

YALOVA ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL PROTEİN KATKILI BİYOBOZUNUR POLİMER DOKU
MATRİKSLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE ADİPOZ KÖK HÜCRELER İLE
ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nergis Zeynep RENKLER DEĞİRMENCİ

Polimer Mühendisliği Anabilim Dalı

Polimer Mühendisliği Programı

TEMMUZ 2019

YALOVA ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL PROTEİN KATKILI BİYOBOZUNUR POLİMER DOKU
MATRİKSLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE ADİPOZ KÖK HÜCRELER İLE
ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Nergis Zeynep RENKLER DEĞİRMENÇİ
165101003**

Polimer Mühendisliği Anabilim Dalı

Polimer Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU

TEMMUZ 2019

YALOVA Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 165101003 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Nergis Zeynep RENKLER DEĞİRMENCİ**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **“DOĞAL PROTEİN KATKILI BİYOBOZUNUR POLİMER DOKU MATRİKSLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE ADİPOZ KÖK HÜCRELER İLE ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI”** başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU
Yalova Üniversitesi



Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU
Yalova Üniversitesi



Doç. Dr. Hamit ERDEMİ
Yalova Üniversitesi



Doç. Dr. Erkan Türker BARAN
Sağlık Bilimleri Üniversitesi



Teslim Tarihi : 25 Temmuz 2019
Savunma Tarihi : 27 Ağustos 2019





Aileme,



ÖNSÖZ

Çalışmalarımın her aşamasında yanımda olup sahip olduğuengin bilgi birikimini ve tecrübelerini paylaşarak bana yol gösteren, çalışmam için her türlü imkanı sağlayan ve beni daima motive eden, öğrencisi olmaktan onur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU'na,
Tez dönemimde yaşadığım her türlü zorlukta bana destek olan ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Zehra Betül AHİ'ye,
Çalışma süresince protein tayini ve karakterizasyon işlemlerinde yardımcı olan Merve TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK'e
Tez çalışmam kapsamında yapılan hücre kültürü çalışmalarında yardımcı olan Doç.Dr. Pınar YILGÖR HURİ'ye
Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan ve her zaman desteğini ve yardımlarını gördüğüm aileme ve benden desteklerini esirgemeyen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 2019

Nergis Zeynep RENKLER DEĞİRMENCİ
(Biyomühendis)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	ix
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ŞEKİL LİSTESİ	xv
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Doku Mühendisliği	3
2.2 Doku İskeleleri.....	5
2.2.1 Doku iskelesi oluşturma yöntemleri	8
2.2.1.1 Çözücü dökme/parçacık uzaklaştırma	8
2.2.1.2 Dondurarak kurutma/emülsiyonlaştırma	9
2.2.1.3 Gaz köpükleştirme.....	9
2.2.1.4 Faz ayrımı	10
2.2.1.5 Eriyik kalıplama tekniği	11
2.2.1.6 Katı serbest form fabrikasyonu	11
2.2.1.7 Elektroegirme	12
2.3 Doku Mühendisliğinde Kullanılan Polimerler.....	16
2.3.1 Doğal polimerler	17
2.3.2 Sentetik polimerler	17
2.3.2.1 Poli(ϵ -kaprolakton).....	18
2.4 Yumurta Beyazı Proteinleri	21
2.4.1 Ovalbumin	22
2.4.2 Ovotransferrin.....	22
2.4.3 Lizozim.....	22
2.4.4 Ovomusin	23
3 MATERYAL ve METOD	25
3.1 Kullanılan Malzemeler	25
3.2 Yumurta Beyazından Protein Ekstraksiyonu	25
3.3 PCL/HEW Nanofiber Membran Hazırlanması.....	26
3.4 Karakterizasyon	27
3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	28
4 BULGULAR ve TARTIŞMA	31
4.1 SDS-Page Analizi	31
4.2 Morfolojik Analiz	31
4.3 FTIR-ATR Analizi.....	34
4.4 Termogravimetrik-Diferansiyel Termal Analiz.....	35
4.5 Su Teması Açısı Ölçümü	36
4.6 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	37
4.6.1 SEM analizi	37
4.6.2 Calcein-AM boyaması.....	37

4.6.3 Alamar blue ile hücre yaşayabilirliği analizi	38
4.6.4 Aktin filamentleri ve çekirdek boyaması	39
5 SONUÇ ve ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ.....	49



KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

ASC	: Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre
CAD	: Bilgisayar destekli tasarım
CAM	: Bilgisayar destekli üretim
CT	: Bilgisayarlı tomografi
DCM	: Diklorometan
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMF	: Dimetilformamid
ECM	: Hücre dışı matris
FBS	: Fetal sığır serum
FDA	: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
HEW	: Tavuk yumurtası beyazı
HFIP	: 1,1,1,3,3,3,-Hekzafloro-2-propanol
MCO	: Moleküler ağırlık kesilmesi
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
OTAP-92	: Ovotransferrin antimikrobiyal peptit
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PCL	: Poli(ϵ -kaprolakton)
PEG	: Polietilen glikol
PEO	: Polietilen oksit
PLA	: Poli laktik asit
PLGA	: Poli(laktik asit-ko-glikolik asit)
PLLA	: Poli (l-laktik asit)
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SIPS	: Çözücü ile faz ayrımı
TGA	: Termo Gravimetrik Analiz
T_g	: Camsı geçiş sıcaklığı
T_m	: Erime sıcaklığı
TIPS	: Termal yolla faz ayrımı
3B	: Üç boyutlu
μ	: Mikro
n	: Nano



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1: İstenen doku iskelesi fonksiyonu için tasarım parametreleri.....	6
Çizelge 2.2: PCL'nin fizikokimyasal özellikleri.....	20
Çizelge 2.3: Yumurta beyazında bulunan proteinlerin özellikleri.....	21
Çizelge 2.4: Yumurta beyazındaki temel proteinler ve işlevleri.....	24





ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Doku mühendisliğinin temel bileşenleri.	3
Şekil 2.2: Doku mühendisliği stratejisi.....	4
Şekil 2.3: Parçacık uzaklaştırma yöntemi ile doku iskelesi oluşturulması.....	9
Şekil 2.4: Faz ayrımı tekniği gösterimi.....	10
Şekil 2.5: Elektroğirme tekniği gösterimi.....	13
Şekil 2.6: Elektroğirme işleminde kullanılan bazı toplayıcı çeşitleri.	14
Şekil 2.7: Elektroğirme düzeneğinde artan voltaj ile taylor konisi ilişkisi.	15
Şekil 2.8: PCL'nin doku mühendisliği uygulamaları	18
Şekil 2.9: PCL sentez mekanizmaları.....	19
Şekil 3.1: a. Yumurta beyazı, b. Liyofilize edilmiş yumurta beyazı	26
Şekil 3.2: Deneyde kullanılan elektroğirme düzeneği.	27
Şekil 4.1: SDS-Page analizinde görünen 5 temel HEW proteini bandı.....	31
Şekil 4.2: PCL/HEW ve PCL nanofiber membranların SEM görüntüleri.....	33
Şekil 4.3: PCL/HEW membran immünohistokimyasal boyaması CLSM görüntüsü.....	34
Şekil 4.4: PCL/HEW, PCL ve HEW proteininin FTIR spektrumu.	34
Şekil 4.5: TGA analizi grafiği.	35
Şekil 4.6: PCL ve PCL/HEW membranların test süresince temas açısı değişimlerinin gösterimi.	36
Şekil 4.7: PCL ve PCL/HEW örneklerinde kültüre edilmiş ASC'lerin SEM mikrografları.	37
Şekil 4.8: PCL ve PCL/HEW nanofibröz matrisler üzerine ekilen ASC'lerin Calcein-AM ile canlılık ve morfoloji analizi	38
Şekil 4.9: PCL ve PCL/HEW nanofiber membranlarına ekilen ASC'lerin proliferasyonu.	39
Şekil 4.10: Phalloidin ve draç5 boyası ile F-aktin(yeşil) ve çekirdek(kırmızı) boyaması.....	40



DOĞAL PROTEİN KATKILI BİYOBOZUNUR POLİMER DOKU MATRİKSLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE ADİPOZ KÖK HÜCRELER İLE ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu tez çalışması, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere, mevcut sentetik ve doğal kompozit polimerik doku iskelelerine alternatif olarak literatürde ilk kez yumurta beyazı proteininin (HEW) kullanımını ve bu proteinin yüzey kimyası özelliklerine etkisini ve adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (ASCs) ile etkileşimini incelemektedir. Bu amaçla, HEW ve poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) polimerinden elektroegirme ile nanofiber doku iskeleleri üretildikten sonra, bu yapıların çeşitli yöntemler ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki aşamada, doku iskelelerinin üzerine ASC'ler ekilerek hücre canlılık analizleri yapılmıştır.

İlk aşamada elde edilen liyofilize HEW proteinine SDS-page analizi yapılmıştır ve HEW'in içeriğindeki ana proteinlere ait bantlar gözlenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılan morfolojik analizler sonucunda düzgün yüzeylere sahip fiberlerden oluşan membranların başarıyla elde edildiği görülmüştür. Ayrıca, HEW içeren fiberlerin (50-254nm) yalnızca PCL'den oluşan fiberlere (0.90-1.60 μ m) göre daha ince olduğu tespit edilmiştir. Nanofiberler üzerindeki HEW dağılımı, anti-ovalbumin antikoru kullanılarak immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR-ATR) analizi ile de membran üzerindeki protein varlığı doğrulanmıştır. PCL/HEW membranının termal özelliklerinin belirlenmesi ve ayrıca membran içeriğinde bulunan PCL ve HEW miktarının tayini amacıyla termogravimetrik diferansiyel termal analiz (TGA) yapılmıştır. TGA sonucuna göre her iki bileşenin dekompozisyonu görülmüş ve kompozit nanofiberlerdeki HEW protein oranının %36 civarında olduğu saptanmıştır. Fiberlerin ıslanabilirliğini analiz etmek amacıyla su ile yapmış olduğu temas açıları ölçülmüştür. Hidrofobik özellikte olduğu bilinen PCL membranların temas açısının 90°'de sabit kaldığı gözlemlenirken, PCL/HEW membran yüzeylerinde başlangıçta ölçülen 70°'lik temas açısının zamanla azaldığı ve dolayısıyla proteinin membranlara su absorplama özelliği katarak hidrofilik karakterde bir matris oluşumuna sebep olduğu bulunmuştur.

Hücre kültürü çalışmalarında, doku iskeleleri üzerine ekilen ASC'lere hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla 2, 7 ve 14. günlerde canlı/ölü boyaması ve alamar blue çalışması yapılmıştır. Ayrıca, hücresel iskeletteki aktin filamentleri ile çekirdek görüntülemesi için sırasıyla phalloidin ve draq5 boyaması yapılmıştır. Yapılan analiz ve görüntülemeler sonucunda HEW içeren örnekler üzerinde ekili hücrelerin 14 gün boyunca canlılıklarını koruyarak çoğaldıkları; kontrol grubu olan sadece PCL'den oluşan örnekler üzerinde ekili hücre sayısında ise 7. günden sonra azalma olduğu gözlenmiştir.

Hücre tutunması ve çoğalması için doğru biyofiziksel özelliklere sahip doku iskelesi üretilmesi amacıyla sentetik polimerlerin doğal bileşenlerle karıştırılması, doku iskelelerinde istenen özelliklere ulaşmak için basit ve etkili bir yoldur. Bu amaç doğrultusunda yapılan bu tez çalışmasında sonuç olarak basit, hızlı ve düşük maliyetli bir imalat yöntemi ile PCL/HEW doku iskeleleri oluşturulmuş; biyobozunurluğu, yüzey yapısı ve mekanik özellikleri açısından yeterli olduğu, hücre tutunmasını ve çoğalmasını büyük ölçüde desteklediği anlaşılmıştır ve böylelikle çeşitli doku mühendisliği uygulamaları için uygulanabilirliği gösterilmiştir.



EVALUATION OF BIODEGRADABLE POLYMERIC SCAFFOLDS WITH NATURAL PROTEIN AND INTERACTION WITH ADIPOSE DERIVED STEM CELLS

SUMMARY

This thesis examines the use of hen egg white protein (HEW) and its effect on surface chemistry and its interaction with adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) for the first time in the literature as an alternative to existing synthetic and natural composite polymeric scaffolds for use in tissue engineering applications.

