Apikal ve Üç OK Bazal gruplarındaki β -hCG hormon seviyeleri Şekil 4.6'da verilmiştir.

Transwell'e aktarılan PHEMA kriyojel gruplarında β -hCG hormon ölçümü analizinde Üç-OK apikal kısmında kontrol gruplarına kıyasla 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür. 7.günde kontrol ve doz grupları arasında fark görülmemiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Transwell içerisinde PHEMA kriyojel ikili ve üçlü ortak kültür gruplarında (3BeWo:1HUVEC±H295R) 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası β -hCG hormon ölçümü. a, Üç-OK Apikal grubu kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, doz uygulanmamış

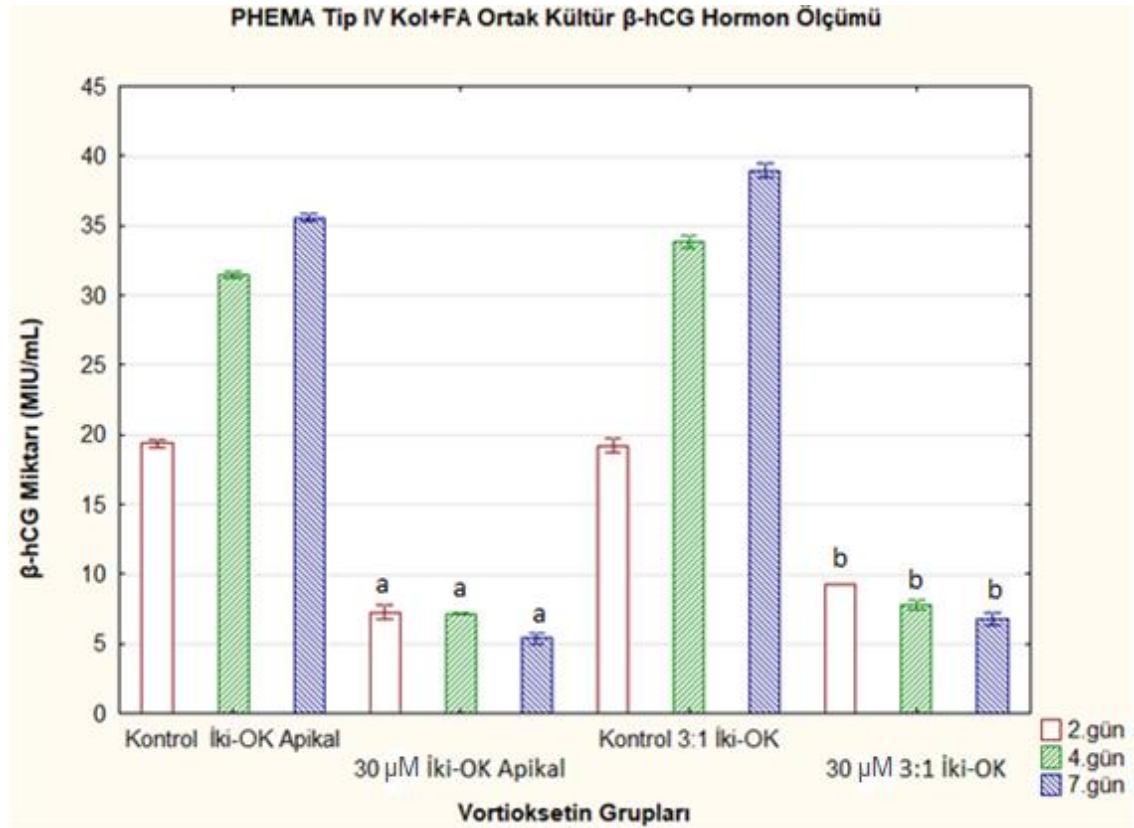
30 µM Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

4.2.2. PHEMA Tip IV Kol+FA Kriyojel Sisteminde İnsan Koryonik Gonadotropin (β -hCG) Hormonu Elisa Analizi Sonucu

İki OK Apikal, 3:1 İki OK hücre gruplarının PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel gruplarındaki β -hCG hormon seviyeleri Şekil 4.7’de verilmiştir.

Transwell'e aktarılan PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel gruplarında β -hCG hormon ölçümü analizinde, İki-OK apikal ve 3:1 İki OK kontrol gruplarına kıyasla 30 μ M doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.7.). İki-OK apikal ve 3:1 İki OK gruplarının her ikisinde de 30 μ M doz uygulanan gruplarda kontrole kıyasla belirgin bir azalma meydana gelmiş olup İki-OK apikal ve 3:1 İki OK 30 μ M doz uygulanan iki deney grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Deney çalışmalarımız kapsamında transwell içerisine kriyojel eklenerek oluşturulan sistemin (İki-OK), kuyucuk içerisinde kriyojel bulunan (3:1 İki-OK) grubuna kıyasla benzer sonuçlar elde edilmesi oluşturmuş olduğumuz sistemin kontrolünü sağlamıştır.



Şekil 4.7. PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası β -hCG hormon ölçümü. a, İki-OK Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, 3:1 İki-OK Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

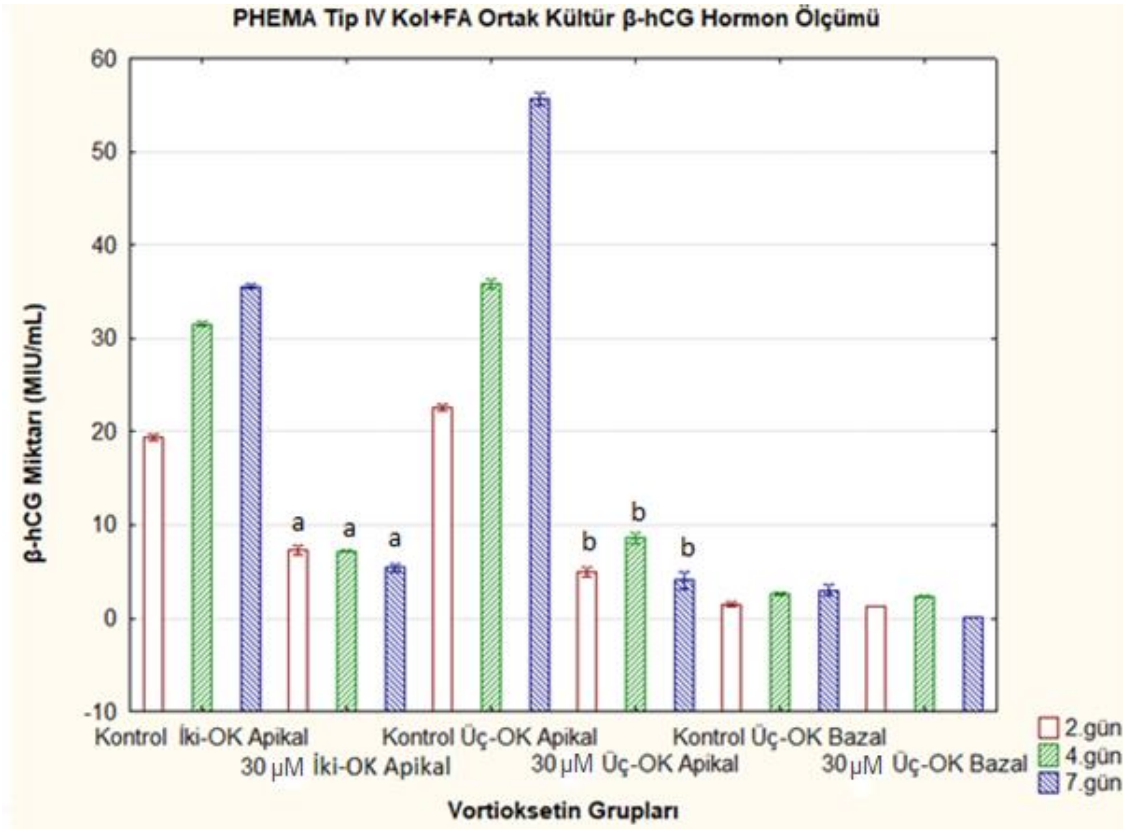
30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortiksetin uygulanmış

Kontrol 3:1 İki OK: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK : Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, 30 µM Vortiksetin uygulanmış

Vortiksetin dozları uygulanan İki OK ve Üç OK hücre gruplarının PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel gruplarındaki β-hCG hormon seviyeleri Şekil 4.8’de verilmiştir.

Transwell’e aktarılan PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel gruplarında β-HCG hormon ölçümü analizinde, İki-OK ve Üç-OK kontrol gruplarına kıyasla 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Transwell içerisinde PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel ikili ve üçlü ortak kültür gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortiksetin uygulaması sonrası β-HCG hormon ölçümü. a, İki-OK Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, Üç-OK Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortiksetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortiksetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, doz uygulanmamış

30 µM Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, 30 µM Vortiksetin uygulanmış

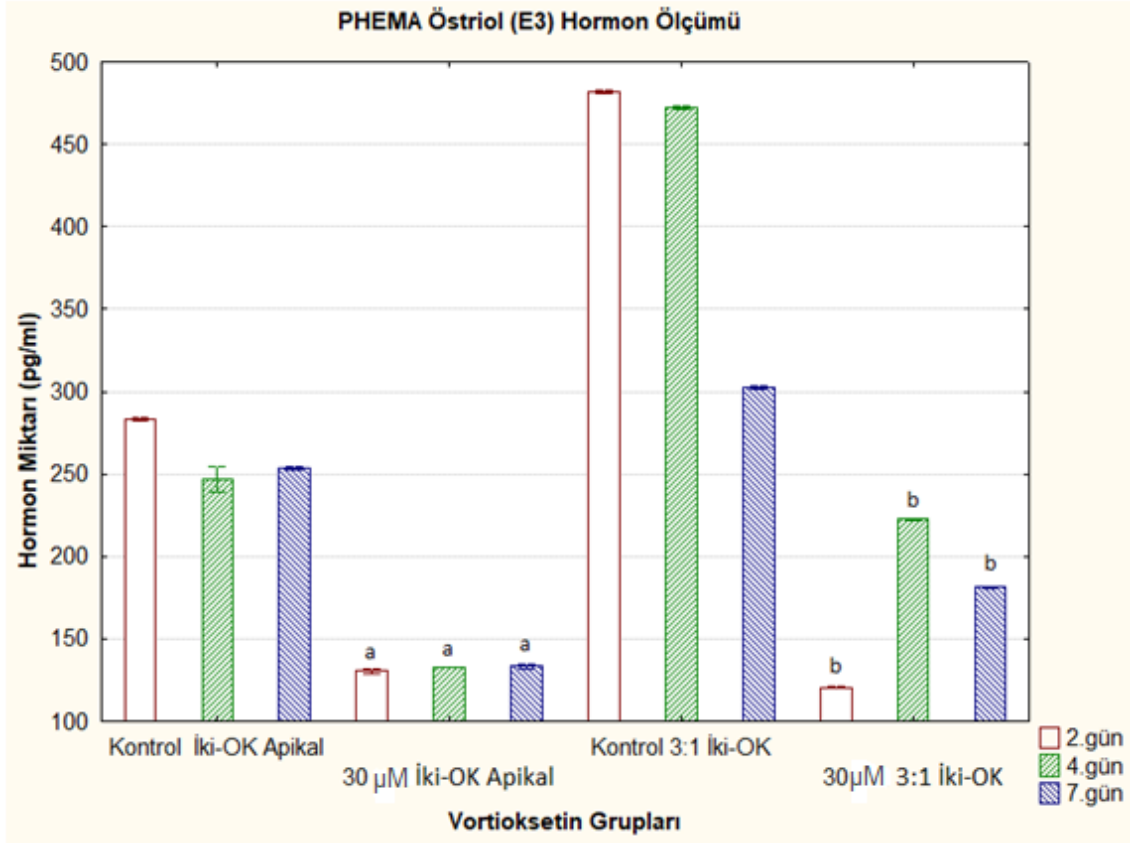
4.3. Östriol (E3) Hormonu Elisa Analizi Sonuçları

Östriol hormonu trofoblast hücrelerden salgılanmaktadır. Tez kapsamında kullanılan BeWo hücresinin İki OK, Üç OK ve 3:1 (BeWo-HUVEC) hücre oranı ile ortak kültüründeki östriol hormonu üretimi PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojellerde incelenmiştir.

4.3.1. PHEMA Kriyojel Sisteminde Östriol (E3) Hormonu Elisa Analizi Sonucu

Transwell'e aktarılan PHEMA kriyojel grubunda Östriol hormon ölçümü analizinde (Şekil 4.9.), İki-OK apikal ve 3:1 İki OK kontrol gruplarına kıyasla 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür. İki-OK apikal ve 3:1 İki OK gruplarının her ikisinde de 30 µM doz uygulanan gruplarda kontrole kıyasla belirgin bir azalma meydana gelmiş olup İki-OK apikal ve 3:1 İki OK 30 µM doz uygulanan iki deney grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Deney çalışmalarımız kapsamında transwell içerisine kriyojel eklenerek oluşturulan sistemin (İki-OK), kuyucuk içerisinde kriyojel bulunan (3:1 İki-OK) grubuna kıyasla benzer sonuçlar elde edilmesi oluşturmuş olduğumuz sistemin kontrolünü sağlamıştır.