For effective applications in tissue engineering requires a scaffold with superior properties in terms of biological and physical performances. For this reason, various manufacturing technologies and engineering methods are used together to obtain the desired properties in tissue scaffolds. Tissue scaffolds formed from synthetic polymers may exhibit good structural and mechanical properties, but may not be suitable for cell adhesion and tissue formation. In contrast, natural polymers can provide very good biological properties. However, natural polymers also do not exhibit good mechanical strength and stability in physiological environments. For this reason, the use of composite scaffolds made up of synthetic and natural components is becoming increasingly common.

In this thesis, composite nanofiber scaffold was formed by electrospinning from lyophilized HEW protein and synthetic and biodegradable polymer poly (ϵ -caprolactone) (PCL). The effect of bioactive natural component HEW protein on the surface properties of the nanofiber membrane was investigated and its cellular response to the ASCs was tested. These nanofiber tissue scaffolds were formed by electrospinning method because of the properties of electrospinning being one of the production methods of polymeric tissue scaffolds and the ability to form micro and nanoscale fibers that can mimic extracellular matrix fibers. Furthermore, the nanofiber membranes obtained have a high surface area and porosity and thus have great potential for use in tissue engineering.

PCL is a biodegradable and biocompatible synthetic polymer that is widely used in tissue engineering. However, its hydrophobicity presents a disadvantage in terms of cell attachment to the surface. In order to overcome these disadvantages, it has advantages to use PCL tissue scaffold together with bioactive materials to promote cell adhesion and proliferation. As for HEW is an inexpensive protein source, containing more than 100 types of soluble proteins with different molecular weights, isoelectric points, and concentrations, including ovalbumin, ovotransferrin, ovomuciod, ovomucin and lysosome at high concentrations. HEW proteins provide further benefits for human health, with their antihypertensive, antioxidant, antidiabetic and anticancer features. Therefore, HEW protein was added to the nanofiber PCL membrane structure. It was thought that the hydrophobicity of PCL, which has a disadvantage in terms of cell adhesion, could be reduced by changing the surface chemistry by adding protein. ASCs were seeded on the characterized

scaffolds and cell viability analyzes were performed. The cells were isolated from fresh human subcutaneous adipose lipoaspirates.

The SDS-page analysis was performed on the lyophilized HEW protein obtained in the first step and bands of the main proteins in HEW (ovalbumin, ovotransferrin, ovomucoid, avidin, and lysozyme) content were observed. The total protein concentration was calculated to be about 5 mg/ml. Fiber morphology of the nanofiber scaffold was examined by scanning electron microscopy (SEM) and it was observed that smooth surfaces and without any bead formation were obtained. Also, HEW-containing fibers were found to be thinner (50-254nm) than neat PCL fibers (0.90-1.60 μ m). The distribution of HEW on nanofibers was demonstrated with a confocal laser scanning microscope after staining with antibody against ovalbumin. For this, the scaffolds were incubated with the primary rabbit anti-ovalbumin antibody and then incubated with secondary antibody, anti-mouse Alexa Fluor 488 so, homogeneous distribution of HEW was achieved throughout the nanofibrous mats. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR-ATR) analysis of the nanofiber membrane confirmed the presence of both components in the produced scaffolds with bands associated with proteins as expected. Thermogravimetric differential thermal analysis (TGA) was performed to determine the thermal properties of the PCL/HEW membrane and also to determine the amount of PCL and HEW contained in the membrane. According to TGA results, decomposition of both components was observed and HEW protein content in composite nanofibers was found to be around 36%. To analyze the wettability of the fibers, their contact angles with water were measured. While the contact angle of PCL membranes known to be hydrophobic was observed to be constant at 90°, it was found that the contact angle of 70° initially measured on PCL/HEW membrane surfaces decreases with time and thus the protein causes water-absorbing matrix formation to membranes.

Human ASCs were used to determine the cell adhesion and proliferation behavior on the nanofibrous mats. The cells were isolated from fresh human subcutaneous adipose lipoaspirates. ASCs at passage 3 were suspended in culture medium and seeded onto scaffolds using a density of 25×10^3 cells/sample and then allowed to grow for 2 weeks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ with medium changes every 2–3 days. To determine the cell viability of ASCs that were seeded on tissue scaffolds during the cell culture stage, live/dead staining and Alamar blue staining were performed on days 2nd, 7th and 14th. Live/dead staining were observed with confocal laser scanning microscopy. The morphology and cytoskeleton organization of the cells on the mats were analyzed under a confocal microscope at day 14 after staining of F-actin and nuclei with phalloidin and draq5, respectively. Neat PCL nanofiber mats were used as a control for all experiments. Following the observations of live/dead staining, more uniform cell spreading and distribution was observed on PCL/HEW mats throughout the culture. Cellular morphology was further examined by SEM at each time point. As a result of the analysis and imaging, it was observed that the cultivated cells proliferated for 14 days on HEW containing samples; the number of cultivated cells was decreased after 7th days on the control group PCL-only samples.

Mixing synthetic polymers with natural components to produce tissue scaffolds with the correct biophysical properties for cell attachment and proliferation is a simple and effective way to achieve the desired properties in tissue scaffolds. In this thesis, PCL/HEW scaffolds were formed with a simple, fast and low-cost manufacturing method. Moreover, having sufficient properties in terms of biodegradability, surface

structure, mechanical properties and greatly supports cell adhesion and proliferation thus has been shown to be applicable for various tissue engineering applications. The addition of HEW to the structure has led to a decrease in fiber diameter, as well as significant changes in surface chemistry and wettability, which are beneficial for cells. Thus, the cell culture studies indicated that the PCL/HEW electrospun mats could support robust ASC attachment and viability more than neat PCL counterparts. Overall, results obtained from the present work indicate that PCL/HEW electrospun mats possess favorable morphological and biochemical properties to serve as an artificial matrix for stem cell growth and can be used as a scaffold for the regeneration of different tissues.



1 GİRİŞ

Doku mühendisliği, doğal dokunun mimari yapısını taklit ederek istenen hücre cevabı oluşturmak ve üç boyutlu dokuyu oluşturmak üzerine çalışan disiplinler arası bir alanıdır. Trafik kazaları, ateşli silah yaralanmaları, kanser, cerrahi müdahaleler gibi çeşitli sebeplerle ortaya çıkan yumuşak (deri, kan damarı vb.) veya sert (kemik, diş) doku kayıpları sonucunda yapılan organ nakillerinde donör azlığı veya immun reaksiyon oluşması gibi olumsuzluklara çözüm sunmak amacıyla oluşmuş multidisipliner bir alandır. Doku mühendisliği uygulamaları ile cilt, kemik, tendon, kalp, kan damarı ve sinir gibi çeşitli dokuların yenilenmesi için tedaviler geliştirilerek milyonlarca hastanın yaşam kalitesini önemli ölçüde arttırmak amaçlanmaktadır [1].

Doku mühendisliği, temel olarak, hedef doku veya organa uygun bir doku iskelesi yapılmasını sağlayan faktörleri ve bu iskeleye ekilecek hücreleri içermektedir. Son zamanlarda, kök hücre ve biyomalzeme alanlarındaki gelişmelerle birlikte rejeneratif tıp alanındaki çalışmalar ile doku mühendisliği uygulamaları yaşam bilimlerinin önemli bir parçası haline gelmiştir [2]. Doku iskelesi oluşturmak için kullanılacak sentetik veya doğal biyomalzemeler, hücreler için fiziksel destek sağlamanın yanı sıra doku oluşumu için de uygun kimyasal ve biyolojik özelliklere sahip olması gerekliliği bakımından önemlidir. Hedef dokunun özelliklerine göre doğal veya sentetik biyomalzemelerden biri seçilebileceği gibi; doğal ve sentetik maddelerin bir arada olması, daha iyi mekanik ve biyolojik özellikler elde edilmesini sağlayabilmektedir [3]. Sentetik bir polimerik biyomalzeme olan PCL, doku mühendisliğinde geniş bir kullanıma sahip, biyobozunur ve biyouyumlu bir poliesterdir. Ancak PCL'nin hidrofobikliği, yüzeyine hücre tutunması açısından dezavantaj sağlamaktadır. Bu dezavantajları ortadan kaldırabilmek için PCL doku iskelesi üretilirken hücre tutunması ve çoğalmasını destekleyecek başka bir biyoaktif malzemeyle beraber kullanılması daha iyi sonuçlar vermektedir.

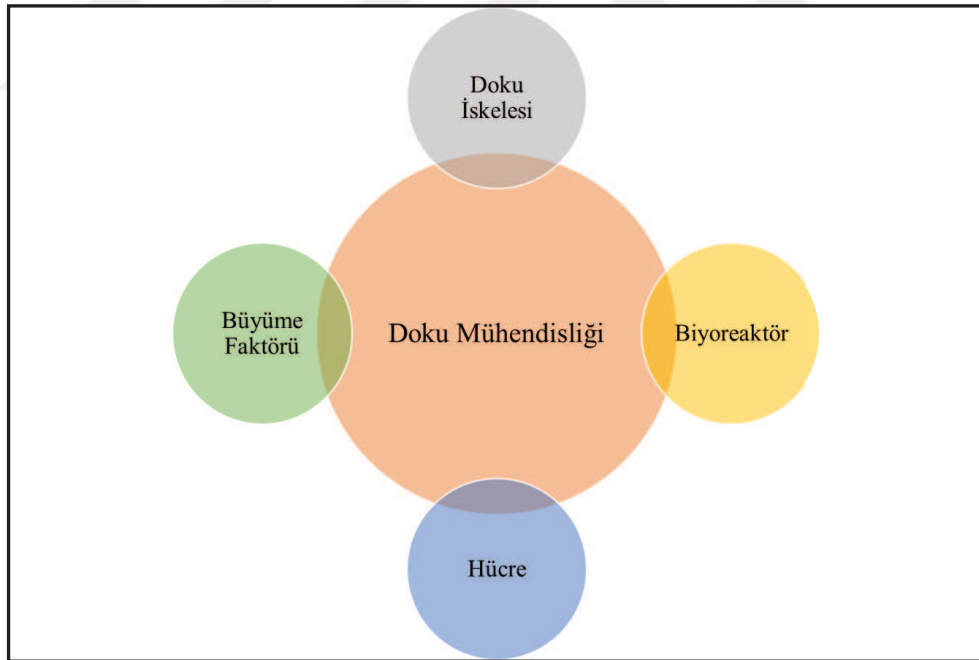
Polimerik doku iskeleleri üretim yöntemlerinden biri olan elektroğirme, hücre dışı matris (ECM)'i oluşturan fiberleri en iyi şekilde taklit edebilecek mikro ve nano ölçekte fiberler oluşturabilmesi, ayrıca elde edilen nanofiber membranların yüzey alanı ve gözenekliliği fazla olduğu için doku mühendisliğinde büyük kullanım potansiyeline sahiptir [4, 5]. Bunun yanında, biyoaktif bileşiklerin, sentetik polimerle nanofiberlerle birleştirilmesi ve proses sırasında yüksek sıcaklığın kullanılmaması, proteinler gibi bazı hassas bileşiklerin aktivitesini koruyabilmesi açısından avantaj sağlamaktadır.

Bu bilgiler ışığında bu çalışmada PCL'nin hücre tutunması açısından dezavantaj sağlayan hidrofobikliğinin protein katkısıyla yüzey kimyasının değiştirilerek azaltılabileceği düşünölmüştür. Bu nedenle, HEW proteini ile PCL'nin optimum oranda karıştırılıp elektro eğirme yöntemiyle nanofiber doku iskelesi üretilmesi ve bu yapıya karşı ASC'ler ile hücre sel tepkilerin değerlendirilip doku mühendisliğinde kullanım potansiyelinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Doku Mühendisliği

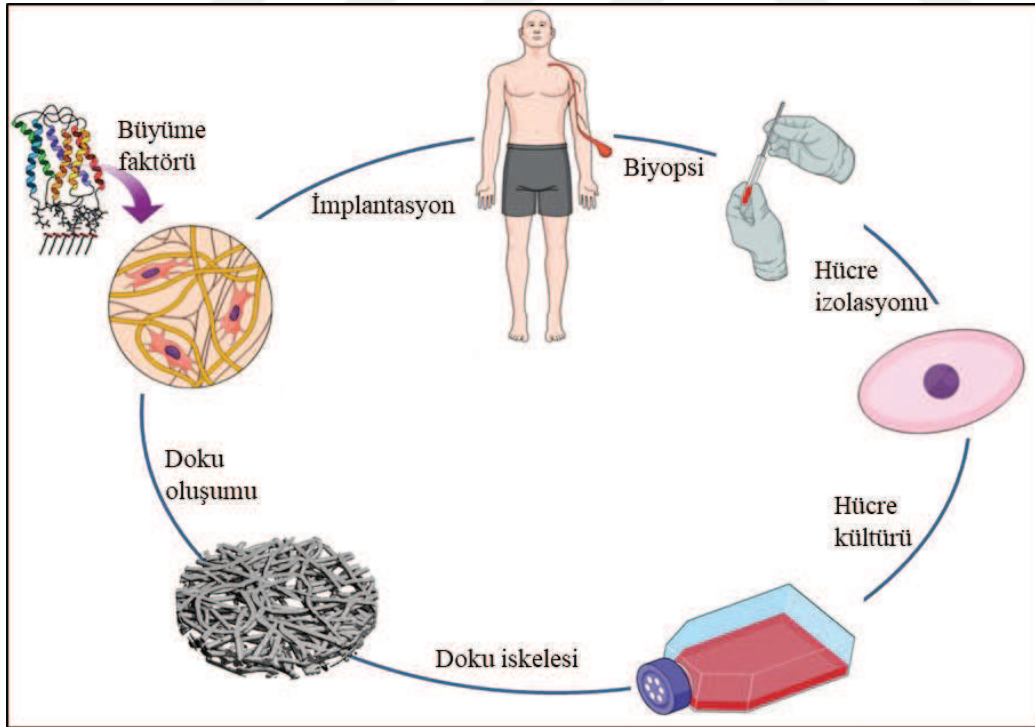
İlk olarak 1988 yılında Ulusal Bilim Vakfı çalıştayında (Kaliforniya, ABD) “Normal ve hastalıklı memeli dokularındaki yapı ve işlev ilişkisinin anlaşılması ile doku ve organ işlevinin yeniden kazandırılması, iyileştirilmesi veya artırılması amacıyla biyolojik ikame malzemelerin geliştirilmesine yönelik mühendislik ve yaşam bilimleri metotlarının uygulanması.” anlamına gelen “doku mühendisliği” kavramından söz edilmiştir. Doku mühendisliği genel anlamda; doğal dokunun mimari yapısını taklit ederek istenen hücre cevabı oluşturmak ve üç boyutlu (3B) dokuyu oluşturmak üzerine tıp, makine mühendisliği, malzeme bilimi ve yaşam bilimleri ile ilişkili multidisipliner bir çalışma alanıdır [1, 6].



Şekil 2.1: Doku mühendisliğinin temel bileşenleri.

Günümüzde doku hasarlarının tedavisi için otogreft, allogreft ve zenogreft uygulamalar gibi çeşitli geleneksel yaklaşımlar mevcuttur. Otogreftleme, hastanın sağlıklı bölgesinden alınan dokunun hasarlı bölgeye yerleştirilmesi işlemidir. İmmün

reaksiyona sebep olmaması avantaj sağlasa da sağlıklı dokunun alındığı bölgede hasar oluşması, birkaç defa cerrahi müdahale gerektirmesi ve yüksek maliyet gibi sınırlamaları mevcuttur [7]. Allogreftleme ise başka bireyden alınan sağlıklı dokunun, hasarlı bölgeye yerleştirilmesidir. Fakat bu işlemde viral hastalıkların taşınması, enfeksiyon oluşması ve doku reddi gibi riskler mevcuttur [8]. Zenogreftler, farklı türden alınan sağlıklı dokulardır. Zenogreftleme işleminde de patojenlerin aktarımı ve bağışıklık reddi gibi dezavantajlar mevcuttur [9]. Doku kayıplarında uygulanan bu tarz geleneksel yaklaşımlarda ortaya çıkan olumsuzluklar doku mühendisliği alanının gelişmesinde etkili olmuştur [10]. Doku mühendisliği, temelde dokunun fonksiyonunu veya yapısını biyomalzemeler, hücreler ve bazı uyarıcılar kullanarak yeniden oluşturma üzerine çalışmalar yürütür (Şekil 2.1). Özellikle, hücrelerin çeşitli doku iskeleleri üzerine ekilerek, vücuda implante edilebilir bir ürün oluşturulması stratejisi üzerine yoğunlaşır (Şekil 2.2). Doku kayıpları veya hasarlarına yönelik onarım ve yenileme teknikleri, *in vivo* olarak doku iskelesi implantasyonu ile veya biyoreaktörler içerisinde *in vivo* ortam koşulları taklit edilerek sağlanır [11, 12].



Şekil 2.2: Doku mühendisliği stratejisi.

2.2 Doku İskeleleri

Doku iskeleleri, hücrelerin üzerine tutunması, büyümesi ve istenen dokuyu oluşturmak üzere farklılaşması için yapısal destek görevi gören, üç boyutlu, gözenekli ve biyobozunur biyomalzemelerdir [13]. Doku iskeleleri, kullanılan malzemenin kimyasına (sentetik veya doğal polimerden oluşturulmuş olması vb.), geometrisine (gözenekli, jel veya ağısı), yapısına (gözeneklerin dağılımı ve aralarındaki bağlantı durumu vb.), mekanik özelliklerine (elastiklik, basma dayanımı vb.) ve bozunurluk durumlarına göre çeşitli şekillerde üretilirler [11, 14]. Doku iskelelerinin *in vivo* ortamda kalış süresi, uygulanacağı bölgeye ve fonksiyonuna göre belirlenir [15].

İnsan dokularında, kan hücreleri haricindeki hemen hemen bütün hücreler ECM içerisinde bir desteğe bağımlı olarak büyürler. İdeal bir doku iskelesinden, hedef dokunun ECM'sini fiziksel ve biyolojik anlamda tamamen veya büyük ölçüde taklit etmesi beklenir. Ancak ECM, dokuya özgü farklı bileşim ve biçime sahip olan bir yapıdadır ve dinamik doğasından dolayı tam olarak taklit edilmesi zordur [16]. Hedef dokunun ECM'sine en yakın özellikteki doku iskelesi üretilmesi için çeşitli tasarım parametreleri üzerinde düşünülmesi gerekmektedir (Çizelge 2.1). Tasarlanan doku iskelelerinin, hücrelerin malzemeye tutunup çoğalabilmesi için, ayrıca besinlerin ve atıkların doku iskelesi içinde transferi ve ECM oluşturulması için uygun gözeneklilik ve dolayısıyla yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip olması önemlidir [17]. Bunun yanı sıra gözenek boyutları da çok iyi ayarlanmış olmalıdır. Küçük gözenek boyutu, hücreler tarafından tıkanmaya yol açacak dolayısıyla penetrasyonu ve damarlaşmayı olumsuz etkileyecektir. *In vivo* koşullarda hücre ile kapiler damarlar arası mesafe 20 ile 200 μm arasındadır. Böylelikle difüzyon ile besin ve oksijen iletimi yeterli miktarlarda gerçekleşebilmektedir [18]. Ayrıca, kararlı sıcaklık ve pH koşulları, sabit oksijen ve besin kaynağı, hücre ekilmiş yapılar için önemli faktörlerdir [19].

Çizelge 2.1: İstenen doku iskelesi fonksiyonu için tasarım parametreleri [17].

Doku İskelesi Fonksiyonu	Tasarım Parametreleri
<i>In vivo</i> ortamda enflamasyona veya toksik etkiye sebep olmamalıdır.	Malzeme biyouyumlu olmalı, toksik ve kanserojen olmamalıdır.
Yeni dokuların oluşmasına yardımcı olmalıdır.	Dokuya uygun 3B şekilde tasarlanmalı ve üretilmelidir.
Tek tip hücre sel yoğunluğa sahip olmalıdır.	Uygun gözeneklilik ve gözeneler arasında bağlantı içermelidir.
Hücre tutunması, çoğalması veya farklılaşması için uygun yüzeye sahip olmalıdır.	Polimer yüzeyinin fiziksel ve kimyasal özellikleri optimize edilmelidir.
Doku oluşumunu sağlayacak olan hücre çoğalması ve göçüne olanak vermelidir.	Uygun gözeneklilik, optimum gözenek boyutu ve gözenekler arası bağlantılara sahip olmalıdır
Hücreler için ECM veya yeni dokuya dönüşmesini sağlamalıdır.	Doku iskelesinde doğru yönlendirilmiş fiberlere sahip olmalıdır.
Besinlerin ve atıkların iskeleye giriş-çıkışını sağlamalıdır.	Uygun gözeneklilik ve gözenekler arası bağlantılara sahip olmalıdır.
İskelenin bozunması ve yerine yeni dokunun geçmesine olanak vermelidir.	Bozunma ürünleri toksik ve kanserojen olmamalıdır. Bozunma hızı ve doku oluşma hızı uyumlu olmalıdır.
<i>In vivo</i> ortamda yapısal bütünlüğün devamlılığı ve yeni dokuyu desteklemek için yeterli mekanik güce sahip, <i>in vivo</i> etkilere dayanıklı olmalıdır.	Doku iskelesi, hedef doku ile aynı özelliklere sahip olmalıdır.

Doku iskeleleri oluşturulurken genellikle Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı, biyouyumlu ve biyobozunur malzemeler kullanılmaktadır [14]. Hücreler kendi ECM'sini oluşturmaya başladıklarında eş zamanlı olarak doku iskelesinin bozunması gerekmektedir. Bu sebeple doku iskelesinin biyobozunur bir malzemedan üretilmesi, yani vücut ortamında parçalanabilir özellikte olması ve parçalanırken toksik yan ürünler oluşturmaması gerekmektedir [20]. Biyouyumlu olma özelliğine sahip malzemeler arasında metal, seramik ve polimer (doğal veya sentetik) malzemeler veya bunların birleşimleri gösterilebilir. Ancak metallerin ve birçok seramik malzemenin biyobozunur olmaması ve işleyiş zorluğu açısından doku iskelesi yapımında kullanımında kısıtlamalar söz konusudur. Kimyasal bağlarının vücut sıvısı ortamında hidrolize uğraması veya hücresel ve enzimatik yollarla bozunabilme özelliklerine sahip olmalarından dolayı doku iskelesi yapılırken malzeme olarak genelde biyopolimerler kullanılır [21, 22]. Burada önemli nokta, uygulanacak dokuya göre istenen doku iskelesi tasarımının yapılabileceği uygun biyopolimerin seçilmesidir.

İdeal polimerik doku iskelelerinin sahip olması gereken özellikler şu şekilde sıralanabilir:

- Dokuya özgü istenen şekil ve mekanik özelliklere sahip 3B yapıya sahip olmalı,
- Uygun gözeneklilik ve gözenekler arasında hücre çoğalmasına ve doku oluşumuna yardımcı olacak bağlantılara sahip olmalı,
- Malzemenin yüzeyi ve bozunma ürünleri inflamatuvar yanıtı sebep olmayacak biyouyumlu kimyasal yapıya sahip olmalı,
- Hücre yapışmasını ve işlevini artırıcı yüzey kimyasına sahip olmalı,
- Uygulandığı bölgede yeni doku oluşana kadar destek sağlayacak şekilde bozunma hızı ayarlanabilir olmalıdır [23].

Doku iskelesi, hücre tutunması için destek sağlamanın yanısıra ilaç veya biyomolekül taşınımı için de kullanılan bir yapıdır. Bu yapı sayesinde aynı zamanda uzun dönemde sürekli bir ilaç veya biyomolekül salımı gerçekleştirerek iyileşmeyi hızlandırmak da mümkün olabilmektedir [24].