Şekil 4.9. PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası Östriol hormon ölçümü. a, İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, 3:1 İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

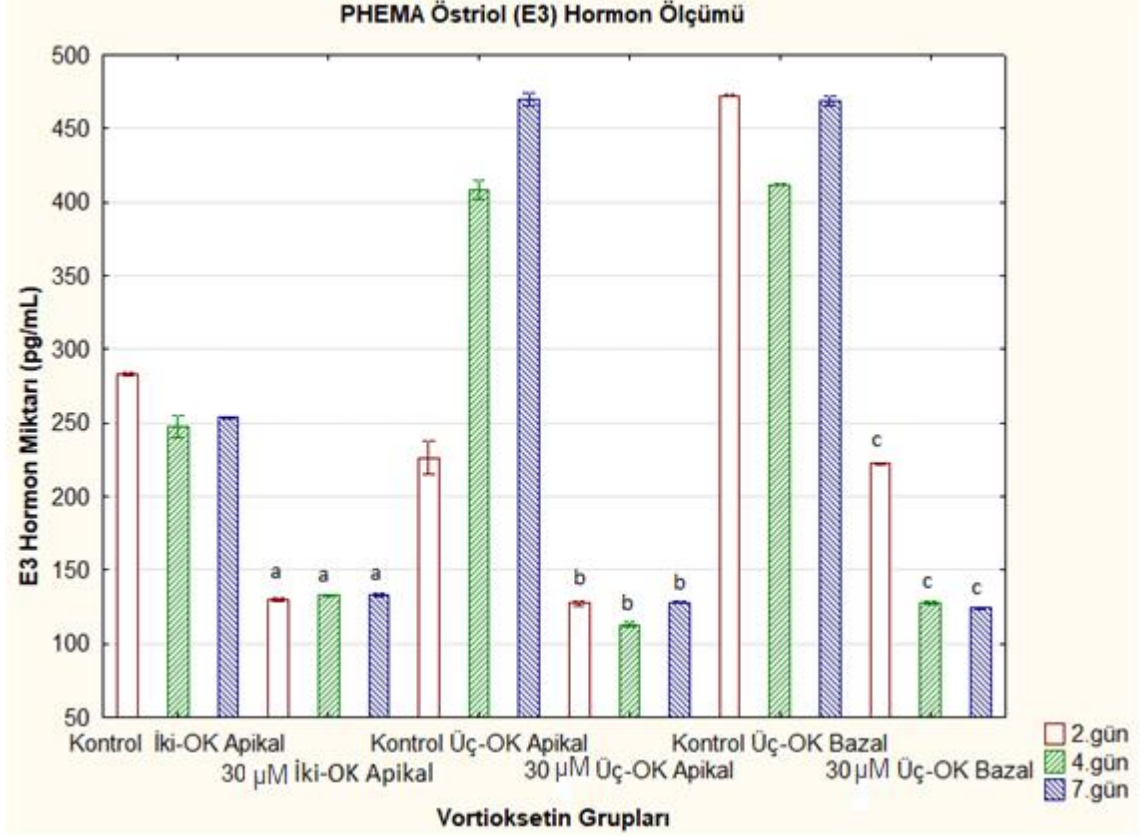
Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol 3:1 İki OK: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK : Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Vortioxetin dozları uygulanan İki OK ve Üç OK hücre gruplarının PHEMA kriyojel gruplarındaki Östriol (E3) hormon seviyeleri Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. Transwell içerisinde PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası β -hCG hormon ölçümü. a, İki-OK apikal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, Üç-OK apikal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). c, Üç-OK bazal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 μ M İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 μ M Vortioxetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 μ M İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 μ M Vortioxetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, doz uygulanmamış

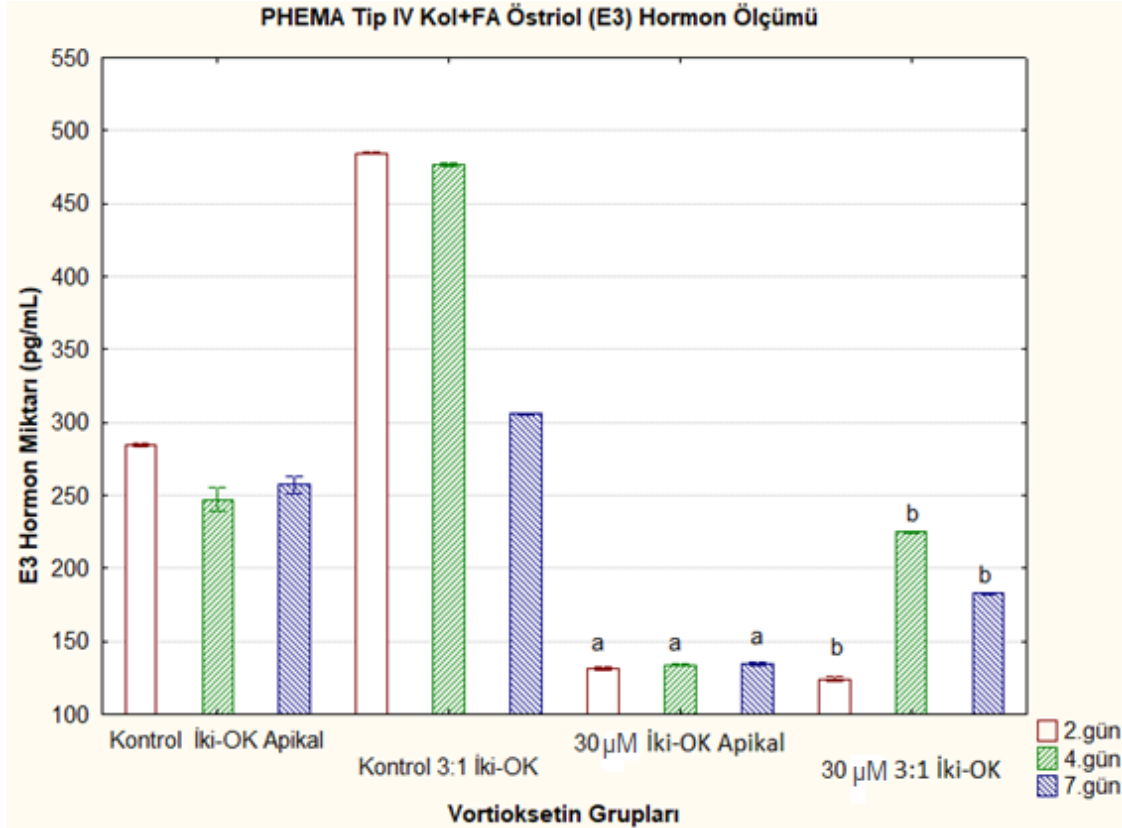
30 μ M Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, 30 μ M Vortioxetin uygulanmış

4.3.2. PHEMA Tip IV Kol+FA Kriyojel Sisteminde Östriol (E3) Elisa Analizi Sonucu

Transwell'e aktarılan PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel grubunda Östriol hormon ölçümü analizinde (Şekil 4.11.), İki-OK apikal ve 3:1 İki OK kontrol gruplarına kıyasla 30 μ M

doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür.

Deney çalışmalarımız kapsamında transwell içerisine kriyojel eklenerek oluşturulan sistemin (İki-OK), kuyucuk içerisinde kriyojel bulunan (3:1 İki-OK) grubuna kıyasla benzer sonuçlar elde edilmesi oluşturmuş olduğumuz sistemin kontrolünü sağlamıştır.



Şekil 4.11. PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası östriol hormon ölçümü. a, İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, 3:1 İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

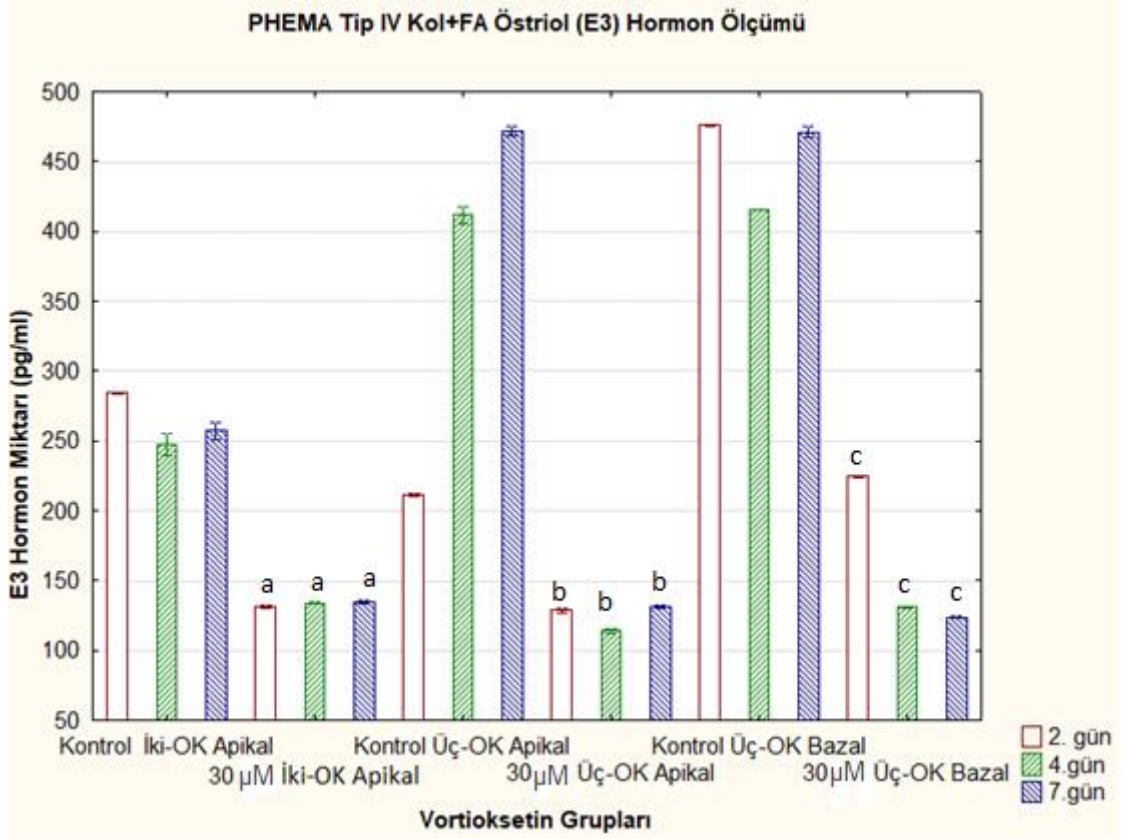
30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol 3:1 İki OK: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK : Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Vortioxetin dozları uygulanan İki OK ve Üç OK hücre gruplarının PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel gruplarındaki Östriol hormon seviyeleri Şekil 4.12'de verilmiştir.

Transwell'e aktarılan PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel gruplarında Östriol hormon ölçümü analizinde (Şekil 4.12.), Üç-OK apikal kısmında kontrol gruplarına kıyasla 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür.



Şekil 4.12. Transwell içerisinde PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel ikili ve üçlü ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası Östriol hormon ölçümü. a, İki-OK apikal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, Üç-OK apikal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). c, Üç-OK bazal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, doz uygulanmamış

30 µM Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

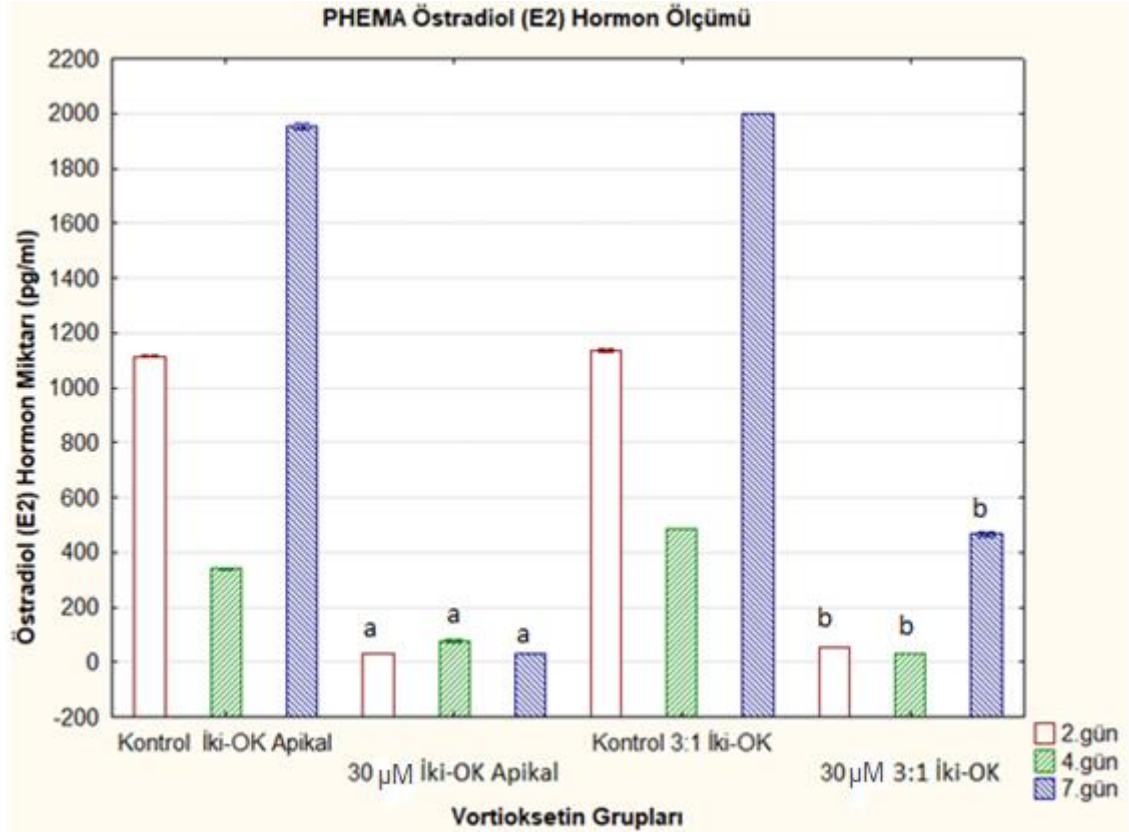
4.4. Östradiol (E2) Hormonu Elisa Analizi Sonuçları

Östradiol hormonu trofoblast hücrelerden salgılanmaktadır. Tez kapsamında kullanılan BeWo (trofoblast) hücrelerinin İki OK, Üç OK ve 3:1 (BeWo-HUVEC) hücre oranı ile ortak kültüründeki östradiol hormonu üretimi PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojellerde incelenmiştir.