2.2.1 Doku iskelesi oluşturma yöntemleri

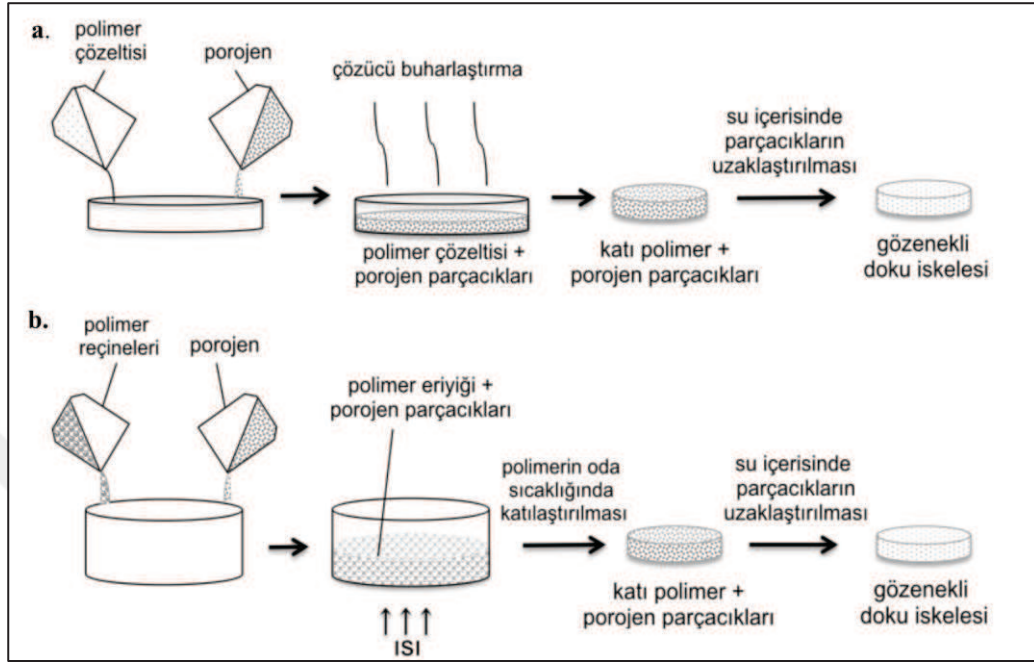
Doku iskelesi oluşturmanın amacı; temel olarak c boyutlu ECM yapısını taklit etmek ve hücrelerin c boyutlu ortamda çoğalıp farklılaşarak kendi ECM'lerini oluşturmalarını sağlamaktır. Doku iskelesi üretilirken, hedef dokunun yapısal özelliklerine ve fonksiyonuna göre malzeme ve üretim yöntemi seçilmelidir. Seçilen yöntem ve malzeme; doku iskelesinin yüzey özelliklerini, mekanik özelliklerini, 3B yapısını, gözeneklilik ve gözenek boyutu gibi özelliklerini belirler [17]. Uygun gözeneklilik ve gözenekler arası bağlantıların olması, hücre tutunması ve doku iskelesi içerisinde yayılması için istenen bir özelliktir. Azami sayıda hücre tutunabilmesi ve g edebilmesi için yüzey alanının büyük olması gerekmektedir.

Polimerik doku iskeleleri üretilirken, polimerlerin camsı geçiş sıcaklıkları (T_g) veya erime sıcaklıkları (T_m) sıcaklıkları üzerindeki viskoz davranışları ve çeşitli organik çözücülerde çözünürlükleri gibi özellikleri kullanılacak üretim yöntemini etkiler [25]. Doğal ve sentetik polimerik malzemelerden doku iskelesi üretmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Her yöntemin avantaj ve dezavantajları olmasına rağmen hiçbir yöntem bütün dokular için en ideali değildir. En sık kullanılan yöntemler arasında dondurarak kurutma, gaz köpükleştirme, faz ayırımı, süperkritik akışkan teknolojisi, eriyik kalıplama tekniği, 3B yazıcı teknolojisi ve elektroēirme sayılabilir [26].

2.2.1.1 Çözücü dökme/ Parçacık uzaklaştırma

Bu yöntemde; tuz, şeker, parafin ve jelatin gibi zneabilen porojenler gözenek oluşturmak üzere kullanılır. Porojenler, istenen gözenek boyutuna göre seçilir ve istenen şekildeki bir kalıba konur. Ardından polimer çözeltisi kalıba dökülerek evaporasyonla çözücü uzaklaştırılır (şekil 2.3.a). Bu işlem, polimer reçineleri kullanarak da yapılabilir (şekil 2.3.b). Tuz, şeker ve jelatin kalıntıları su kullanılarak, parafin ise hekzan kullanılarak çözdürülüp uzaklaştırıldıktan sonra gözenekli yapı elde edilir [10]. Uygulanması kolay bir yöntem olmasına rağmen gözenekler arasındaki bağlantıların tam olarak sağlanamaması ve toksik olabilen çözücülerin yapıda artık olarak kalabilmesi dezavantaj olmaktadır. Süperkritik karbondioksit gibi yöntemlerin birlikte kullanılması durumunda gözenekler arası bağlantıların arttırılması mümkün olabildiği literatürde gösterilmiştir [27]. Bunun yanı sıra, bu yöntemde kullanılan toksik çözücüler hücre yapışmasını ve canlılığını

olumsuz etkilemektedir. Son çalışmalar, bu teknikte düşük toksisitede çözücülerin kullanılabilceğini ve kalıntıların uygulamada kabul edilebilir bir seviyeye azaltılabileceğini göstermiştir [27].



Şekil 2.3: Parçacık uzaklaştırma yöntemi ile doku iskelesi oluşturulması a. polimer çözeltilerinden, b. polimer reçinelerinden [28].

2.2.1.2 Dondurarak kurutma/ Emülsiyonlaştırma

Dondurarak kurutma (liyofilizasyon) tekniğinde polimerler uygun bir çözücüde (genellikle su) istenen konsantrasyonda çözüldükten sonra dondurulur ve yüksek vakum altında düşük sıcaklıklarda süblimeşen çözücünün uzaklaşmasıyla mikro-gözenekli sünger formunda bir iskele oluşur [22]. Bu yöntemle gözenek boyutu dondurma hızı ve pH ile kontrol edilebilmektedir. Hızlı bir dondurma ile daha küçük gözenekler sağlanabilmektedir [10]. Yüksek sıcaklık ve tanecik uzaklaştırma gibi fazladan işlem gerektirmemesi gibi avantajlarının yanında, gözeneklerin kapalı, çapları küçük ve düzensiz olması ve proses süresinin fazlalığı gibi dezavantajları da mevcuttur [29]. Emülsiyonlaştırma yöntemi ile de polimer çözeltisine su eklenerek emülsiyon oluşturulur ve benzer şekilde doku iskelesi üretilir [30].

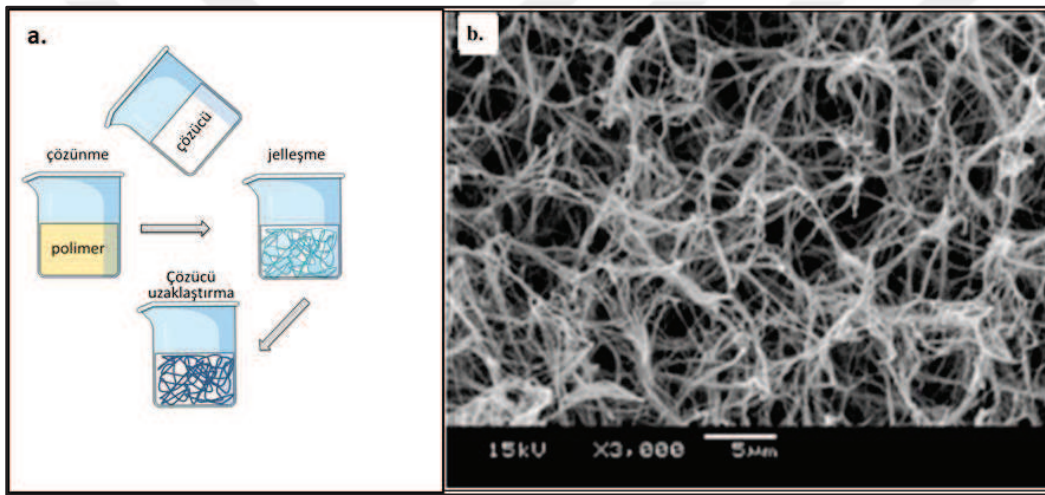
2.2.1.3 Gaz köpükleştirme

Bu teknikte çözülmüş polimer ile yüksek basınçta (800 psi) CO₂ gazı kullanılarak, gaz moleküllerinin köpürmesi sonucunda gözenekli yapıda doku iskeleleri

oluşturulur [10]. Bu gözenekler polimerin hacminde önemli miktarda genişlemeye ve yoğunluğunda azalmaya sebep olur.

Doku iskelesi oluşturma yöntemlerinin pek çoğunda organik çözücü ve yüksek sıcaklık kullanılması sonucunda çıkan kalıntılar hücrelerde hasara sebep olurken, bu yöntemle oluşturulan doku iskelelerinde organik çözücü ve yüksek sıcaklık kullanılmaması avantaj sağlamaktadır [10]. Ayrıca gözenekler arasında içsel bağlantılar bulunması da bu yöntemin avantajlarından bir diğeridir. Doku iskelelerinin gözenekliliği, polimer içinde çözülmüş gaz miktarı ile doğrudan ilişkilidir [23].

2.2.1.4 Faz ayrımı



Şekil 2.4: a.Faz ayrımı tekniği gösterimi. b.Faz ayrımı tekniği ile üretilen doku iskelesinin SEM görüntüsü [32].

Faz ayrımı; termal yolla faz ayrımı (TIPS) ve çözücü ile faz ayrımı (SIPS) olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilebilir. SIPS yönteminde, polimer çözeltisi bir kaba konulur ardından polimerin çözücüsünü çözebilen başka bir sıvı daha kaba eklenir. Bu iki sıvının temasıyla faz ayrımı gerçekleşir (Şekil2.4). Böylece polimerce zengin fazda gözenekli bir yapı oluşmuş olur. TIPS yönteminde ise çözücüsüne biyolojik olarak aktif moleküller eklenir. Bu çözelti kontrollü olarak soğutulur likit-likit faz ayrımı gerçekleşir ve ardından iki katı oluşması için su ile muamele edilir. Katılaştıran çözücü süblimasyonla uzaklaştırıldıktan sonra biyoaktif moleküller içeren gözenekli doku iskeleleri elde edilmiş olur [10].

Faz ayırma yöntemi, basit bir yöntem olmasına rağmen kullanılabilen çözücü kombinasyonu azlığı, yıkama için fazladan adım gerektirmesi ve yapıda çözücü artıklarının kalması gibi dezavantajları bulunmaktadır [30].

2.2.1.5 Eriyik kalıplama tekniği

Bu yöntemde, teflon kalıba alınan polimer, T_g üzerindeki sıcaklıklara ısıtılır, içerisine porojen görevi yapacak partiküller karıştırılarak sabit basınç altında sıkıştırılır. Kalıptan çıkarılan polimer, yapıdaki partiküllerin çözünmesi sağlanarak uzaklaştırılması için su ile yıkanır. Böylece gözenekli yapıda ve kalıbın şeklinde doku iskelesi oluşur. Bu yöntemde organik çözücüler kullanılmamaktadır ve kalıbın değiştirilmesiyle istenilen şekilde doku iskeleleri üretilebilmektedir. Ayrıca farklı çaplarda porojenler kullanılarak por boyutu değiştirilebilmektedir. Ancak eriyik kalıplama yöntemi yalnızca termoplastik polimerlere uygulanabilmektedir [27, 31]. Bu yöntemin diğer bir dezavantajı ise özellikle doku iskelesinin en iç bölümlerinde kalan partiküllerin uzaklaştırılmasının zor olması ve çok uzun zaman alabilmesidir.