4.4.1. PHEMA Kriyojel Sisteminde Östradiol (E2) Hormonu Elisa Analizi Sonucu

Transwell'e aktarılan PHEMA kriyojel grubunda Östradiol hormon ölçümü analizinde (Şekil 4.13.), İki-OK apikal ve 3:1 İki OK kontrol gruplarına kıyasla 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür. İki-OK apikal ve 3:1 İki OK gruplarının her ikisinde de 30 µM doz uygulanan gruplarda kontrole kıyasla belirgin bir azalma meydana gelmiş olup İki-OK apikal ve 3:1 İki OK 30 µM doz uygulanan iki deney grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Deney çalışmalarımız kapsamında transwell içerisine kriyojel eklenerek oluşturulan sistemin (İki-OK), kuyucuk içerisinde kriyojel bulunan (3:1 İki-OK) grubuna kıyasla benzer sonuçlar elde edilmesi oluşturmuş olduğumuz sistemin kontrolünü sağlamıştır.



Şekil 4.13. PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası Östradiol hormon ölçümü. a, İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, 3:1 İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

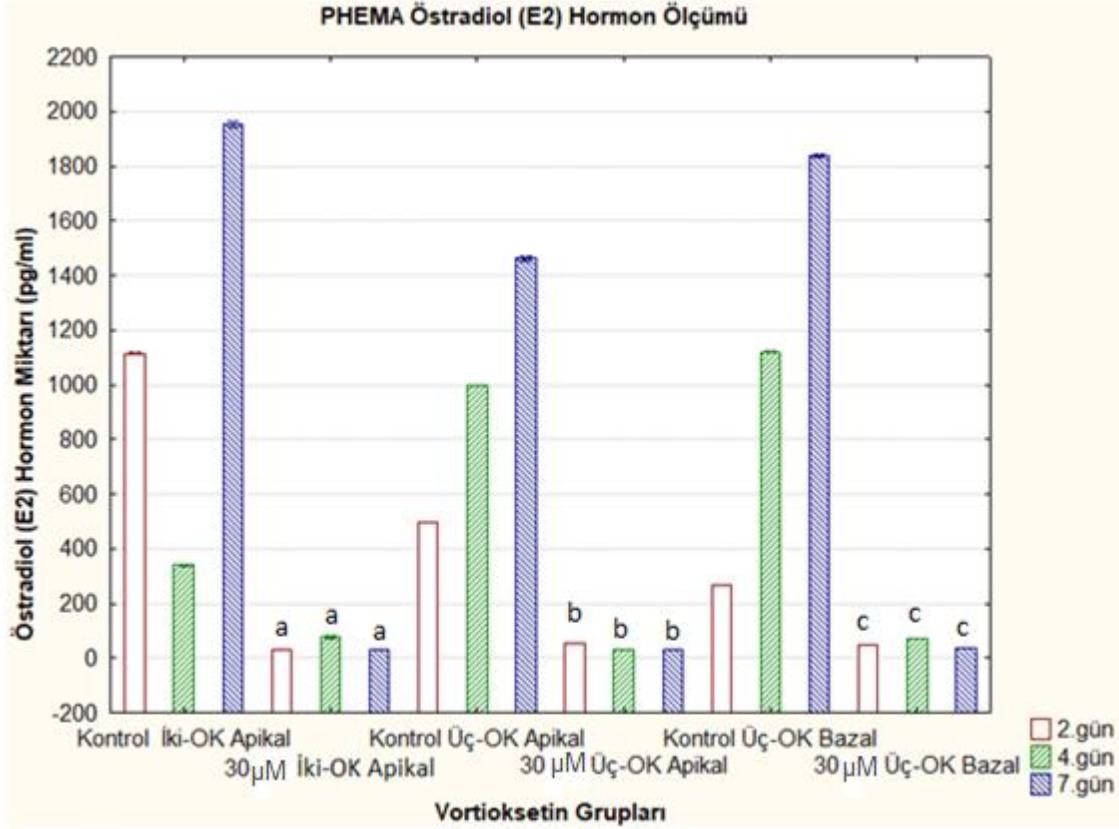
30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol 3:1 İki OK: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK : Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Vortioxetin dozları uygulanan İki OK, Üç OK ve BeWo-HUVEC (3:1) hücre gruplarının PHEMA kriyojel gruplarındaki Östradiol hormon seviyeleri Şekil 4.14'de verilmiştir.

Transwell'e aktarılan PHEMA kriyojel gruplarında östradiol hormon ölçümü analizinde (Şekil 4.14.), İki-OK apikal ve Üç-OK apikal-bazal kontrol gruplarına kıyasla 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür.



Şekil 4.14. Transwell içerisinde PHEMA İkili ve Üçlü ortak kültür gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortiokestin uygulaması sonrası Östriol hormon ölçümü. a, İki-OK Apikal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, Üç-OK apikal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). c, Üç-OK bazal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortiokestin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortiokestin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, doz uygulanmamış

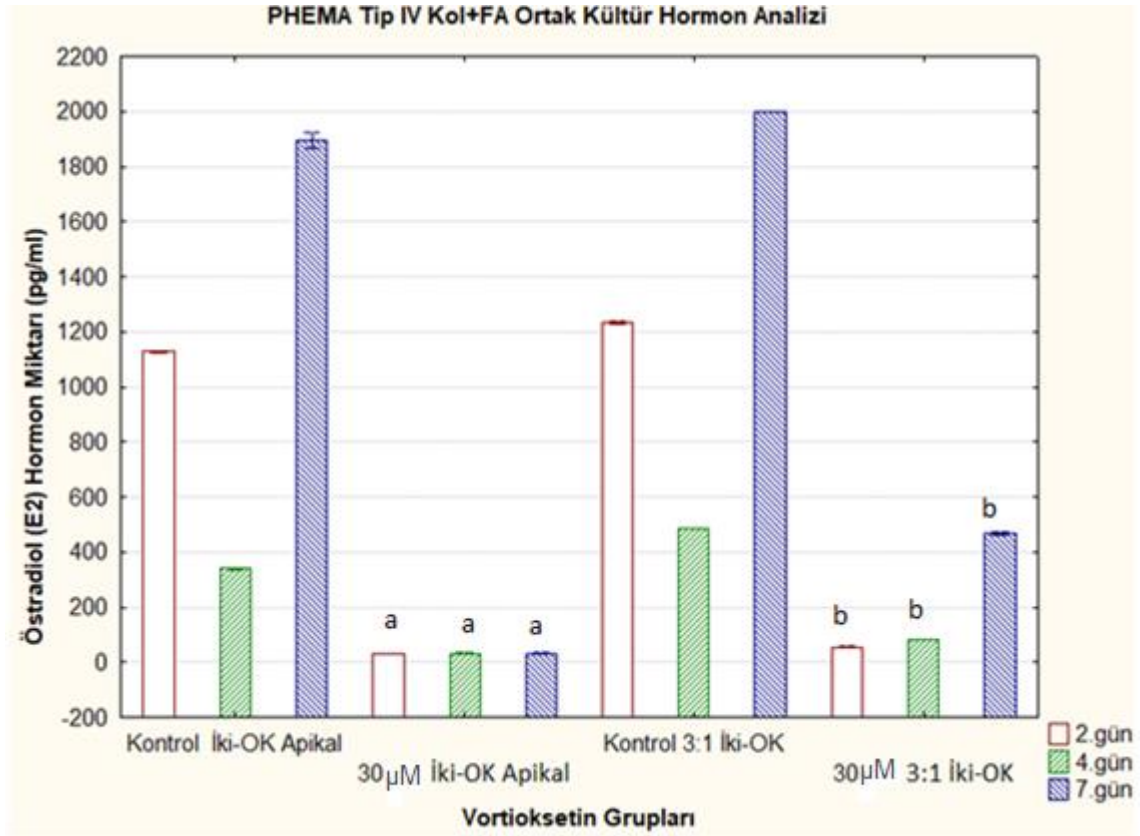
30 µM Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, 30 µM Vortiokestin uygulanmış

4.4.2. PHEMA Tip IV Kol+FA Kriyojel Sisteminde Östradiol (E2) Hormonu Elisa Analizi Sonucu

Transwell'e aktarılan PHEMA kriyojel grubunda Östradiol hormon ölçümü analizinde (Şekil 4.15.), İki-OK apikal ve 3:1 İki OK kontrol gruplarına kıyasla 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği

görülmüştür. İki-OK apikal ve 3:1 İki OK gruplarının her ikisinde de 30 µM doz uygulanan gruplarda kontrole kıyasla belirgin bir azalma meydana gelmiş olup İki-OK apikal ve 3:1 İki OK 30 µM doz uygulanan iki deney grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Deney çalışmalarımız kapsamında transwell içerisine kriyojel eklenerek oluşturulan sistemin (İki-OK), kuyucuk içerisinde kriyojel bulunan (3:1 İki-OK) grubuna kıyasla benzer sonuçlar elde edilmesi oluşturmuş olduğumuz sistemin kontrolünü sağlamıştır.



Şekil 4.15. PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası Östradiol hormon ölçümü. a, İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, 3:1 İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

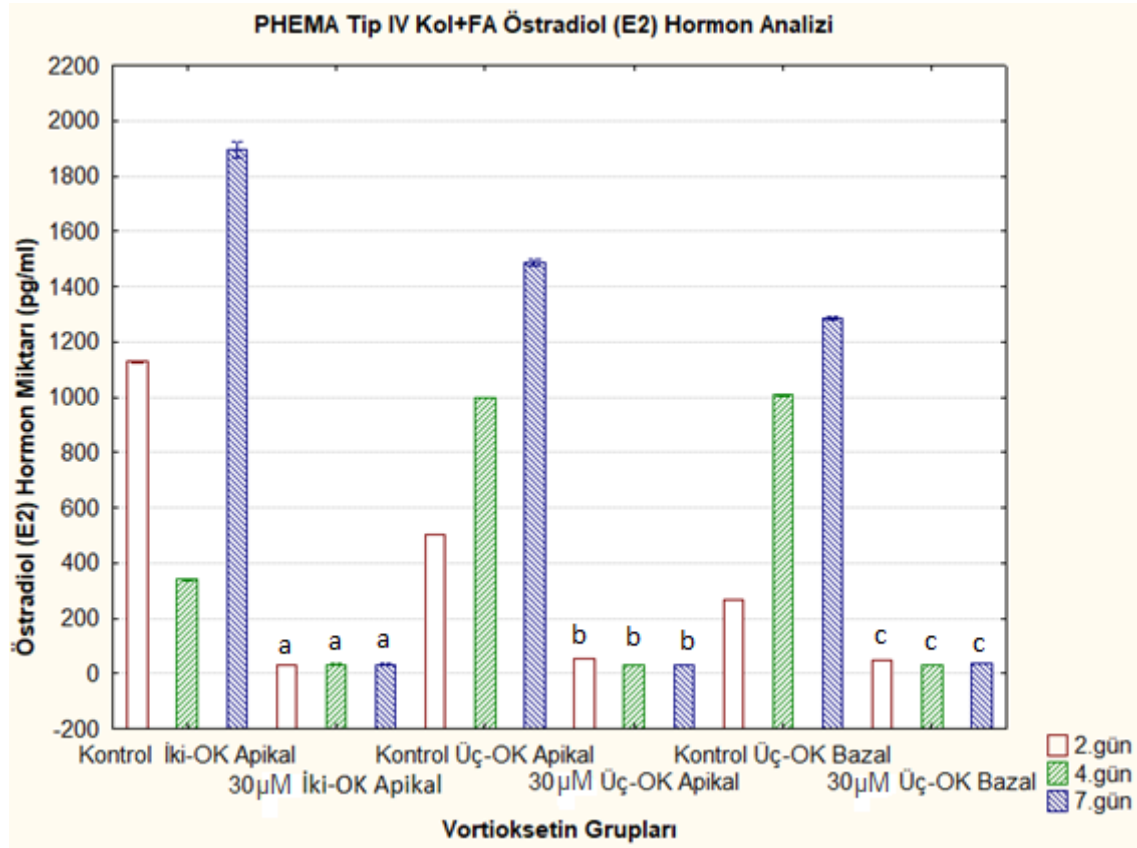
30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol 3:1 İki OK: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK : Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Vortiooksetin dozları uygulanan İki OK, Üç OK ve BeWo-HUVEC (3:1) hücre gruplarının PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel gruplarındaki Östradiol hormon seviyeleri Şekil 4.16’de verilmiştir.

Transwell’e aktarılan PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel gruplarında östradiol hormon ölçümü analizinde (Şekil 4.16.), İki-OK apikal ve Üç-OK apikal-bazal kontrol gruplarına kıyasla 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür.



Şekil 4.16. Transwell içerisinde PHEMA Tip IV Kol+FA İkili ve Üçlü ortak kültür gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortiooksetin uygulaması sonrası Östradiol hormon ölçümü. a, İki-OK Apikal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, Üç-OK apikal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). c, Üç-OK bazal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortiooksetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortiooksetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, doz uygulanmamış

30 µM Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, 30 µM Vortiooksetin uygulanmış

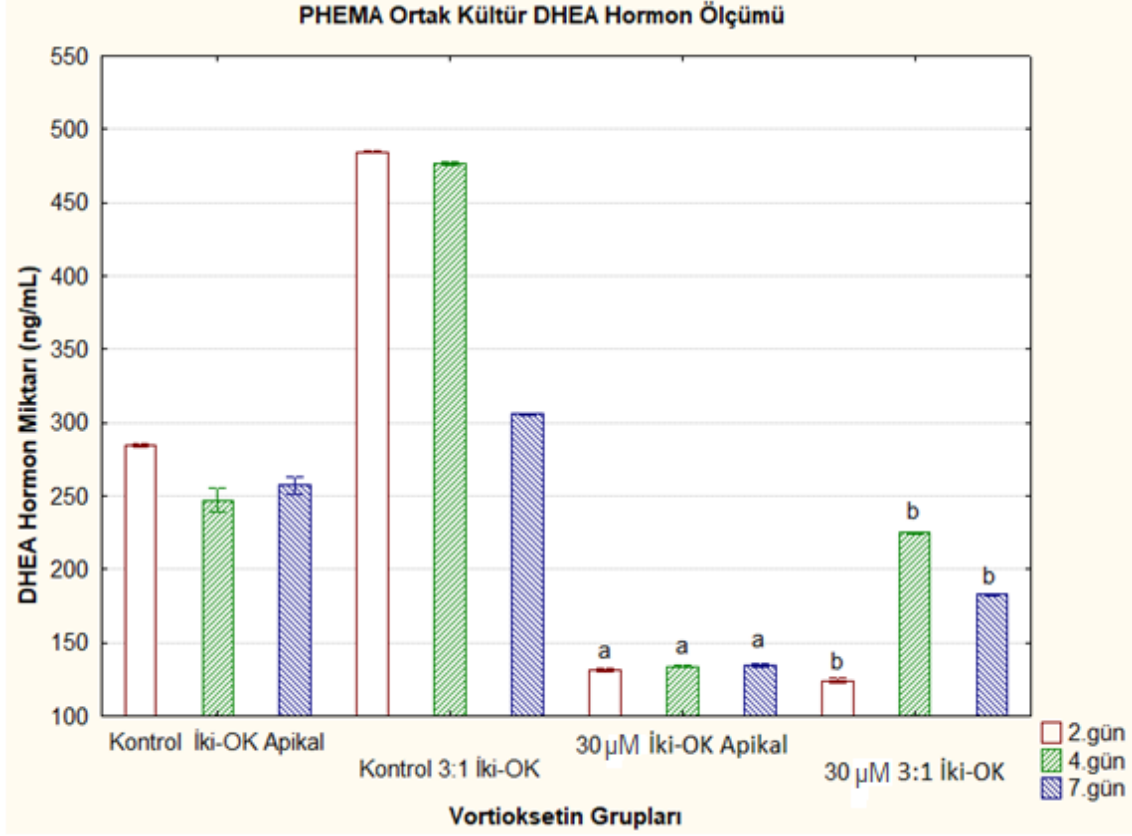
4.5. DHEA Hormonu Elisa Analizi Sonucu

Vortiooksetin uygulanan İki OK ve Üç OK ile ortak kültüründeki DHEA hormonu üretimi miktarı PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojellerde incelenmiştir.

4.5.1. PHEMA Kriyojel Sisteminde DHEA Hormonu Elisa Analizi Sonucu

Transwell'e aktarılan PHEMA kriyojel grubunda DHEA hormon ölçümü analizinde (Şekil 4.17.), İki-OK apikal ve 3:1 İki OK kontrol gruplarına kıyasla 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür.

Deney çalışmalarımız kapsamında transwell içerisine kriyojel eklenerek oluşturulan sistemin (İki-OK), kuyucuk içerisinde kriyojel bulunan (3:1 İki-OK) grubuna kıyasla benzer sonuçlar elde edilmesi oluşturmuş olduğumuz sistemin kontrolünü sağlamıştır.



Şekil 4.17. PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası DHEA hormon ölçümü. a, İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, 3:1 İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

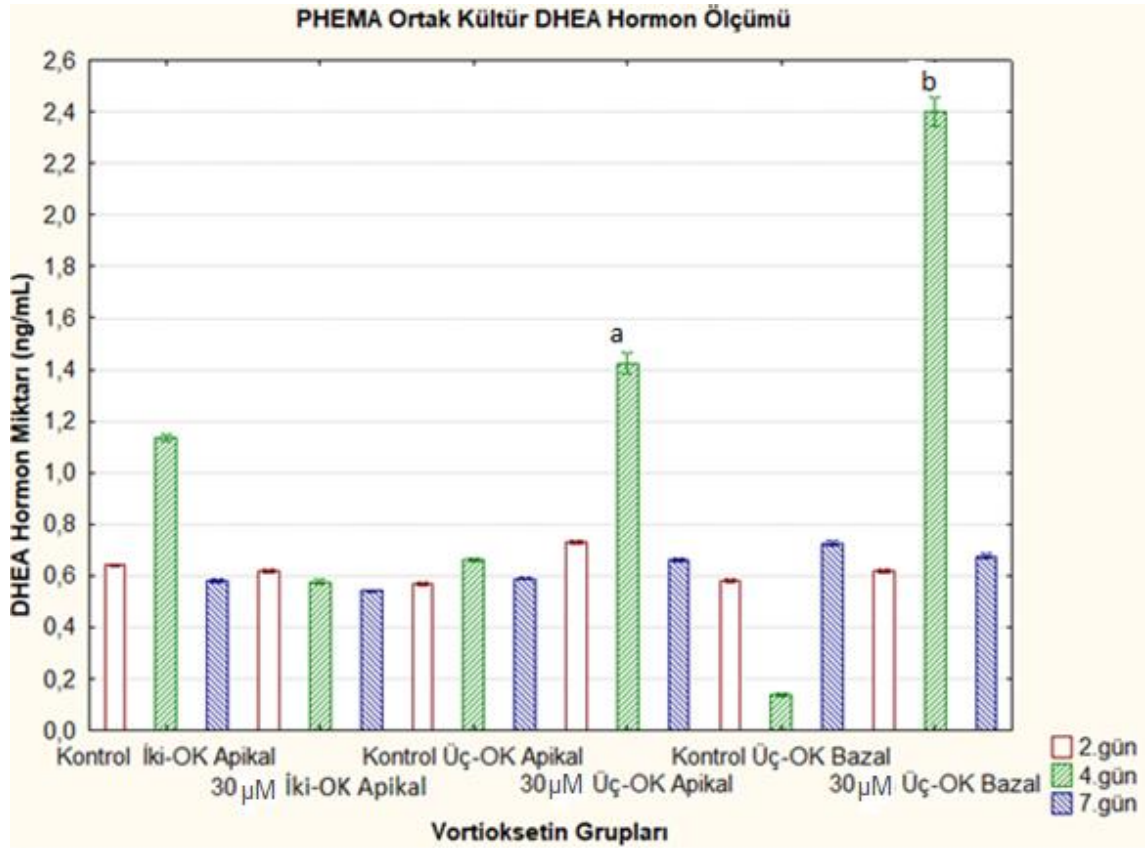
30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol 3:1 İki OK: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK : Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Vortioxetin dozları uygulanan Üç OK Apikal ve Üç OK Bazal hücre gruplarının PHEMA kriyojel gruplarındaki DHEA hormon seviyeleri Şekil 4.18’de verilmiştir.

Transwell’e aktarılan PHEMA kriyojel gruplarında DHEA hormon ölçümü analizinde (Şekil 4.18.), İki-OK apikal kontrol ve 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Üç-OK apikal ve bazal gruplarında kontrol grubuna kıyasla 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir artış meydana geldiği görülmüştür.



Şekil 4.18. Transwell içerisinde PHEMA İkili ve Üçlü ortak kültür gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası DHEA hormon ölçümü. a, Üç-OK apikal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, Üç-OK bazal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, doz uygulanmamış

30 µM Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

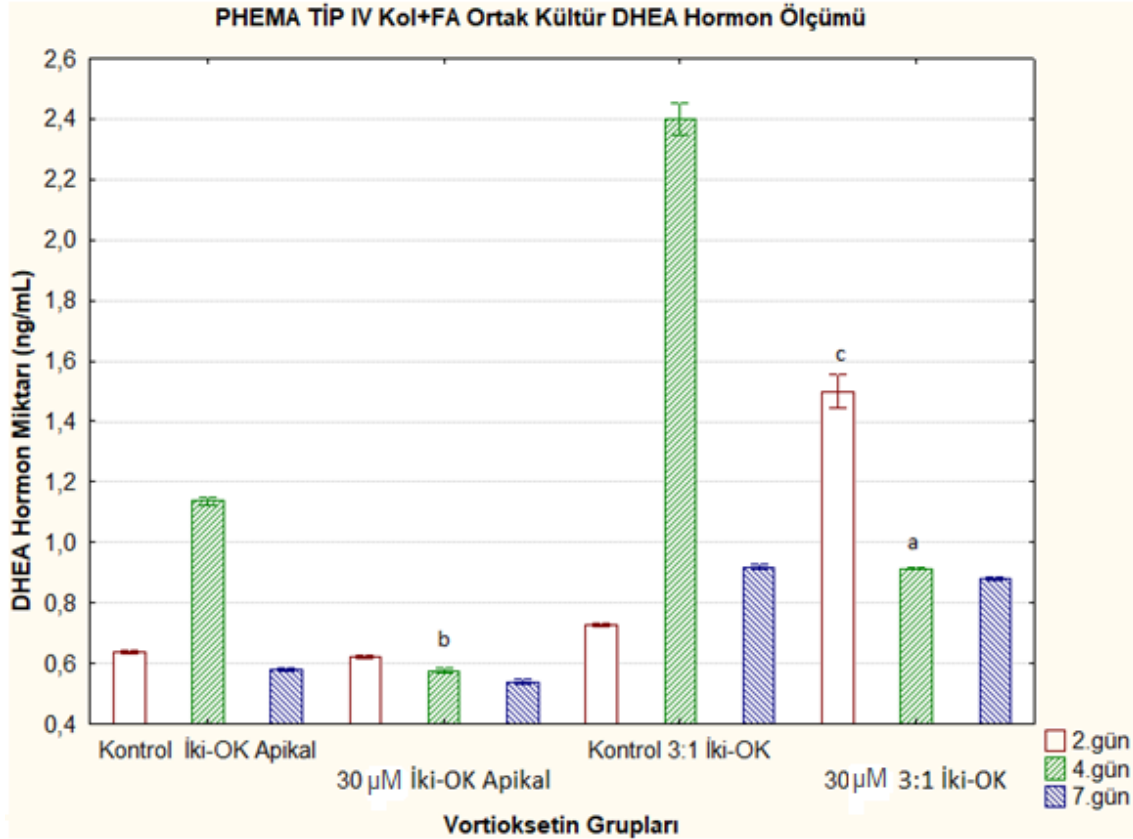
4.5.2. PHEMA Tip IV Kol+FA Kriyojel Sisteminde DHEA Hormonu Elisa Analizi

Sonucu

Transwell'e aktarılan PHEMA kriyojel grubunda DHEA hormon ölçümü analizinde (Şekil 4.19.), İki-OK apikal 4. gün kontrol grubuna kıyasla 30 µM doz uygulanan grupta hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür. 3:1 İki-OK 4. gün

kontrol grubuna kıyasla 30 µM doz uygulanan grupta hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür. 3:1 İki-OK 2. gün kontrol grubuna kıyasla 30 µM doz uygulanan grupta hormon miktarında belirgin bir artış meydana geldiği görülmüştür.

Deney çalışmalarımız kapsamında transwell içerisine kriyojel eklenerek oluşturulan sistemin (İki-OK), kuyucuk içerisinde kriyojel bulunan (3:1 İki-OK) grubuna kıyasla benzer sonuçlar elde edilmesi oluşturmuş olduğumuz sistemin kontrolünü sağlamıştır.



Şekil 4.19. PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası DHEA hormon ölçümü. a, İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, 3:1 İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). c, 3:1 İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

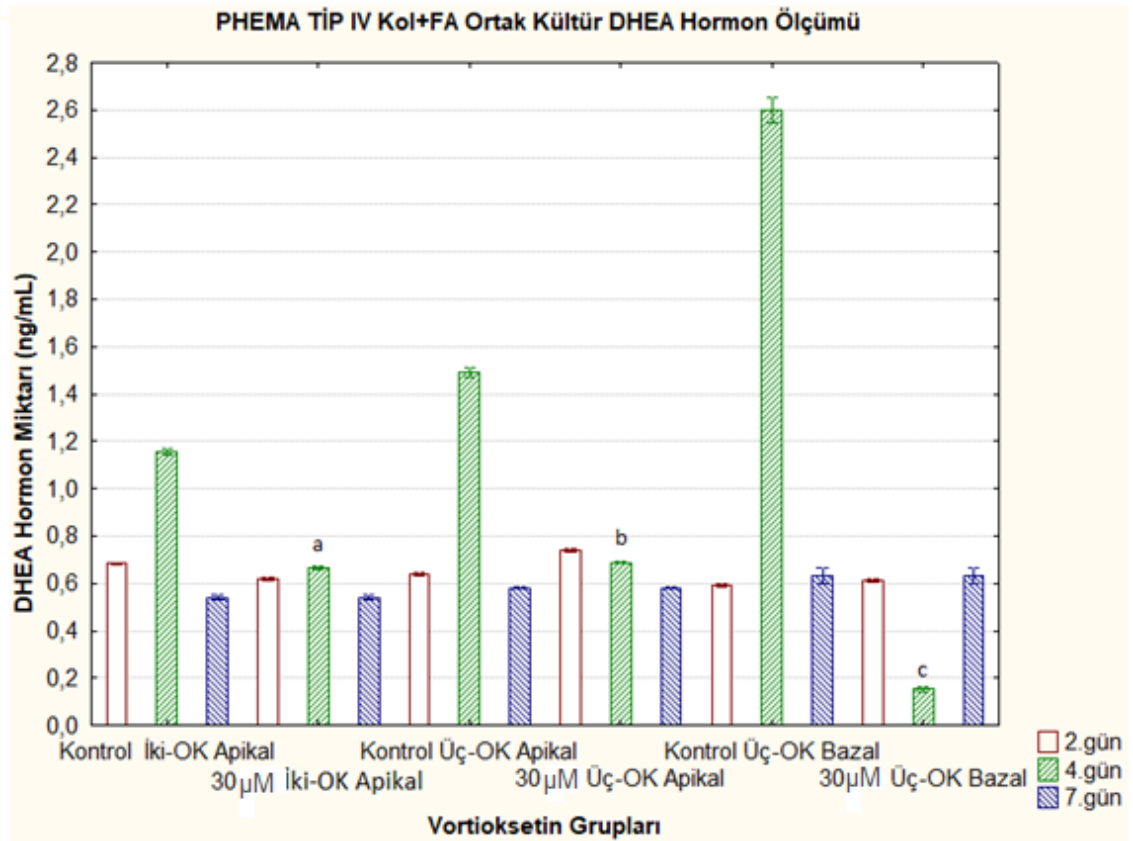
30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol 3:1 İki OK: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK : Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Vortiooksetin dozları uygulanan İki OK, Üç OK ve BeWo-HUVEC (3:1) hücre gruplarının PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel gruplarındaki DHEA hormon seviyeleri Şekil 4.19'da verilmiştir.