2.2.1.6 Katı serbest form fabrikasyonu

Katı serbest form fabrikasyonu yöntemi klasik üretim metotları kullanılarak üretilemeyen hassas geometrilerdeki doku iskelelerinin oluşturulmasını sağlar. Bilgisayar destekli tasarım/üretim (CAD/CAM), bilgisayarlı tomografi (CT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) verilerini kullanarak 3B yapı oluşturur. Bu teknik direkt fabrikasyon ve indirekt fabrikasyon olmak üzere iki çeşittir. Direkt fabrikasyon tekniğinde malzemenin direkt olarak yapı iskelesi inşa edilirken; indirekt fabrikasyon tekniğinde biyomalzemenin döküleceği bir kalıp inşa edilir. Ölçülebilirlik, yeniden üretilebilirlik ve uygulanabilirlik açısından direkt fabrikasyon tekniği tercih edilmektedir ve neredeyse tamamen otomatik bir işlemdir. İndirekt fabrikasyon tekniğinde ise daha geniş bir malzeme yelpazesi ile çalışabilmek mümkündür ama çoğunlukla daha fazla işlem gerektirir ve ticari olarak düşünüldüğünde talepleri karşılamada yetersiz kalabilir [27, 32].

2.2.1.7 Elektroegirme

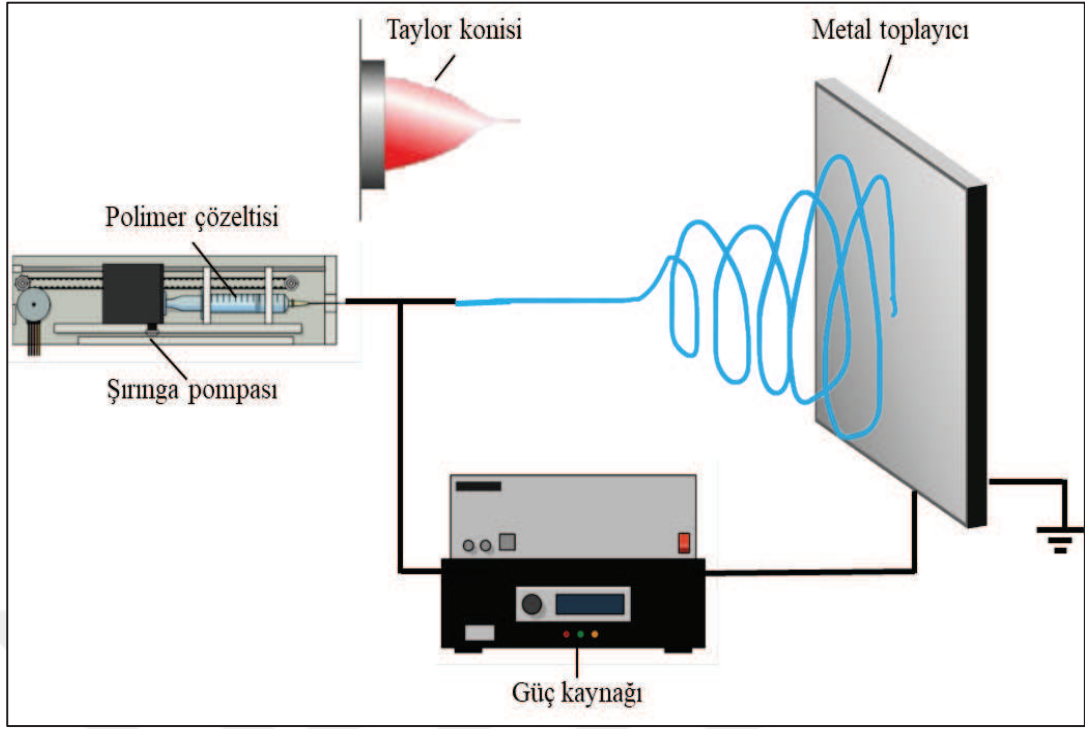
Nanofiber üretim yöntemi olarak elektrostatik kuvvetlerin kullanılması ilk kez 1934 yılında patentlenmiştir. Bu yöntem, elektro egirme olarak bilinir ve besleme ünitesindeki polimer çözeltisi ile metal toplayıcının yüksek voltaj uygulanarak zıt elektrik yükü ile yüklenmesine dayanır. Burada, polimer çözeltisine yüksek elektrik akımı uygulanarak çözeltinin yüzey özelliklerinin değiştirilmesi ve böylece nano veya mikro boyutlarda fiberler elde edilerek zıt yükü yüklenmiş veya topraklanmış bir yüzeyde toplanması sağlanır [33].

Çeşitli işleme teknikleri arasında, elektroegirme, oluşturulan nanofiberlerin doğal ECM'nin fibriller bileşenine benzer yapısal özellikleri nedeniyle, doku mühendisliği için yapı iskelelerinin imalatında büyük ilgi görmüştür. Elektroegirme yöntemiyle nanofiberler düşük maliyetle ve basit biçimde üretilebilmektedir. Üstelik biyoaktif bileşiklerin nanofiberlerle birleştirilmesinin kolaylığı ile protein bazlı materyallerin üretilmesine olanak sağlamaktadır. Buna ek olarak, proses sırasında yüksek sıcaklığın kullanılmaması, proteinler gibi bazı hassas bileşiklerin aktivitesini koruyabilmesi açısından da avantaj sağlamaktadır. Buna rağmen, dengeli olmayan jet oluşumu ve fiber oluşumu ile yapısını önemli oranda etkileyen birçok parametrenin bulunması gibi dezavantajları da mevcuttur [1, 34, 35].

Bir elektroegirme düzeneğinde temel olarak 4 ana ekipman bulunur (Şekil 2.5).

Bu ekipmalar;

- Besleme ünitesi (şırınga, iğne vs.)
- Yüksek voltaj güç kaynağı
- Nanofiberlerin toplanması için karşıt yükü yüklenmiş toplayıcı (plaka, silindir vs.)
- Sıvı formda viskoz polimer çözelti

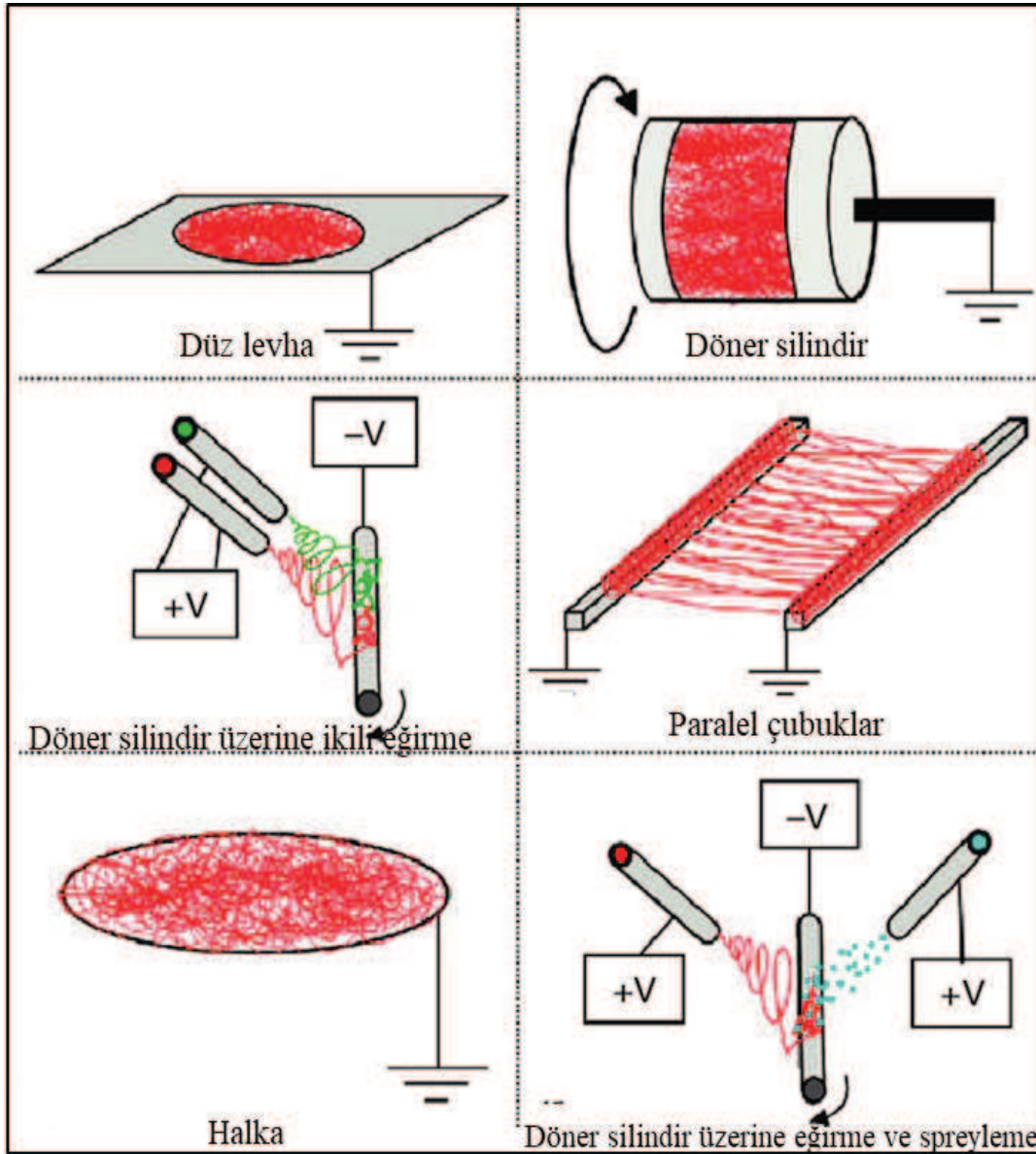


Şekil 2.5: Elektroğirme tekniği gösterimi [29].

Elektroğirme sistemi şu şekilde çalışmaktadır: Polimer çözeltisi şırıngaya çekilir. Pompa belirlenen hızda çalıştırılır ve polimer çözeltisi iğne ucundan damlamaya başlar. Şırınga pompası, işlem süresince çözeltinin sabit hızla akmasını sağlar. İğnenin ucundaki polimer çözeltisinin jet oluşturabilmesi için yüksek enerjiye ihtiyacı vardır. Bu sebeple iğneye yüksek voltaj güç kaynağı kullanılarak 1-30 kV arasında elektrik uygulanır ve iğne ucundaki polimer damlacıkları elektrikle yüklenir. Polimer çözeltisi ve topraklanmış toplayıcı arasında oluşan zıt yük nedeniyle iğne ucunda asılı duran damlacığın yuvarlak ucu Taylor konisi adı verilen bir koni şeklini alır. İğne ucu ile toplayıcı arasında oluşan elektrik alan kuvveti, çözeltinin yüzey gerilimini aştığında Taylor konisinden fiber oluşmaya başlar. Fiber, toplayıcıya doğru önce kararlı, sonrasında kararsız (spiral) bir hareket oluşturur. Bu sırada polimer çözeltisindeki çözücü buharlaşır ve katı haldeki fiberler toplayıcıda birikerek nanofiber membran oluşturur [36, 37].