Transwell'e aktarılan PHEMA kriyojel grubunda DHEA hormon ölçümü analizinde (Şekil 4.20.), İki-OK apikal, Üç-OK apikal ve Üç-OK bazal kontrol gruplarına kıyasla 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür.



Şekil 4.20. Transwell içerisinde PHEMA İkili ve Üçlü ortak kültür gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortiooksetin uygulaması sonrası DHEA hormon ölçümü. a, İki-OK apikal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, Üç-OK apikal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). c, Üç-OK bazal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortiooksetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortiooksetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, doz uygulanmamış

30 µM Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, 30 µM Vortiooksetin uygulanmış

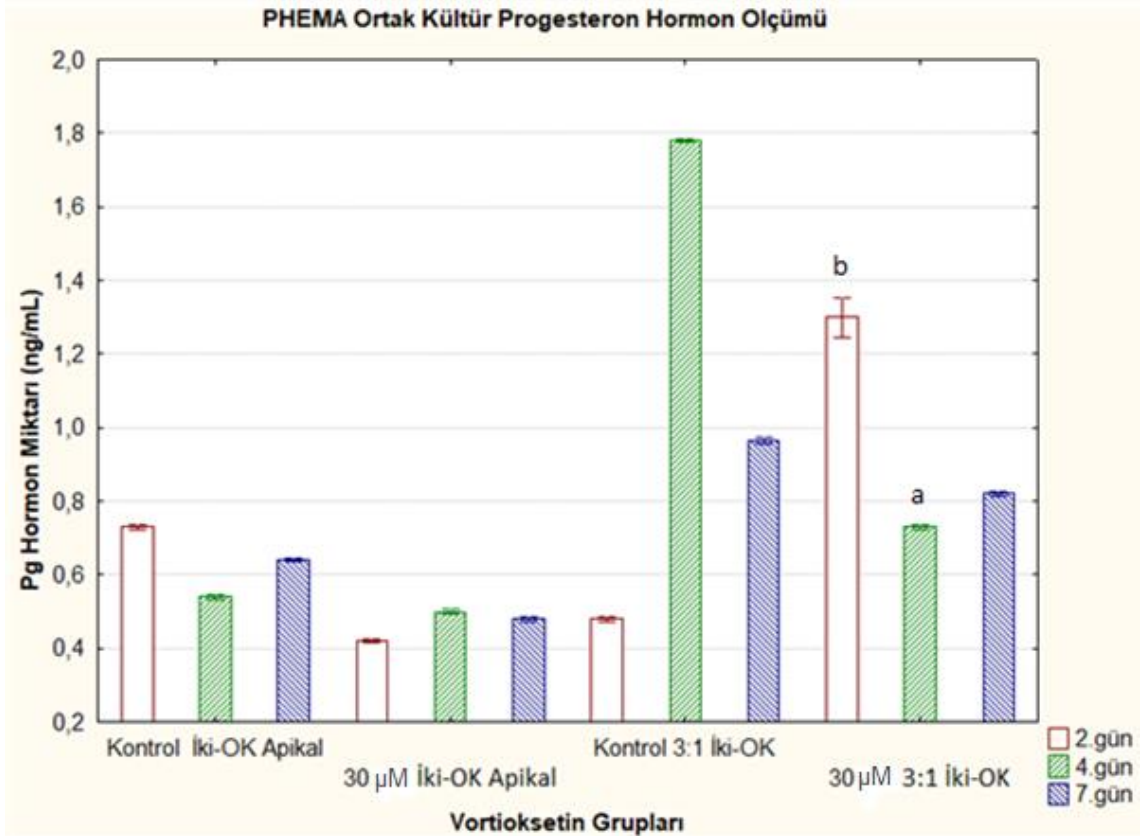
4.6. Progesteron (Pg) Hormonu Elisa Analizi Sonucu

Progesteron hormonu trofoblast hücrelerden salgılanmaktadır. Tez kapsamında kullanılan BeWo (trofoblast) hücrelerinin İki OK, Üç OK ve 3:1 (BeWo-HUVEC) hücre oranı ile ortak kültüründeki Progesteron hormonu üretimi PHEMA ve PHEMA+KOL Tip IV+FA kriyojellerde incelenmiştir.

4.6.1. PHEMA Kriyojel Sisteminde Progesteron Hormonu Elisa Analizi Sonucu

Transwell'e aktarılan PHEMA kriyojel grubunda Progesteron hormon ölçümü analizinde (Şekil 4.21.), İki-OK apikal ve 3:1 İki OK kontrol gruplarına kıyasla 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür. 3:1 İki OK grubu 4.gün 30 µM doz uygulanan gruplarda kontrole kıyasla belirgin bir azalma meydana gelmiştir. İki-OK apikal kontrol ve 30 µM doz uygulanan grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. 3:1 İki-OK kontrol grubu 2.gün grubunda İki-OK Apikal 30 µM grubuna kıyasla artış görülmüştür. İki-OK Apikal kontrol 30 µM doz uygulanan iki deney grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Deney çalışmalarımız kapsamında transwell içerisine kriyojel eklenerek oluşturulan sistemin (İki-OK), kuyucuk içerisinde kriyojel bulunan (3:1 İki-OK) grubuna kıyasla benzer sonuçlar elde edilmesi oluşturmuş olduğumuz sistemin kontrolünü sağlamıştır.



Şekil 4.21. PHEMA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası Progesteron hormon ölçümü. a, 3:1 ikili ortak kültür kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, 3:1 İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

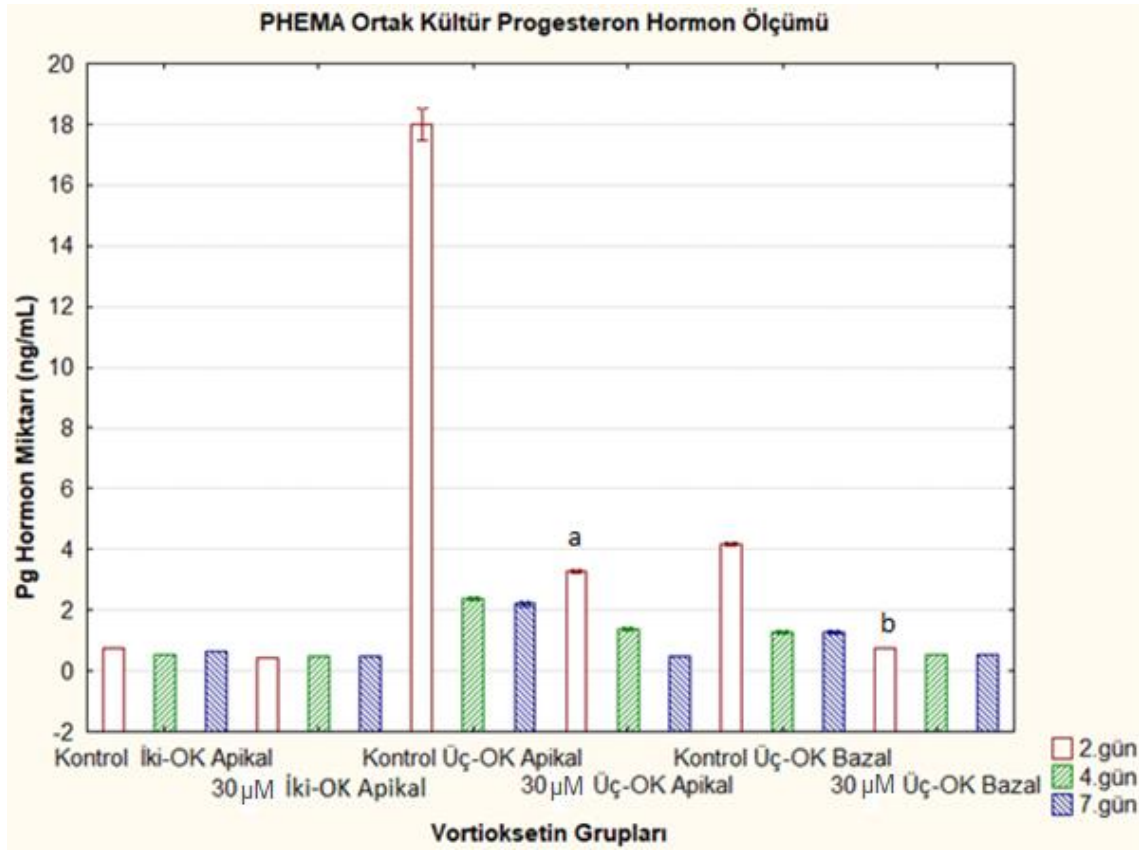
30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol 3:1 İki OK: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK : Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Vortioxetin dozları uygulanan İki OK, Üç OK ve BeWo-HUVEC (3:1) hücre gruplarının PHEMA kriyojel gruplarındaki Progesteron hormon seviyeleri Şekil 4.22’de verilmiştir.

Transwell’e aktarılan PHEMA kriyojel grubunda Progesteron hormon ölçümü analizinde (Şekil 4.22.), İki-OK apikal kontrol ve 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir farklılık görülmemiştir. Üç-OK apikal ve Üç-OK bazal 2. gün kontrol gruplarına kıyasla 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür.



Şekil 4.22. Transwell içerisinde PHEMA İkili ve Üçlü ortak kültür gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası Progesteron hormon ölçümü. a, Üç-OK apikal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). c, Üç-OK bazal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, doz uygulanmamış

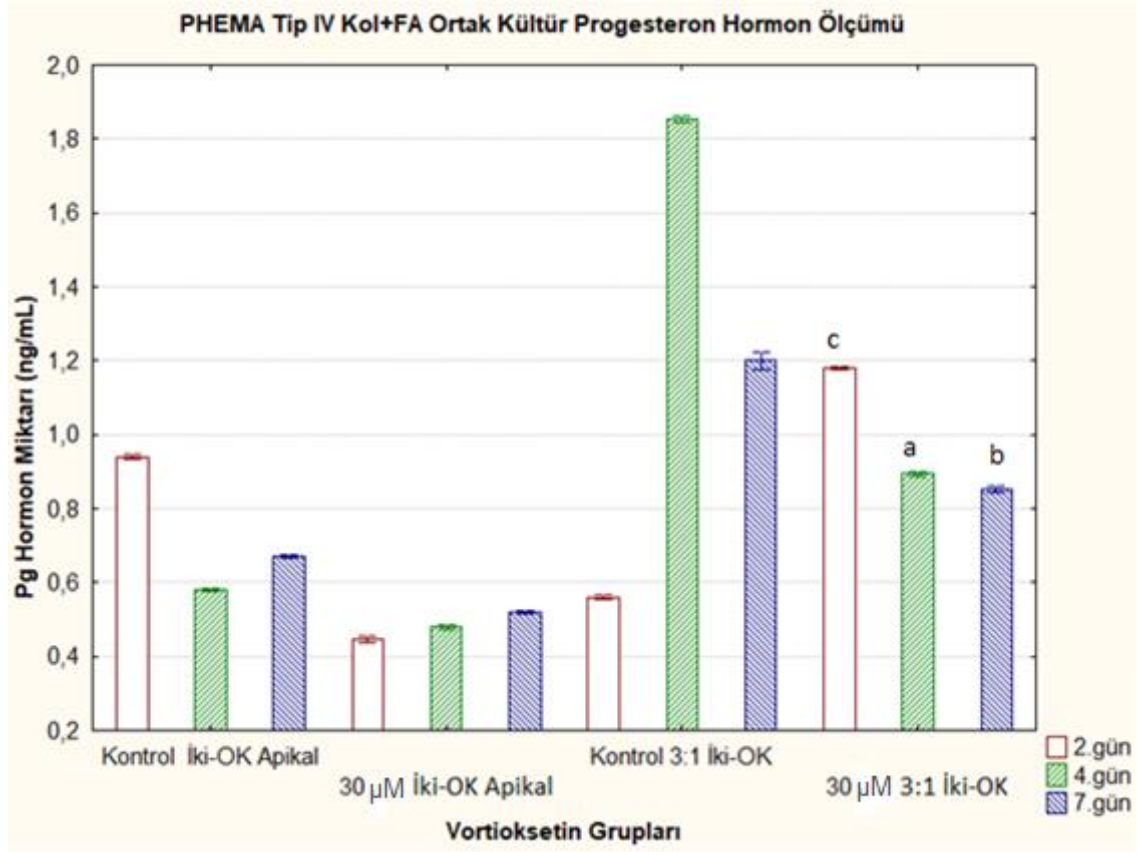
30 µM Üç-OK Bazal: Kriyojel bulunan sistemde kuyucukta H295R bulunan bazal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

4.6.2. PHEMA Tip IV Kol+FA Kriyojel Sisteminde Progesteron Hormonu Elisa Analizi Sonucu

Transwell'e aktarılan PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel grubunda Progesteron hormon ölçümü analizinde (Şekil 4.23.), 3:1 İki OK kontrol 4. gün ve 7. gün gruplarına kıyasla 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği

görülmüştür. 3:1 İki OK grubu 2.gün 30 µM doz uygulanan gruplarda kontrole kıyasla belirgin bir artış meydana gelmiştir.

Deney çalışmalarımız kapsamında transwell içerisine kriyojel eklenerek oluşturulan sistemin (İki-OK), kuyucuk içerisinde kriyojel bulunan (3:1 İki-OK) grubuna kıyasla benzer sonuçlar elde edilmesi oluşturmuş olduğumuz sistemin kontrolünü sağlamıştır.



Şekil 4.23. PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel ikili ve 3:1 ikili ortak kültür (3BeWo:1HUVEC) gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortioxetin uygulaması sonrası Progesteron hormon ölçümü. a, 3:1 ikili ortak kültür grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b, 3:1 İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). C, 3:1 İki-OK kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

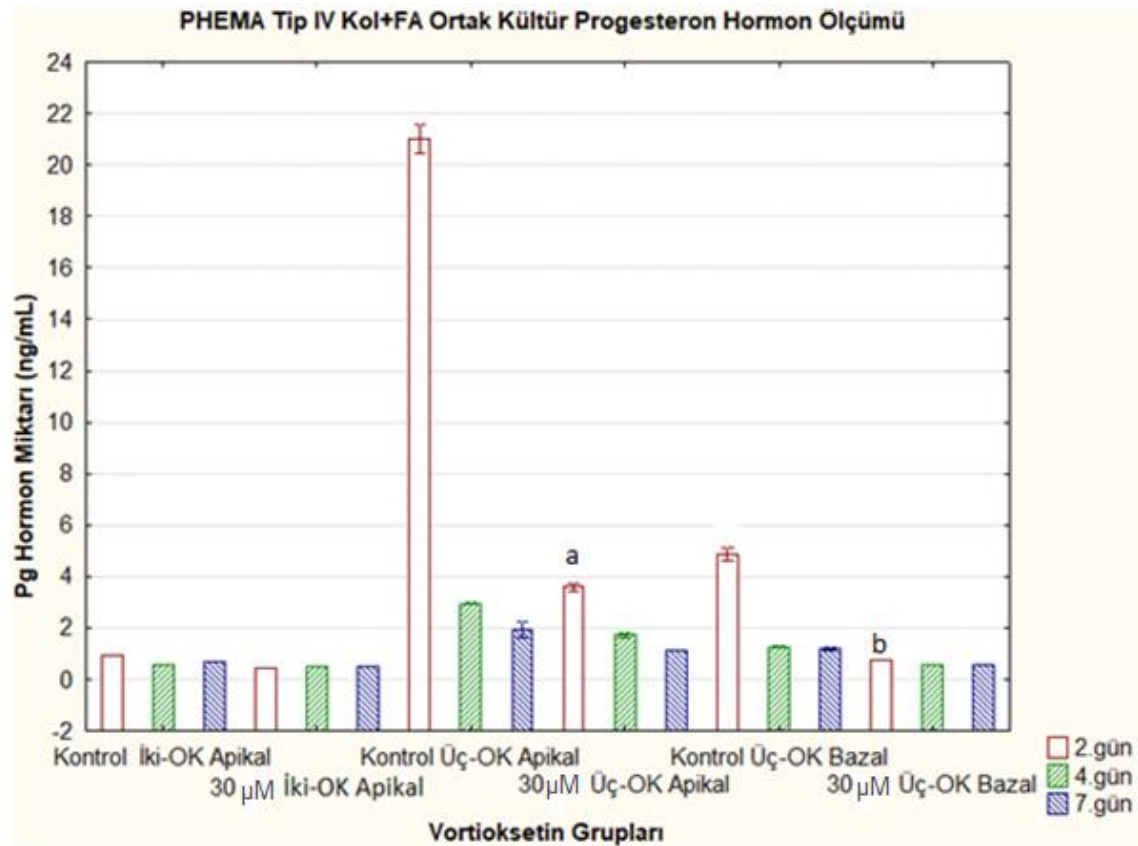
30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Kontrol 3:1 İki OK: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, 30 µM Vortioxetin uygulanmış

Vortiooksetin dozları uygulanan İki OK, Üç OK ve BeWo-HUVEC (3:1) hücre gruplarının PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel gruplarındaki Progesteron hormon seviyeleri Şekil 4.24’de verilmiştir.

Transwell’e aktarılan PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel grubunda Progesteron hormon ölçümü analizinde (Şekil 4.24.), İki-OK apikal kontrol ve 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir farklılık görülmemiştir. Üç-OK apikal ve Üç-OK bazal 2. gün kontrol gruplarına kıyasla 30 µM doz uygulanan gruplarda hormon miktarında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür.



Şekil 4.24. Transwell içerisinde PHEMA Tip IV Kol+FA İkili ve Üçlü ortak kültür gruplarında 2. 4. ve 7. gün Vortiooksetin uygulaması sonrası Progesteron hormon ölçümü. a, Üç-OK apikal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). c, Üç-OK bazal kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

Kontrol İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK Apikal: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan apikal kısım, 30 µM Vortiooksetin uygulanmış

Kontrol 3:1 İki OK: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, doz uygulanmamış

30 µM İki-OK: Kriyojel bulunan sistemde kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri bulunan kısım, 30 µM Vortiooksetin uygulanmış

PHEMA ve PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel grupları arasında yapılan karşılaştırmaya göre İki-OK Apikal, 3:1 İki-OK, Üç-OK Apikal ve Üç-OK Bazal deney grupları arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

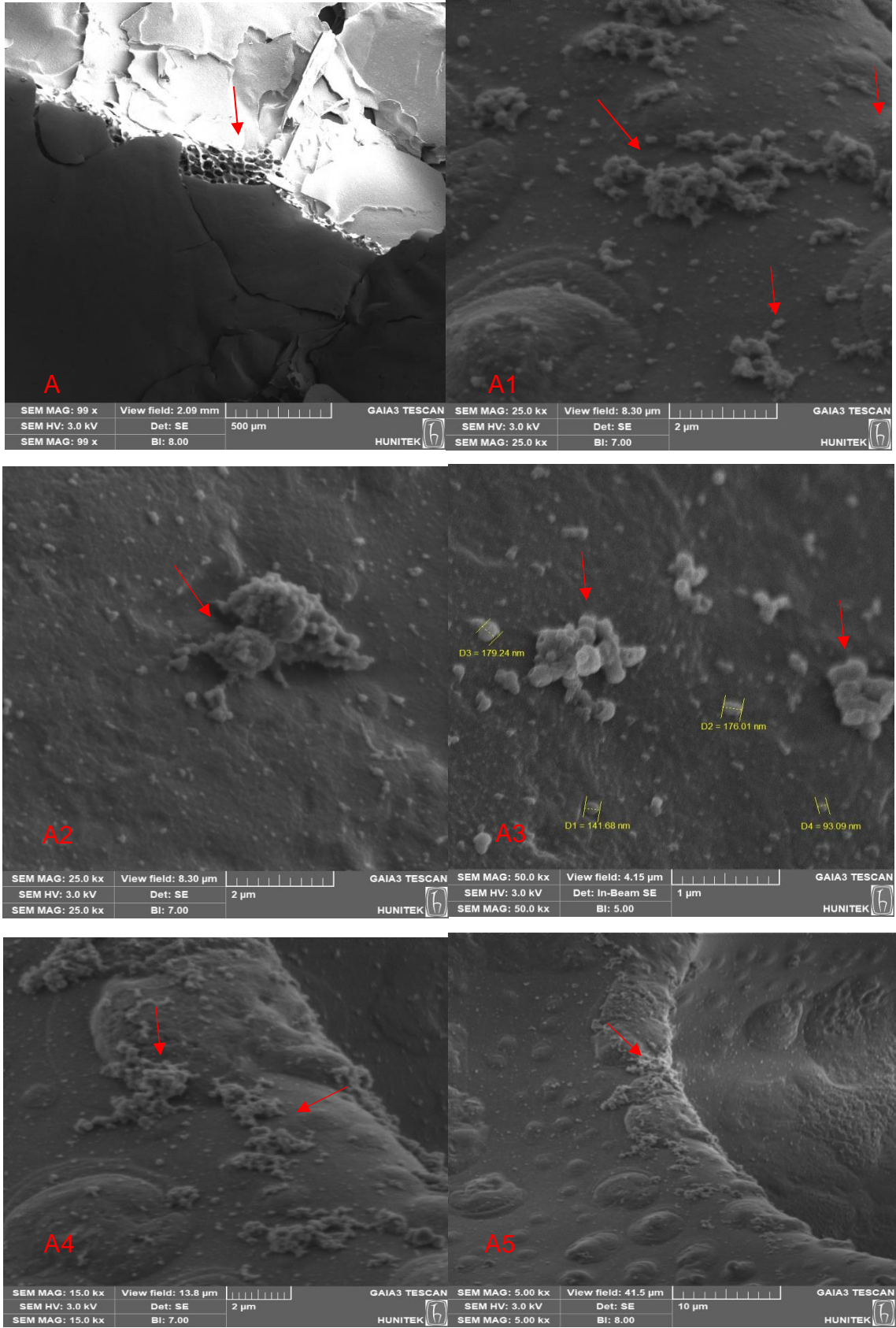
β -hCG hormon ölçümü için PHEMA Üç-OK Bazal kontrol grubunda, PHEMA Tip IV Kol+FA kontrol grubuna kıyasla artış gözlenmiştir.

Östradiol hormon ölçümü için PHEMA Tip IV Kol+FA Bazal kontrol Üç-OK grubunda, PHEMA Üç-OK Bazal kontrol grubuna kıyasla artış gözlenmiştir.

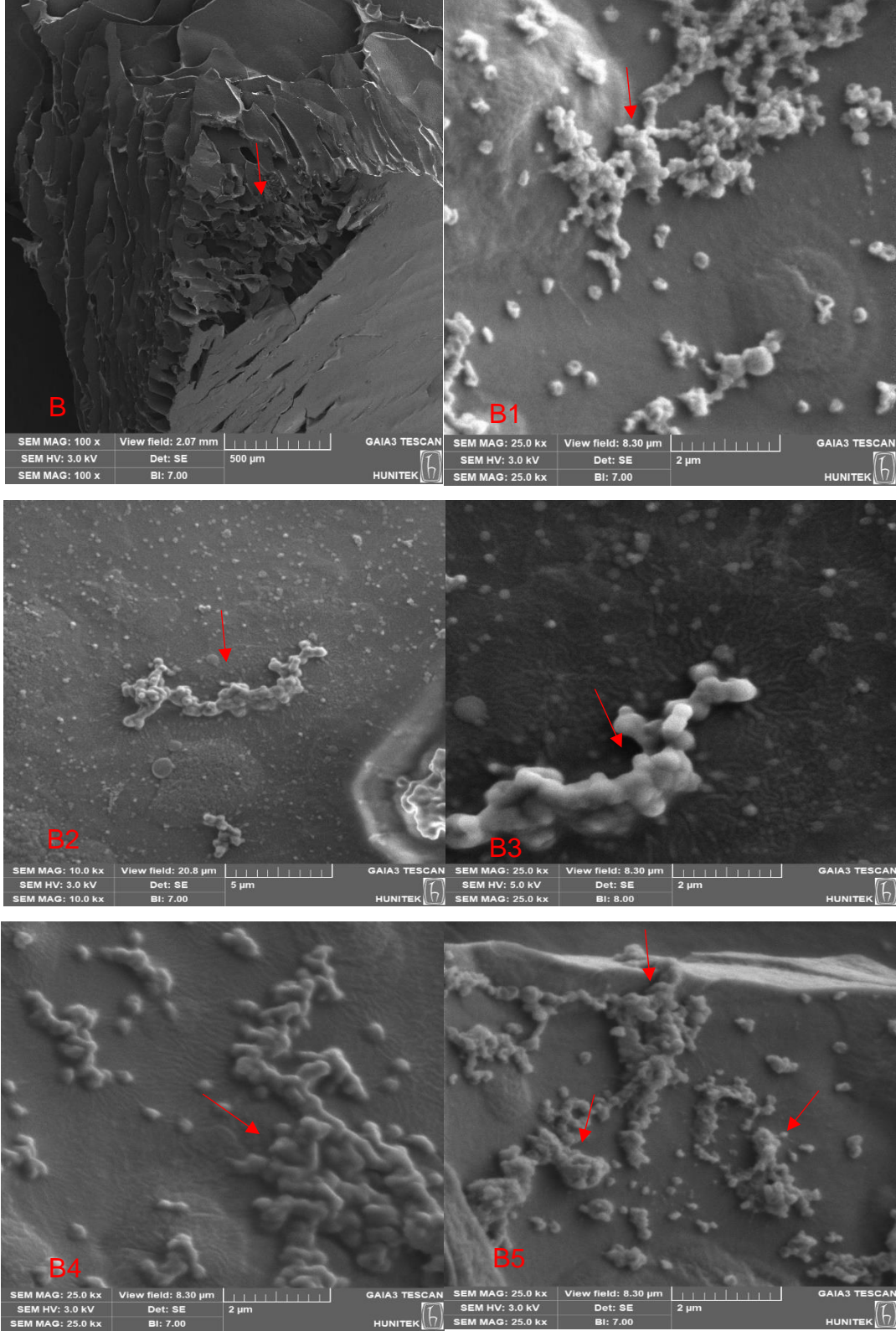
DHEA hormon ölçümü için PHEMA Tip IV Kol+FA Bazal kontrol Üç-OK grubunda, PHEMA Üç-OK Bazal kontrol grubuna kıyasla artış gözlenmiştir.