Elektroğirme düzeneği pek çok parametre ile kontrol edilir ve her bir parametre fiber çapı ve morfolojisini etkilemektedir. Elektro eğirme yöntemi ile oluşturulacak doku iskelelerinde fiber çapı önemli bir faktördür, çünkü substrat yüzeyi hücre şeklini, büyümesini ve fonksiyonunu etkiler [3, 38]. Yapılan her çalışma için proses parametreleri optimize edilmelidir. İstenen fiber yapısına ve uygulamaya bağlı olarak toplayıcı şekilleri (düz plaka, döner silindir, paralel elektrot vb.) çeşitlilik gösterebilir

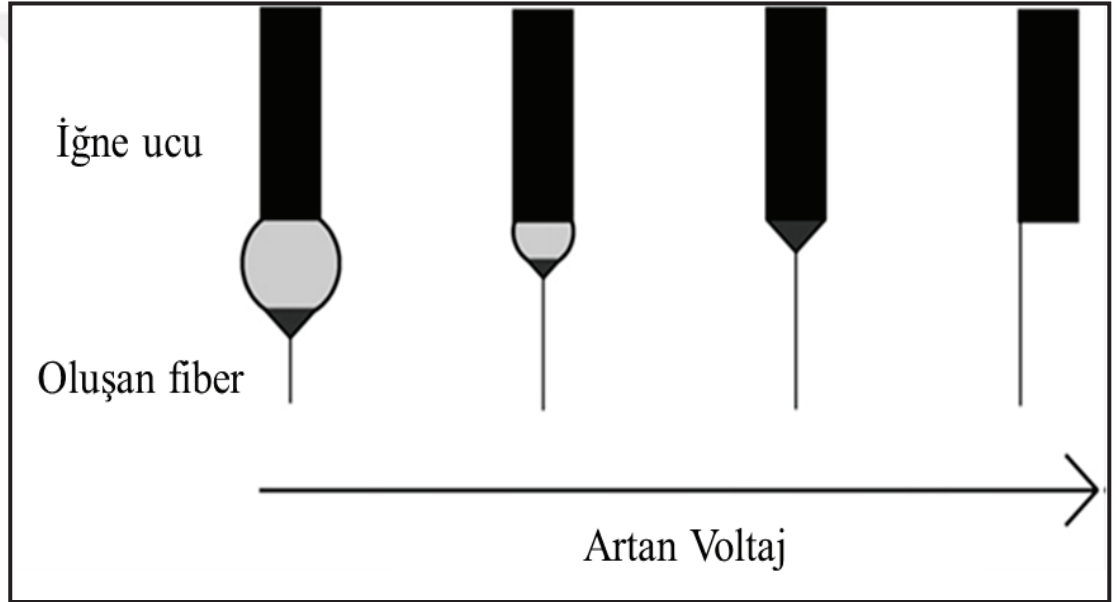
(Şekil 2.6). Düz plaka şeklindeki toplayıcı kullanıldığında rastgele düzenlenmiş fiberler elde edilirken, döner silindir şeklinde toplayıcı kullanılarak yönlendirilmiş fiberler elde edilir. Döner silindirin hızı, yönlendirme derecesini belirlemek için optimize edilmesi gereken bir parametredir. Toplayıcı olarak iletken olmayan malzemeler de kullanılabilir ve bu durumda çözeltiyle gelen fazla yükün uzaklaştırılmaması ve dolayısıyla fiberlerin birbirini itmesi sonucunda daha büyük gözenek çapı elde edilir [39].



Şekil 2.6: Elektro eğirme işleminde kullanılan bazı toplayıcı çeşitleri.

Elektro eğirme proses parametreleri;

- Uygulanan voltaj: Fiber oluşumu, voltaj değeri belli bir eşik değerin üzerine çıktığında gözlenir. Düşük voltajlarda, iğne ucunda bir çözelti damlacığı ve damlacığın ucunda Taylor konisi oluşur. Voltaj arttıkça damlacık küçölerek Taylor konisi iğne ucunda oluşmaya başlar. Voltaj biraz daha arttırılırsa Taylor konisi kaybolur ve iğne ucundan fiber çıktığı gözlenir (şekil 2.7) [37]. Bu durumda toplayıcıdaki fiberlerde boncuk oluşumu gözlenebilir. Fiberlerde boncuk oluşmaması veya fiber çapının azalması, uygulanan voltaj değerinin kullanılan çözeltiye ve çözelti konsantrasyonuna göre optimize edilmesini gerektirmektedir [40].



şekil 2.7: Elektroğirme düzeneğinde artan voltaj ile taylor konisi ilişkisi [37].

- Akış hızı: Fiberlerin çapını, porozitesini ve şeklini etkilemektedir. Akış hızının artması sonucunda gözenek çaplarının ve fiber çaplarının arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca hız arttırıldığında, oluşan fiberlerin toplayıcıya ulaşmadan önce kuruma zamanının yeterli olmaması sonucunda fiberler üzerinde boncuk oluştuğu grölümüştür [41].
- İğne ucu-toplayıcı mesafesi: Fiberlerin, toplayıcıya ulaşmadan önce kurumaları için yeterli zamanı sağlayan minimum mesafe sağlanmalıdır aksi taktirde boncuklu yapıda fiberler oluşur. Bunun dışında, mesafenin artmasıyla fiber çapının azaldığı gözlenmiştir [41].

- Çözelti konsantrasyonu: Çok seyreltik çözeltilerde polimerik fiber toplayıcıya ulaşmadan yüzey geriliminin etkisiyle kopar, çok yoğun çözeltilerde yüksek viskoziteden ve polimer zincir dolaşıklıklarından dolayı iğne içerisindeki çözeltinin akış hızının kontrolü zorlaşır ve fiber oluşumu gözlenmez. Optimal şartlarda konsantrasyon arttıkça fiber çapı artar [37].
- Polimerin molekül ağırlığı: Molekül ağırlığı polimerin viskozite, yüzey gerilimi, iletkenlik ve dielektrik kuvveti gibi birçok reolojik ve elektriksel özelliğini etkilediği için molekül ağırlığı, fiber morfolojisi üzerine etkili olan önemli bir parametredir. Polimerin molekül ağırlığı, çözeltideki polimer zincirlerin birbirine dolanması dolayısıyla çözelti viskozitesini belirler. Bunun için düşük polimer konsantrasyonlarında bile, Poly-L-laktik asit (PLLA, yüksek molekül ağırlıklı) gibi polimerler yeterli zincir dolanmasını sağlayabilir ve uniform jet elde edebilmek için yeterli olan viskozite seviyesi sağlanmış olur.
- Çözelti yüzey gerilimi: Yüksek yüzey gerilimi, elektroğirme işlemini stabil olmayan jet oluşumu ve damlacıkların oluşması nedeniyle zorlaştırmaktadır.
- Çözücü seçimi: Kapiller ve kolektör arasında yeterli çözücü buharlaşmasının sağlanabilmesi için mutlaka etanol, metanol, kloroform, aseton, dimetil formamit, dimetil sülfoksit, dimetil asetamit ve hekzafloro-2-propanol (HFIP) gibi uçucu çözücüler, bu çözücülerin birbirleri ile karışımları ya da bu çözücülerin sulu karışımları kullanılmalıdır.
- Çözeltinin iletkenliği: Çözeltinin elektrik iletkenliğinin artışı ile elektroğirilmiş nanofiber çapında önemli bir düşüş gerçekleşir. İletkenliği düşük çözeltilerde ise jetin yetersiz uzanımı sonucu boncuklar görülebilir.

Elektro eğirme yönteminde doğal ve sentetik polimerler veya polimer karışımları kullanılmaktadır. PCL, PLLA, polietilenglikol (PEG), poli (D,L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) en fazla kullanılan polimerlerdir [36, 37].

2.3 Doku Mühendisliğinde Kullanılan Polimerler

Doku mühendisliği uygulamalarına yönelik üretilen biyomalzemelerin amacı, işlevini yitirmiş veya hastalıklı dokuları eski haline getirmek için kullanılabilecek yapay malzemeler geliştirmek ve böylece yaşam kalitesini iyileştirmektir. Doku

iskeleleri oluşturulurken mukavemet, gözeneklilik, şekil gibi optimize edilmesi gereken özellikler, polimerik malzemelerde daha iyi kontrol edilebilir [11]. Doku iskelesi malzemesi olarak çeşitli doğal ve sentetik polimerler kullanılmaktadır. Kaynakları ve elde ediliş biçimleri birbirinden oldukça farklı olan bu iki malzeme grubunu birbirinden ayıran en önemli özelliklerden biri biyobozunma davranışlarıdır. Doğal polimerler fizyolojik ortamda kolaylıkla bozunurken, sentetik polimerlerin bozunma süreleri doğal polimerlere göre çok daha uzundur [20]. Bunun dışında kullanılan malzemeler biyouyumlu ve hücre tutunmasına olanak sağlayabilecek yapıda olmalıdır [23].

2.3.1 Doğal polimerler

Protein ve polisakkarit yapısındaki doğal polimerlerin biyouyumlu olması, kolay işlenebilir olması, ECM'yi daha iyi taklit edebilmesi ve hücre reseptörleri ile etkileşebilecek bağlanma bölgelerine sahip olması gibi özellikleri onlara avantaj sağlamaktadır [42]. Fakat kaynak sıkıntısı, pahalı olması, çapraz kontaminasyona elverişli olması ve parti varyasyonu (batch to batch variation) gibi dezavantajları mevcuttur [24]. Aljinat, kolajen, jelâtin, fibrinler, albumin, gluten, elastin, fibroin, hyarulonik asit, selüloz, nişasta, kitosan, pektin (pektinik asit), galaktan, kurdlan, gellan, levan, emulsan, dekstran, pullulan, heparin, ipek, kondroitin 6-sülfat, polihidroksialkonoatlar doku mühendisliğinde kullanılan doğal polimerlerdir.

2.3.2 Sentetik polimerler

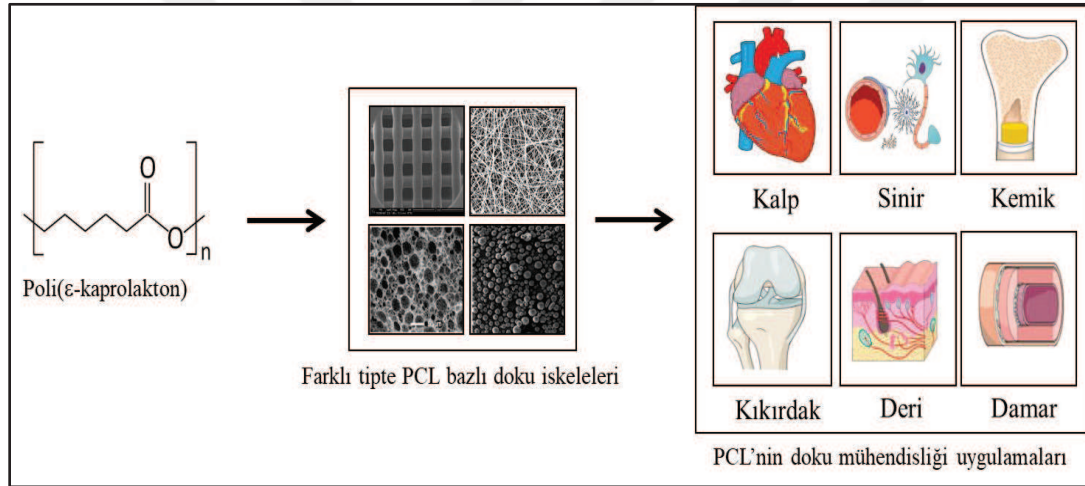
Sentetik polimerlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri ve kalitesi daha iyi kontrol edilebilir ayrıca immünojeniteye sebep olmazlar. Çeşitli tekniklerle işlenebilirler ve kaynak sıkıntısı yoktur sürekli olarak fazla miktarlarda tedarik edilebilirler [24]. Fakat sağladığı pek çok avantaja rağmen, hücrelerin biyolojik işlevlerini uyaracak özellikte değildir. Bu nedenle sentetik doku iskeleleri, çeşitli katkıları kullanılarak ve modifikasyonlar yapılarak biyoaktif hale getirilebilmektedir veya iki veya daha fazla farklı biyomalzemenin birleştirilmesi ile oluşturulan kompozit doku iskeleleri de tercih edilmektedir [43].

Sentetik polimerler genel olarak biyobozunur sentetik polimerler ve biyobozunur olmayan sentetik polimerler olarak ikiye ayrılırlar. Sentetik biyobozunur polimerler, immünojenik cevabı en aza indirmesi ve doğal dokunun tamamen oluşmasını sağlayabilmeleri açısından doku iskelesi üretiminde tercih edilirler. Sentetik

biyobozunur polimerlere örnek olarak polilaktik asit (PLA), polilaktat-ko-glikolat, PCL, poliglikolat, polipropilen fumarat, polisiyano akrilat ve biyobozunur poliüretan gibi polimerler gösterilebilir. Polihidroksi metakrilat, polivinil alkol, poli-N-izopropil akrilamit gibi polimerler biyobozunur olmayan sentetik polimerlere örnek olarak gösterilebilir [44].