4.7. Taramalı Eletron Mikroskopisi

Hazırlanan kriyojellerin üzerine hücre ekimi yapılan kriyojellerde hücre dağılımlarını, gözeneklere tutunmalarını ve büyümelerini inceleyebilmek için SEM görüntüleri alınmıştır. PHEMA ve PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojel gruplarında İki-OK ve Üç-OK hücre grupları bir arada verilerek karşılaştırmaları yapılmıştır. PHEMA kriyojelin SEM görüntüleri Şekil 4.25'te verilmiştir. PHEMA kriyojel incelendiğinde gözenek duvarlarından ve yüzey yapısından anlaşıldığı üzere kriyojel üzerinde hücrelerin üremesi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojelde hücre kümeleri oluşturduğu PHEMA kriyojelin gözeneklerine, gözenek duvarlarına başarılı bir şekilde tutunduğu görülmüştür (Şekil 4.26).



Şekil 4.25. PHEMA kriyojelin A'da ok ile belirtilen yapı içerisinde hücreler görüntülenmiştir. A1, A2, A3, A4, A5'de jel üzerinde 7 gün içinde üreme göstermiş hücrelerin SEM görüntüleri; A) 99 X, bar 500 μ m, A1) 250 X, bar 2 μ m, A2) 500 X, bar 1 μ m, A3) 500 X, bar 1 μ m, A4) 150 X, bar 2 μ m, A5) 500 X, bar 10 μ m.



Şekil 4.26. PHEMA Tip IV Kol+FA kriyojelin B'de ok ile belirtilen yapı içerisinde hücreler görüntülenmiştir. B1, B2, B3, B4 ve B5'de jel üzerinde 7 gün içinde üreme göstermiş hücrelerin SEM görüntüleri; B) 100X, bar 500 µm, B1) 250X, bar 2 µm, B2) 100X, bar 5 µm, B3) 250X, bar 2 µm, B4) 150 X, bar 2 µm, B5) 250X, bar 2 µm.

5. TARTIŞMA

Plasental trofoblast biyolojisinde hücre-hücre ve hücre-HDM etkileşimleri yeterince iyi anlaşılammıştır ve üzerinde çalışılması gerekmektedir. Tez kapsamında oluşturulan model olan transwell kriyojel sistemi üzerinde BeWo, HUVEC ve H295R ortak hücre kültürleriyle oluşturulan bu plasenta modeli literatürde ilk kez çalışılmıştır. Bu çalışma kapsamında, HDM'yi temsilen hücre proliferasyonunu en iyi destekleyen folik asit ve tip IV kolajen içeren kriyojeller sentezlenmiş, transwell sistemi ile bir araya getirilerek İki-OK ve Üç-OK grupları oluşturularak deneyler yapılmıştır. BeWo, HUVEC ve H295R hücrelerinin ortak kültürü yapılarak plasental bariyer modeli oluşturmasındaki katkıları canlılık analizi, hormon seviyeleri ölçülerek ve SEM görüntülemeleri elde edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

Oskarsson ve ark. (2006)'nın yaptığı çalışmada, hücre hattındaki steroidojenik gen ifadesi ile normal insan yetişkin adrenalindeki gen ifadesi karşılaştırıldığında değerlerin yakın olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, diğer hücre hatlarına kıyasla sitotoksositeye karşı daha az hassasiyet göstermesi H295R hücrelerini adrenokortikal fonksiyonu ve steroidogenezi incelemek için uygun bir *in vitro* model haline getirmektedir.

Plasentada östrojen sentezi için feto-plasental iletişime ihtiyaç vardır. Bu nedenle steroidojenik etkileşimlerin oluşması için H295R hücresi ile BeWo hücresinin ortak kültüre edilmesi ortama avantaj sağlamaktadır. H295R hücreleri, BeWo hücrelerinde östrojenlere dönüştürülen androjen öncülerini sağlayarak oluşturduğumuz plasenta modellerinde fetal kısmı temsil etmektedir.

Thiebault ve ark. (2014)'nın yaptığı bir çalışmada, H295R insan adrenokortikal karsinom (fetal bölme) ve BeWo insan koriokarsinom (villöz trofoblast bölmesi) hücrelerini kullanarak bir *in vitro* ortak kültür modeli geliştirilmiştir. BeWo ve H295R hücreleri ortak kültüre edilmiştir. Endokrin bozucu bir pestisit olan atrazin uygulanarak CYP19 aktivitesi ve hormon üretimi sonuçları değerlendirilmiştir. Atrazin, yalnızca H295R hücrelerinde CYP19 aktivitesini ve östrojen üretimini indüklemiştir ancak ortak kültürde genel östrojen üretimini etkilememiş, yalnızca BeWo hücrelerinde CYP19 aktivitesini inhibe etmiştir ve ortak kültürde östrojen üretimini %90 azaltmıştır.

Thiebault ve ark. (2017)'nin yaptığı bir çalışmada, SSRI tipi bir antidepresan etken maddesi olan fluoksetinin ve bunun aktif metaboliti olan norfluoksetin'in plasental

aromataz (CYP19) ve feto-plasental steroidogenez üzerindeki etkileri incelenmiştir. Fluoksetin, feto-plasental ünitenin bir modeli olarak kullanılan fetal benzeri adrenokortikal (H295R) ve trofoblast benzeri (BeWo) hücrelerin ortak kültüründe östrojen sekresyonunu değiştirmemiş, CYP19 aktivitesini indüklemiştir. Norfluoksetin, feto-plasental ortak kültürde östrojen sentezini azaltmış ve BeWo hücrelerinde CYP19 aktivitesini azaltmıştır. Östrojenlerin hamilelik sırasındaki kritik rolü göz önüne alındığında, sonuçlar SSRI tedavisinin plasenta fonksiyonu ve fetal sağlık üzerindeki etkisi konusunda endişeye yol açmaktadır.

Jacobsen ve ark. yaptığı çalışmada (2015), beş farklı seçici serotonin reseptörü inhibitörlerinin (SSRI) endokrin sistemdeki etkilerini H295R hücresinde araştırılmıştır. SSRI'nin hücrede anti-proliferatif etki oluşturmasının yanı sıra farklı hormonlar üzerinde de etkilerin olduğu gözlemlenmiştir. Bu etkiler androjenlerin ve östrojenlerin arasındaki dengenin değişmesidir.

β -hCG hormon seviyesinin dual insertlerde İki-OK ve Üç-OK gruplarında %20-45 oranında artış göstermiştir. Vortiooksetin uygulamasıyla Üç-OK grubundaki hormon miktarının İki-OK grubuna kıyasla daha fazla olması, üç hücre içeren sistemin daha dirençli olmasından kaynaklanmaktadır. Hem BeWo hem H295R hücrelerinin ürettiği Progesteron (Pg) hormonu Üç-OK grubunun özellikle 3. gün inkübasyonunda çok yüksek miktarda artış göstermiştir ve bu artış H295R'nin mono kültür grubuna göre daha yüksektir. Bu bağlamda üç hücrenin birarada olduğu sistemlerin Pg hormonunu üretmede başarılı olduğu görülmüştür.

DHEA'nın vücutta düşük oranlarda bulunması depresyonla ilişkilendirilmektedir. 2014 yılında yayınlanan bir çalışmada, DHEA'nın şizofreni, anoreksiya nervoza, HIV ve adrenal yetmezliği olan kişilerde depresyon semptomlarını iyileştirebileceğini öne sürdü (Belkin vd., 2014). DHEA hormonu östriol ve östradiol hormonunun öncüsü olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple H295R hücreleri ve BeWo hücrelerinin birlikte kültüre edildiği Üç-OK gruplarında DHEA hormonu substrat olarak kullanıldığından miktar olarak az bulunmaktadır. Buna karşılık olarak dual insert İki-OK gruplarındaki östriol ve östradiol hormonları bu gruplarda yüksek bulunmuştur. İki-OK gruplarında ortak besiyeri içeriğindeki zengin hormon takviyeleri DHEA hormonunun supernatant ölçümlerinde konsantrasyon vermesine sebep olmuştur.

Yancu ve ark. (2019) yaptığı çalışmada, BeWo ve H295R hücre hatları kullanılarak oluşturulan plasental ortak kültür modelinde fesleğen ve rezene tohumunun esansiyel yağlarında en bol bulunan bileşiklerden olan estragol ve trans-anetol bileşikleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmada temel amaç, fetoplasental steroidogenezin estragol ve trans-anetol tarafından meydana gelen bozulmayı gösterebilmektir. Biyokimyasal sinyal yollarında meydana gelen değişiklikler östradiol, östron, östriol, DHEA, androstenedion ve progesteron hormonlarının üretimi, CYP 19 ifadesindeki değişikliklere bakılarak test edilmiştir. Bu çalışmada oluşturulan ortak kültürün estragol veya trans-anetol'e (2.5, 5,2 ve 25 µM) 24 saat maruz bırakılmasından sonra, estradiol, estron, DHEA, androstenedion, progesteron ve estriol seviyelerinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca estragol ve trans-anetol maruziyeti ile CYP11A1, HSD3B1, HSD3B2, HSD17B1, HSD17B5 gibi steroidojenik yolda önemli işlevi olan enzimlerin gen ekspresyonunun değiştiği gösterilmiştir.

Taxvig ve ark. (2013) yaptığı bir çalışmada, plasental perfüzyon modeli ve Transwell sistem kullanılarak BeWo hücre hattı ile oluşturulan tek katmanlı taşıma modelinde propikonazol, bititanol ve sipermetrin olarak adlandırılan üç pestisit transplasental taşınması araştırılmıştır. Pestisitlerden pitertanol, propikonazol, sipermetrin, malathion ve terbutilazin steroidogenezini etkileyerek progesteronda artışa ve testosteronda azalmaya neden olduğu *in vitro* ve *in vivo* olarak çalışmalarla gösterilmiştir. Yapılan çalışma plasental perfüzyon modeli ile BeWo hücre hattı taşıma modeli arasında karşılaştırılabilir sonuçlar ortaya koymuştur.

Aegenheister ve ark. (2018) yaptığı bir çalışmada BeWo ve HPEC (insan plasental venöz endotelial hücreleri) hücre hatları ile Transwell sistem üzerinde bir model oluşturulmuştur. Çalışmanın amaçlarından bir tanesi insan plasenta bariyerinde farklı yüzey modifikasyonlarına (PEGilat'a karşı sodyum karboksilat) sahip küçük (3-4 nm) altın kaplı nanopartiküllerin (AuNP)'lerin alımını ve translokasyonunu değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, küçük 3-4 nm AuNP'lerin insan plasenta bariyeri boyunca hem *in vitro* hem de *ex vivo* translokasyonu için ilk kanıt ortaya koyulmuştur.

E2 ve E3 hormon ölçümlerinde Üç-OK kontrol gruplarında hormon seviyesi her 3 inkübasyon süresi için de oldukça yüksektir. Vortiooksetine verilen yanıt incelendiğinde Üç-OK grubunun İki-OK grubuna kıyasla daha dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Hücrelerin iskeleli ortamda üremesi ve canlılıklarını koruması aynı zamanda toksisite yanıtlarının incelenmesinde kriyojel ile oluşturulan sistemler başarı ile kullanılabilir. 3B ortamlarda kültürasyonu sağlanan hücrelerin toksik yanıtlarının 2B sistemlere kıyasla daha dirençli olması aynı şekilde orta ve üzeri toksik madde çalışmalarında tercih edilmelidir.

6. YORUM

1. İkilenme zamanları birbirinden oldukça farklı BeWo, HUVEC ve H295R olmak üzere üç farklı hücre kriyojel ve transwell sistemi kullanılarak oluşturulan 3B sistem içerisinde başarılı bir şekilde oluşturulmuştur.
2. PHEMA ve Tip IV Kolajen ve Folik asit bağlanarak sentezlenen PHEMA kriyojel gruplarının üzerinde maternal kısmı temsil eden BeWo, endotel damarları temsil eden HUVEC hücreleri üretilmiştir ve bu ortama transwell sistemi de eklenerek fetal kısmı temsil eden H295R hücreleri kullanılarak *in vivo* sisteme oldukça yakın 3B bir sistem oluşturulmuştur.
3. Farklı özellikler ile hazırlanmış olan deney gruplarına vortiooksetin maddesi uygulanmıştır ve verdiği yanıtlar incelendiğinde 7,5 μM ve 15 μM doz uygulamasında hücre canlılık sonuçlarında azalmalar gözlenmemiştir. 3B koşullarda Tip IV Kol ve FA ile desteklenmiş doku iskelesinin *in vivo*ya olan benzerliği artırılmış ve hücrelerin mikro ortamlarını oluşturmaları sağlanmıştır. Bu koşullar ortak kültürün uygulanan ilaca karşı direnç göstermesini sağlamıştır.
4. PHEMA Tip IV Kol+FA grubunun PHEMA'ya kıyasla MTT Canlılık analizi sonuçlarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Hormon analizi ve SEM sonuçlarımızı da destekler şekilde FA ve tip IV kolajen'in PHEMA'ya eklenmiş olması hücrelerin canlılıklarını artırmaktadır.
5. β -hCG, Östradiol ve DHEA hormon ölçümü için PHEMA Tip IV Kol+FA grubunun PHEMA'ya kıyasla hormon miktarını artırdığı gözlenmiştir. Hücre canlılık analizi sonuçlarımızı ve SEM sonuçlarımızı da destekler şekilde FA ve tip IV kolajen'in PHEMA'ya eklenmiş olması hücrelerin hormon üretimini artırmaktadır.
6. PHEMA ve PHEMA Tip IV Kol+FA grubu kriyojel üzerinde BeWo ve HUVEC hücreleri üretilerek 7 gün boyunca inkübasyonu yapılarak SEM görüntüleri alınmıştır ve görüntüler canlılık sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Hücreler proliferasyon, kriyojel yüzeyine tutunma ve yayılım olarak oldukça başarılı bir şekilde üretilmiştir.
7. İki-OK grubuna H295R hücrelerinin eklenmesiyle oluşturulan Üç-OK grubunda elde edilen MTT ve hormon ölçümü analizi sonuçları, H295R eklenerek oluşturulan sistemimizin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu göstermiştir.

Tez çalışması kapsamında PHEMA temelli kriyojele Tip IV Kolajen ve Folik Asit ile fonksiyonellik kazandırılmıştır. BeWo, HUVEC ve H295R hücreleri ile İkili ve Üçlü *in vivo*ya benzeyen 3B kriyojel sistemler oluşturulmuştur. Oluşturulan bu plasental kriyojel sistemleri üzerinde SSRI antidepresan grubundan olan vortiooksetin etken maddesi uygulanmasıyla hormon sentezi incelenmiştir. Tip IV Kolajen ve Folik asit ile oluşturulan PHEMA kriyojel, PHEMA kriyojel ile karşılaştırıldığında SEM görüntülerine göre hormon üretimi ve canlılık analizi sonuçlarını destekler nitelikte sonuçlar elde edilmiştir. İlerleyen çalışmalarda model üzerine farklı hücre tipleri eklenerek ve mikro çevreyi geliştirecek malzemeler eklenerek, bunun yanı sıra farklı bariyer modelleri oluşturmak amacıyla da kullanılabilecek bir çalışma olması amaçlanmıştır.

7. KAYNAKLAR

- [1] Donnelly, L., & Campling, G. Functions of the placenta. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 20(7) (2019) 392-396.
- [2] Myllynen, P., & Vähäkangas, K. Placental transfer and metabolism: an overview of the experimental models utilizing human placental tissue. *Toxicology in vitro*, 27(1) (2013) 507-512.
- [3] Chatuphonprasert, W., Jarukamjorn, K., Ellinger, I. "Physiology and pathophysiology of steroid biosynthesis, transport and metabolism in the human placenta", *Frontiers in pharmacology*, 9 (2018) 1027.
- [4] Y. Yazır and H. Dalçık, An Important Method in the Investigation of Vascular Pathologies: Endothelial Cell Culture, *Kosuyolu Heart Journal*, 15 (2012) 137-142.
- [5] M. Ibrahim, M.K. Richardson, Beyond organoids: *In vitro* vasculogenesis and angiogenesis using cells from mammals and zebrafish, *Reprod. Toxicol.* 73 (2017) 292–311.
- [6] Duranova, H., Fialkova, V., Valkova, V., Bilcikova, J., Olexikova, L., Lukac, N., ... & Knazicka, Z. Human adrenocortical carcinoma cell line (NCI-H295R): An *in vitro* screening model for the assessment of endocrine disruptors' actions on steroidogenesis with an emphasis on cell ultrastructural features. *Acta Histochemica*, 124(5) (2022) 151912.
- [7] Lichtenauer, U. D., Shapiro, I., Osswald, A., Meurer, S., Kulle, A., Reincke, M., ... & Beuschlein, F. Characterization of NCI-H295R cells as an *in vitro* model of hyperaldosteronism. *Hormone and Metabolic Research*, 45(02) (2013) 124-129.
- [8] Oskarsson, A., Ullerås, E., Plant, K.E., Hinson, J.P., Goldfarb, P.S. "Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane *in vitro*", *J. Appl. Toxicol.*, 26 (6) (2006) 484-492.
- [9] Gerhard, I., Fitzner, C., Klinga, K., Rahman, N., & Runnebaum, B. 'Estrogen screening in evaluation of fetal outcome and infant's development' (1986)
- [10] Thibeault, A.A.H., Deroy, K., Vaillancourt, C., Sanderson, J.T. "A unique co-culture model for fundamental and applied studies of human fetoplacental steroidogenesis and interference by environmental chemicals", *Environ. Health Perspect*, 122 (2014) 371–377.

- [11] Organisation for Economic Co-operation and Development. *Test No. 456: H295R Steroidogenesis Assay*, (2022) OECD Publishing.
- [12] Saylan, Y., & Denizli, A. Supermacroporous composite cryogels in biomedical applications. *Gels*, 5(2) (2019) 20.
- [13] Baimenov, A., Berillo, D. A., Pouloupoulos, S. G., & Inglezakis, V. J. A review of cryogels synthesis, characterization and applications on the removal of heavy metals from aqueous solutions. *Advances in colloid and interface science*, 276 (2020) 102088.
- [14] Jones, L. O., Williams, L., Boam, T., Kalmes, M., Oguike, C., & Hatton, F. L. Cryogels: Recent applications in 3D-bioprinting, injectable cryogels, drug delivery, and wound healing. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 17(1) (2021) 2553-2569.
- [15] Şarkaya, K., Çadırcı, M., Çetin, K., Mutlu, D., & Arslan, Ş. PHEMA/PPy cytocompatible conductive cryogels: One-pot synthesis, characterization, and electrical properties. *Materials Today Communications*, 35 (2023) 105791.
- [16] P. Öncel, İlaç Salımı İçin Moleküler Baskılanmış Kriyojel Membranlar, (2013).
- [17] A. Memic, T. Colombani, L.J. Eggermont, M. Rezaeeyazdi, J. Steingold, Z.J. Rogers, K.J. Navare, H.S. Mohammed and S.A. Bencherif, Latest Advances in Cryogel Technology for Biomedical Applications, *Advanced Therapeutics*, (2019) 2.
- [18] A. Baimenov, D.A. Berillo, S.G. Pouloupoulos and V.J. Inglezakis, A review of cryogels synthesis, characterization and applications on the removal of heavy metals from aqueous solutions, *Advances in colloid and interface science*, 276 (2020) 102088.
- [19] T.M.A. Henderson, K. Ladewig, D.N. Haylock, K.M. McLean and A.J. O'Connor, Cryogels for biomedical applications, *J Mater Chem B*, 1 (2013) 2682-2695.
- [20] K.R. Hixon, T. Lu and S.A. Sell, A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications, *Acta Biomater*, 62 (2017) 29-41.
- [21] Bakhshpour, M., Idil, N., Perçin, I., & Denizli, A. Biomedical applications of polymeric cryogels. *Applied Sciences*, 9(3) (2019) 553.
- [22] Y. Yazır and H. Dalçık, An Important Method in the Investigation of Vascular Pathologies: Endothelial Cell Culture, *Kosuyolu Heart Journal*, 15 (2012) 137-142.
- [23] S. Hauser, F. Jung and J. Pietzsch, Human Endothelial Cell Models in Biomaterial

Research, Trends Biotechnol, 35 (2017) 265-277.

[24] D.J. Medina-Leyte, M. Domínguez-Pérez, I. Mercado, M.T. Villarreal-Molina and L. Jacobo-Albavera, Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review, Applied Sciences, (2020) 10.

[25] M. Soares J., J. Hunt S., Placenta and Trophoblast, Methods and Protocols, (2006) Volume I.

[26] H. Mackova, Z. Plichta, H. Hlidkova, O. Sedlacek, R. Konefal, Z. Sadakbayeva, M. Duskova-Smrckova, D. Horak and S. Kubinova, Reductively Degradable Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Hydrogels with Oriented Porosity for Tissue Engineering Applications, ACS Appl Mater Interfaces, 9 (2017) 10544-10553.

[27] L. Mahmood, The metabolic processes of folic acid and Vitamin B12 deficiency, Journal of Health Research and Reviews, 1 (2014) 1-5.

[28] Narmani, A., Rezvani, M., Farhood, B., Darkhor, P., Mohammadnejad, J., Amini, B., ... & Abdi Goushbolagh, N. Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems. *Drug development research*, 80(4) (2019) 404-424.

[29] Y.I. Goh and G. Koren, Folic acid in pregnancy and fetal outcomes, J Obstet Gynaecol, 28 (2008) 3-13.

[30] C.M. Oefner, A. Sharkey, L. Gardner, H. Critchley, M. Oyen and A. Moffett, Collagen type IV at the fetal-maternal interface, Placenta, 36 (2015) 59-68.

[31] N. Çittçi, S. Kaplan and M.Ç. Rağbetli, Kollagenin ve Kollagen Tiplerinin Yapısı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 4 (1987) 389-397.

[32] Montagnana, M., Trenti, T., Aloe, R., Cervellin, G., Lippi, G. "Human chorionic gonadotropin in pregnancy diagnostics", Clinica Chimica Acta, 412(17-18) (2011) 1515-1520.

[33] Cole, L.A. "Biological functions of hCG and hCG-related molecules", Reprod. Biol. Endocrinol, 8 (2010) 1-14.

[34] Stillwell, W. "Chapter 20: Bioactive Lipids, An Introduction to Biological Membranes (Second Edition)", Elsevier, (2016) 453-478

[35] Caron-Beaudoin, E., Viau, R., Hudon-Thibeault, A. A., Vaillancourt, C., & Sanderson, J. T. "The use of a unique co-culture model of fetoplacental steroidogenesis

as a screening tool for endocrine disruptors: The effects of neonicotinoids on aromatase activity and hormone production.’ *Toxicology and Applied Pharmacology*, 332 (2017) 15-24.

[36] Hudon-Thibeault, A.A., Laurent, L., Vo Duy, S., Sauv e, S., Caron, P., Guillemette, C., Sanderson, J.T., Vaillancourt, C. “Fluoxetine and its active metabolite norfluoxetine disrupt estrogen synthesis in a co-culture model of the feto-placental unit”, *Mol. Cell. Endocrinol*, 442 (2017) 32-39.

[37] Herbert J. Cambridge University, Cambridge, UK, Elsevier, (2007)

[38] Quinn, T.A., Ratnayake, U., Dickinson, H., Castillo-Melendez, M., Walker, D.W. ‘‘The feto-placental unit, and potential roles of dehydroepiandrosterone (DHEA) in prenatal and postnatal brain development: A re-examination using the spiny mouse’’ *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 160 (2016) 204-213.

[39] Hosseini, S., V azquez-Villegas, P., Rito-Palomares, M., Martinez-Chapa, S.O. 2018. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) From A to Z*, Second, Springer Nature, Monterrey, Mexico. <http://www.springer.com/series/11910>.

[40] Lequin, R.M. “Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)”, *Clin. Chem*, 51 (2005) 2415-2418.

[41] Tighe, P.J., Ryder, R.R., Todd, I., Fairclough, L.C. “ELISA in the multiplex era: Potentials and pitfalls”, *Proteomics-Clin. Appl*, 9 (2015) 406-422.

[42]  ırak, M. Y. “Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Systems”, *T Klin J Med Sci*, 19 (1999) 242-248.

[43] Demir, M. 2022. İnsan Plasenta ve Endotel Hücre Hatları ile 3B Kriyojel Ortak Kültür Sisteminin Oluşturulması ve Etkinliğinin Araştırılması, “Yüksek Lisans” Tezi, Hacettepe  niversite, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zooloji Ana Bilim Dalı, Ankara.

[44] Costa, M. A. “The endocrine function of human placenta: an overview”, *Reproductive biomedicine online*, 32(1) (2016) 14-43.

[45] Sanin, S. 2021. Plasenta Sferoid (Mikro Doku) Modelinde Vortiksetin Etkisinin Araştırılması. “Yüksek Lisans” Tezi, Hacettepe  niversite, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zooloji Ana Bilim Dalı, 125, Ankara.

- [46] National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 6037, CID 6037" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6037>. Accessed 22 May, **2023**.
- [47] Zuppinger, Christian. "3D cardiac cell culture: a critical review of current technologies and applications." *Frontiers in cardiovascular medicine* 6 (2019) 87.
- [48] Fontoura, Julia C., et al. "Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance." *Materials Science and Engineering: C* 107 (2020) 110264.
- [49] Justice, Bradley A., Nadia A. Badr, and Robin A. Felder. "3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays." *Drug discovery today* 14.1-2 (2009) 102-107.
- [50] Chen, G., Højer, A.M., Areberg, J., Nomikos, G. "Vortioxetine: Clinical Pharmacokinetics and Drug Interactions", *Clin. Pharmacokinet*, 57 (2018) 673–686.
- [51] Taxvig, C., Hadrup, N., Boberg, J., Axelstad, M., Bossi, R., Bonfeld-Jørgensen, E. C., & Vinggaard, A. M. In vitro-in vivo correlations for endocrine activity of a mixture of currently used pesticides. *Toxicology and applied pharmacology* 272(3) (2013) 757-766.
- [52] Yancu, Debbie, Cathy Vaillancourt, and J. Thomas Sanderson. "Evaluating the effects on steroidogenesis of estragole and trans-anethole in a fetoplacental co-culture model." *Molecular and cellular endocrinology* 498 (2019) 110583.
- [53] Belkin, Z. R., Krapf, J. M., Goldstein, A. T. "Drugs in early clinical development for the treatment of female sexual dysfunction [Abstract]", *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 24(2) (2014) 156-16.
- [54] Aengenheister, L., Keevend, K., Muoth, C., Schönenberger, R., Diener, L., Wick, P., Buerki-Thurnherr, T. "An advanced human in vitro co-culture model for translocation studies across the placental barrier", *Sci. Rep.*, 8 (2018) 1-12.
- [55] Duranova, Hana, et al. "Human adrenocortical carcinoma cell line (NCI-H295R): An *in vitro* screening model for the assessment of endocrine disruptors' actions on

steroidogenesis with an emphasis on cell ultrastructural features." *Acta Histochemica* 124.5 (2022) 151912.