2.3.2.1 Poli(ϵ -kaprolakton)

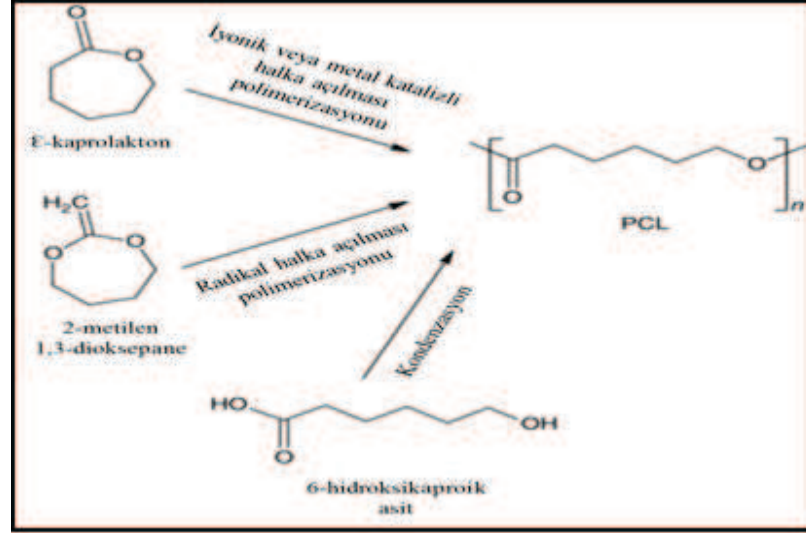
PCL, sentetik ve biyobozunur olmasının yanında düşük maliyetli, toksik özellik göstermeyen, iyi mekanik özelliklere sahip alifatik, FDA onaylı bir poliesterdir. Yarı- kristalin yapısı ve düşük erime noktası, çeşitli şekil ve formlarda doku iskelesi üretimine olanak sağlamaktadır (Şekil 2.8). Ancak hidrofobik olması yüzünden hücre tutunmasının ve yayılmasının zorlaşması gibi bir dezavantajı mevcuttur [45, 46].



Şekil 2.8: PCL'nin doku mühendisliği uygulamaları.

Yapısı ve kullanım alanları

PCL, heksanoat tekrar birimlerinden oluşan, alifatik poliesterler sınıfına dahil bir polimerdir. PCL, ϵ -kaprolakton siklik monomerinin iyonik ve metal katalizörlü halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenir ancak birçok çalışmada 2-metilen-1,3-dioxepan'ın radikal halka açma polimerizasyonu ve 6-hidroksi kaproik asidin kondenzasyonu ile sentezlenmektedir (Şekil 2.9) [48].



Şekil 2.9:PCL sentez mekanizmaları.

Biyobozunurluğu

PCL, doğal hücre dışı matris üretmek üzere hazırlanan doku iskelelerinde 3B hücre kültürünü desteklemek amacıyla doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır [49]. Doku mühendisliği uygulamaları için PCL'nin biyobozunurluğu önemli bir olgudur.

PCL, polimer ana zinciri hidrolize olabilen ester bağlantılarına sahip olduğundan esteraz ve bazı lipaz türü enzimler ile mikroorganizmalar (bakteri ve mantarlar) tarafından parçalanabilir [50]. PCL'nin morfolojisine, molekül ağırlığına ve kristallik derecesine göre bozunma süresi değişkenlik gösterebilir [51]. PCL, ester bağlarının hidrolitik yıkımıyla önce amorf fazlarda sonra kristalin fazlarda bozunmaya uğrar. Bu bozunma işlemi, hidroliz sonucu oluşan karboksilik asit ile veya enzimler tarafından katalizlenir [52]. PCL'nin ana zincirinin, diğer monomerlerle kopolimerizasyonu ile modifikasyonu sonucunda bozunma mekanizmasının ve kinetiğinin değişebildiği bilinmektedir. Hidrofilik monomerlerin eklenmesi, PCL bloklarının kristal yapısını bozar böylece daha hızlı su difüzyonu olur ve yüksek bozunma oranları elde edilir [53]. Örneğin; PCL'nin polietilen oksit (PEO) ile kopolimerinin biyobozunma hızı, homopolimer bloğunun uzunluğuna ve polimerin tümüne göre oranına bağlıdır. PCL içeriği arttıkça bozunma hızı düşerken; uzun PEO segmentleri bozunma hızını artırır [54]. Bunun dışında PLA/PCL/PLA kopolimerinin, PLA ve PCL'den daha hızlı bozunduğu gösterilmiştir [55]. PCL için bu tip karışım veya kompozit teknolojileri, biyomedikal uygulamalar veya ambalaj sanayinde sıklıkla kullanılmaktadır [56].

Fiziksel özellikleri

PCL, hidrofobik ve yarı kristalin bir polimerdir. Düşük T_m değerine sahip olması ve karışım yapılabirliği açısından biyomedikal alanda fazlaca kullanımı mevcuttur.

Çizelge 2.2: PCL'nin fizikokimyasal özellikleri [47].

Yoğunluk ($\rho/g.cm^{-3}$)	1.11
Ortalama Molekül Ağırlığı ($M_n/g.mol^{-1}$)	530-630000
Erime noktası(T_m) ve Camsı Geçiş Sıcaklığı (T_g)	$T_m=65^\circ C$ $T_g= -65^\circ C$ 'den $-61^\circ C$ 'ye kadar
Kristalinite (%)	67
Modulus (MPa)	190
Kopma Uzaması (%)	>500
Maksimum çekme gerilimi (MPa)	14
Su geçirgenliği ($g/m^2.gün$) ($25^\circ C$ 'de)	177
Yüzey gerilimi (g)	51
Çözünürlük	-Benzen, kloroform, diklorometan (DCM) ve toluende oda sıcaklığında çok iyi çözünür. -Aseton, 2-bütanon, dimetilformamid (DMF) ve asetonitrilde az çözünür. - Su, alkol ve dietil eterde çözünmez.

PCL, kemik ve kardiyovasküler doku mühendisliği çalışmalarında, sinir rejenerasyonu çalışmalarında ve medikal uygulamalar için yara örtü malzemeleri ve cerrahi dikişlerde başarıyla kullanılmıştır. Terapötik moleküllerin (örneğin, ilaç, protein, gen) kontrollü salınımı için kullanımı da araştırılmıştır [49].

Doğal protein ve polimer içeren hibrit doku iskelelerinin üretimi biyolojik ve mekanik özelliklerin beraber iyileştirilmesine olanak tanır. Çeşitli çalışmalar farklı sentetik ve doğal polimerik karışımların nanofiber oluşturma potansiyellerini araştırmaktadır. Protein bazlı biyomalzemeler doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle kolajen, elastin, jelatin ve ipek fibroini farklı biyomedikal uygulamalar için PCL ile birlikte kompozit matrisler oluşturmak için kullanıldığı pek

çok uygulama literatürde mevcuttur. Örneğin, elektroğirme yöntemiyle üretilmiş PCL/jelatin doku iskeleleri vasküler doku uygulamaları ve kemik rejenerasyonu uygulamaları için önerilmektedir. Kollajen ve elastin kullanılarak oluşturulan PCL/protein nanofiberlerin de hücresel yanıtı arttırdığı bilinmektedir [57-59].

2.4 Yumurta Beyazı Proteinleri

Genel olarak, bir yumurtanın % 9-11'i yumurta kabuğu, %60-63'ü yumurta beyazı, %28-29'u yumurta sarısıdır. Yumurta beyazı, farklı molekül ağırlıklarına, izoelektrik noktaya ve konsantrasyonlara sahip 100'den fazla çözünmüş proteine sahiptir ve bu proteinler yumurtadaki toplam proteinin %50'sini oluşturur [60]. Yumurta beyazında temel olarak ovalbumin (%54), ovotransferrin (%13), lizozim (%3.5) ve ovomusin (%3.5) proteinleri bulunmaktadır [61]. Proteinlerin haricinde tavuk yumurtasında lipitler, mineraller, karbonhidratlar, enzimler, büyüme faktörleri ve bakteri ve virüslere karşı biyolojik olarak aktif maddeler de bulunmaktadır.

Çizelge 2.3: Yumurta beyazında bulunan proteinlerin özellikleri[62].

Protein	Miktar (%)	Mol. Ağ. (Da)	Td* (°C)	Niteliği
Ovalbumin	54	45,000	84.0	Fosfoglikoprotein
Ovotransferrin	12	76,000	61.0	Metal iyonları bağlar
Ovomukoid	11	28,000	79.0	Tripsin inhibisyonu
Ovomusin	3.5	5.5–8.3x10 ⁶	-	Sialoprotein, viskozite
Lizozim	3.4	14,300	75.0	Bazı bakterileri yok eder
G2 globulin	4.0	3.0–4.5x10 ⁴	92.5	-
G3 globulin	4.0	-	-	-
Ovoinhibitor	1.5	49,000	-	Serin proteaz inhibisyonu
Ovoglikoprotein	1.0	24,400	-	Sialoprotein
Ovoflavoprotein	0.8	32,000	-	Riboflavin bağlayıcı
Ovomacroglobulin	0.5	7.7x10 ⁵	-	Güçlü antijenik

Sistatin	0.05	12,700	-	Thiol proteaz inhibisyonu
Avidin	0.05	68,300	85	Biotin bağlama

*Td, su veya tampon çözeltideki denatürasyon sıcaklığı.

2.4.1 Ovalbumin

Ovalbumin, molekül ağırlığı 45000 Da olan monomerik fosfoglikoproteindir. Yumurta beyazının köpürme, jelleşme ve emülsifiye edici özellikleri için önemlidir. Dikarbonil metilglisoksal ile modifiye edildiğinde *in vitro* tümör nekroz faktörü alfa salımını indüklediği ve kanser immünoterapisine immün yanıtları arttırmak için kullanıldığı bulunmuştur. Ayrıca linolenik asid ve dokosaheksaenoik asite karşı antioksidan aktivitesi göstermektedir [63]. Ovalbuminin peptik sindiriminden, antihipertansif özellik gösteren ovokinin peptidi ortaya çıkmaktadır [64].

2.4.2 Ovotransferrin

Ovotransferrin, 686 amino asitlik tek polipeptit zincirinden oluşan monomerik bir glikoproteindir. Molekül başına iki demir bağlama kapasitesine sahiptir ve Fe^{3+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ile kompleks halde termal stabil formda bulunur [63, 65]. Ovotransferrinin, geniş spektrumda antibakteriyel etki gösterdiği bilinmektedir. Ovotransferrin antimikrobiyal peptit (OTAP-92) gram negatif bakterilerin dış zarını parçalayarak öldürebilmektedir [66]. Ayrıca tavuklardaki Marek hastalığı virüslerine karşı antiviral ve *Candida* türü funguslara karşı antifungal özellik göstermektedir [67, 68].

2.4.3 Lizozim

Bir diğer önemli yumurta beyazı proteini olan lizozim, doğal bir gıda koruyucusu olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca hemen hemen tüm insan dokularında ve salgılarında bulunur ve bağışıklık sisteminin düzenlenme ve uyarılma süreci üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir [69]. Lizozim, bakterilerin hücre duvarında bulunan yapısal bileşen olan peptidoglikan yapısını bozarak bakteriyolitik etkiye sebep olur. Gram pozitif bakteriler hücre duvarında %90 civarında peptidoglikana sahip olduğundan, %5-10 civarında peptidoglikan içeren gram negatif bakterilere göre lizozime daha duyarlıdır [63]. Ayrıca, oral yoldan verilen lizozimin, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak tümör hücrelerinin büyümesini inhibe edebileceği rapor

edilmiştir [70, 71]. Oral veya topikal yolla alınan lizozimin ayrıca uçuk, suçiçeği gibi hastalıklara karşı antiviral etkisi olduğu bilinmektedir. Ayrıca immunoterapi ile beraber kullanıldığında kronik sinüzit ve kronik bronşiti iyileştirici etkisi bulunmaktadır [72].

2.4.4 Ovomusin

Yumurta beyazının beyaz doğasından ve viskoz yapısından sorumlu olan ovomusin, bakteri hareketini önleyen bir ağ yapısındadır ve insan grip (influenza) virüsüne karşı antiviral özellik gösterdiği de bildirilmiştir [63, 73]. Aynı zamanda sarkoma hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği hatta hücreleri hasara uğrattığı bildirilmiştir [74]. Ayrıca ovomusinın kandaki kolesterol konsantrasyonunu azaltıcı etkisi olduğu sıçanlarda ve Coco-2 hücreleri üzerinde yapılan deneyler sonucunda ortaya çıkmıştır [75].

Çizelge 2.4: Yumurta beyazındaki temel proteinler ve özellikleri [63].

Protein	Özellik
Ovalbumin	<ul style="list-style-type: none">➤ Anti mutajenik ve anti karsinojenik➤ Bağışıklık düzenleyici➤ Antioksidan➤ Kan basıncı düşürücü (Ovokinin)
Ovotransferrin	<ul style="list-style-type: none">➤ Antibakteriyel➤ Antimikrobiyal aktivite(OTAP-92)➤ Antiviral aktivite➤ Antifungal aktivite➤ Bağışıklık düzenleyici➤ Bazı antibiyotiklerin etkisini güçlendirir
Lizozim	<ul style="list-style-type: none">➤ Antibakteriyel➤ Besin koruyucu➤ Antiviral➤ Anti inflamatuvar➤ Bağışıklık düzenleyici ve uyarıcı➤ Anti tümör aktivite
Ovomusin	<ul style="list-style-type: none">➤ Antiviral aktivite➤ Antitümör aktivite➤ Bağışıklık düzenleyici➤ Kolesterol düşürücü etki

3 MATERYAL ve METOD

3.1 Kullanılan Malzemeler

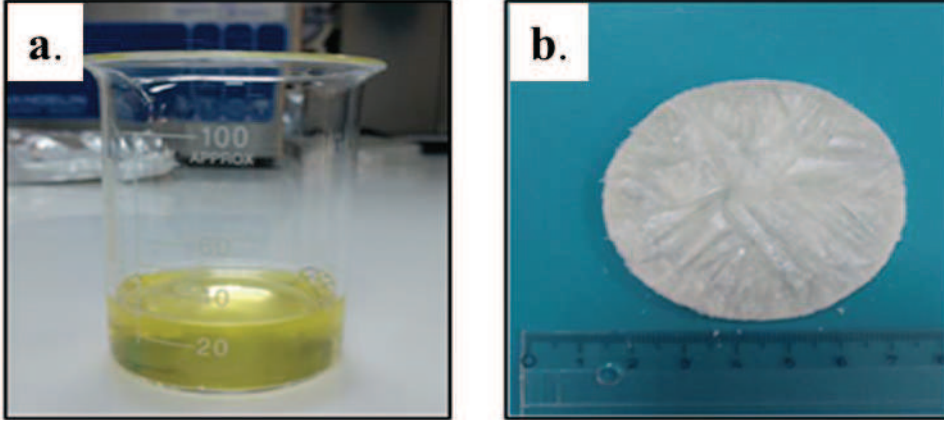
Tavuk yumurtaları yerel marketten satın alma yoluyla elde edilmiştir. Nanofiber doku iskelesi üretiminde kullanılan Poly(ϵ -caprolactone) (ortalama $M_n=80,000$) Sigma Aldrich (Almanya) firmasından ve çözücü olarak kullanılan 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) Merck Millipore (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Nanofiberler üzerindeki protein dağılımını gözlemleyebilmek için kullanılan Rabbit Anti-Ovalbumin Antibody ve Anti-mouse Alexa Fluor 488 malzemeleri de yine Merck Millipore (Almanya)'dan temin edilmiştir.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, yüksek glukoz) besi ortamı, besi ortamına eklenen Fetal Bovine Serum (FBS) ve Penicillin-Streptomycin antibiyotiği Biological Industries (Israel) firmasından satın alınmıştır. Hücre canlılığı analizi için kullanılan Alamar Blue proliferasyon kiti ve Live/Dead kiti ThermoFischer (USA)'den temin edilmiştir. Hücre morfolojisini gözlemleyebilmek için kullanılan Phalloidin ve Draq5 SigmaAldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Diğer tüm kimyasal maddeler Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir ve aksi belirtilmedikçe alındığı gibi kullanılmıştır.

3.2 Yumurta Beyazından Protein Ekstraksiyonu

Tavuk yumurtası beyazı proteini, literatürde tarif edilen yönteme göre tavuk yumurtasından saflaştırılmıştır [76]. Yumurtalar el ile kırılmış ve beyazı manuel olarak ayrılmıştır. Yumurta beyazı, viskozitesini azaltmak amacıyla aynı hacimde distile su ile seyreltilip (Şekil 3.1.a) buz banyosu içerisinde bir saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından birkaç kat gazlı bez kullanılarak süzümüştür. Elde edilen karışım, 10000xg ve 4°C'de 20 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda elde edilen üst sıvı, diyaliz tüplerine (MCO=3500) konulmuş ve 4°C'de saf suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonucu elde edilen sıvıya tekrar santrifüj işlemi uygulanmıştır (15000xg, 40 dk, 4°C). Sonuç protein

çözeltisi -20°C 'de bir gece bekletildikten sonra, 48 saat boyunca liyofilize edilmiştir (Şekil 3.1.b) ve kullanımına kadar 4°C 'de saklanmıştır.

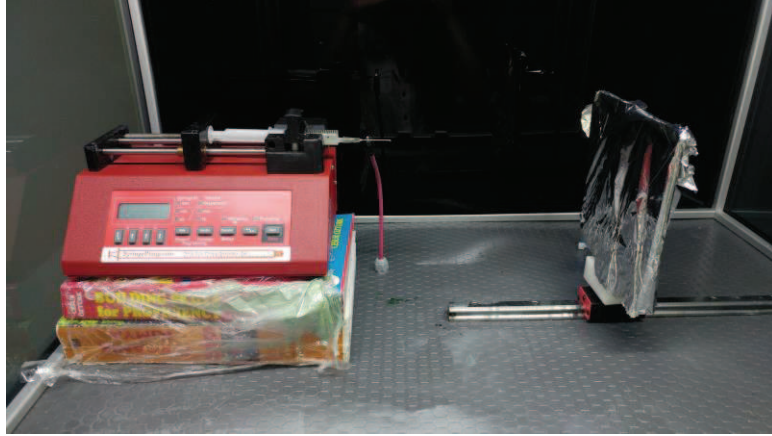


Şekil 3.1: a. Yumurta beyazı, b. Liyofilize edilmiş yumurta beyazı

3.3 PCL/HEW Nanofiber Membran Hazırlanması

Elektroçirirmede kullanılacak olan çözeltiyi hazırlama amacıyla, eşit miktarlardaki liyofilize HEW protein ve PCL, son konsantrasyon 0.1 g/ml olacak şekilde HFIP çözücüsü içinde çözülmüştür. Bunun için, 0.3 g granül PCL'nin 2 ml HFIP içerisinde ve 0.3 g liyofilize HEW'in 4 ml HFIP içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile 4 saat boyunca karıştırılarak ayrı ayrı çözünmesi sağlanmıştır. Ardından HEW çözeltisi, daha viskoz olan PCL çözeltisi üzerine eklenmiş ve homojen bir çözelti elde etmek amacıyla bir gece boyunca oda sıcaklığında manyetik olarak karıştırılmıştır.

Elektroçirime çalışmaları için OptoSense (Orlando, Florida) yüksek voltaj kaynağı, Syringe Pump (New Era Pump Systems, Inc, New York) mikro pompası ve toplayıcı levhadan oluşan bir elektroçirime düzeneği kullanılmıştır(Şekil 3.2) En iyi morfolojiye sahip fiberlerin üretilmesi için çözelti konsantrasyonları ve sistem parametreleri değiştirilerek bu değerlerden herhangi 3 tanesi sabit tutularak tek bir değişken ile en uygun yönlenmenin bulunabilmesi için birçok deneme yapılmış ve optimum koşullar belirlenmiştir. Voltaj (kV), çözelti akış hızı (ml/sa), enjektör ucu ile toplayıcı levha arasındaki uzaklık ve döner silindir hızı parametreleri değiştirilerek gerçekleştirilen tüm elektroçirime çalışmaları oda sıcaklığında yürütülmüştür. İstenilen özelliklerdeki nanofiber membranların üretimi için 19 kV voltaj, 1 ml/h akış hızı ve 20 cm 'lik bir plaka toplayıcı- iğne ucu arası mesafenin uygun olduğu tespit edilmiştir



Şekil 3.2: Deneyde kullanılan elektroğirme düzeneği.

3.4 Karakterizasyon

HEW protein karışımı içindeki yumurta proteinlerinin varlığını doğrulamak amacıyla Lamelli metodu kullanılarak SDS-Page (12%) analizi yapılmıştır [77]. Hazırlanan jelde ilerleyen proteinler Coomassie mavisi (Coomassie Brilliant Blue R-250) ile işaretlendikten sonra %50 etanol ve %5 asetik asit ile yıkanmak sureti ile tutunmayan boya giderilmiştir. Katlanmamış proteinlerin büyüklüğünü tahmin etmek amacı ile boyalı bir işaretleyici kit (Prestained Molecular Weight Markers, Thermo Scientific, USA, SDS-7B, Sigma) kullanılmıştır. Standart protein olarak Sığır Serum Albumini (Bovine serum albumin, 66 kDa) kullanılan analizde, toplam protein konsantrasyonu Bradford analizi ile hesaplanmıştır.

Oluşturulan nanofiber membranların morfolojik özellikleri ve fiber çapları taramalı elektron mikroskobu (SEM, XL30 ESEM-FEG, FEI-Philips, Netherlands) ile belirlenmiştir. Bu amaçla, 1x1 cm boyutlarında kesilen doku iskeleleri görüntülenmeden önce ince platin tabakası ile kaplanarak 10 kV ivmelendirilen elektron demeti yardımı ile görüntülenmiştir.

HEW proteininin nanofiberler üzerindeki dağılımı, ovalbumin proteinine karşı antikor boyaması yapılarak konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM; Zeiss LSM 880) ile görüntülenmiştir. Bunun için öncelikle nanofiber membranlar birincil antikor olan “tavşan anti-ovalbumin antikor” (“rabbit anti-ovalbumin antibody”, (1:500) ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından 2 kez PBS ile yıkanan örnekler, ikincil antikor olan “anti-fare Alexa Fluor-488” (“anti-mouse Alexa Fluor-

488", 1:500) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Konfokal mikroskop ile görüntülemeye önce örnekler bir kez daha PBS ile yıkanmıştır.

Doku iskelesinin kimyasal yapısını belirlemek ve HEW proteininin nanofiber yüzeyinde de varlığını ispatlamak amacıyla 4000-650cm⁻¹ dalga boyu aralığında FTIR-ATR (FTIR, Perkin Elmer, Spectrum 100, USA) analizi gerçekleştirilmiştir.

PCL/HEW membranının termal özelliklerinin belirlenmesi ve ayrıca membran içeriğinde bulunan PCL ve HEW miktarının tayini amacıyla termogravimetrik diferansiyel termal analiz (TA, Instruments, New Castle, DE, USA) yapılmıştır. Analizler, 30-500°C sıcaklık aralığında ve 10°C/dk ısıtma hızı ile azot ortamında gerçekleştirilmiştir.

Nanofiber membranların ıslanabilirliğini analiz etmek için su temas açısı ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler, deiyonize su kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Membranlar hareketli bir tabakaya yerleştirilmiştir ve yatay düzlemde eşit hizaya getirildikten sonra üzerlerine mikro şırınga ile yaklaşık 4µl deiyonize su damlatılmıştır. Su damlacığının membran yüzeyi ile yaptığı temas açısı değerleri mikro kamera (CAM 100, KSV) kullanılarak kaydedilmiş ve her bir örneğin dört farklı noktasından ölçüm alınarak cihazdaki yerleşik yazılım ile hesaplanmıştır.

3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hazırlanan PCL/HEW nanofiber membranların hücre tutunma ve çoğalmasını destekleme potansiyelleri hücre kültürü çalışmaları ile belirlenmiştir. Bunun için kontrol grubu olarak yalnızca PCL'den oluşan nanofiber membranlar kullanılmıştır.

İnsan adipoz doku kaynaklı kök hücreleri, nanofiber membranlar üzerindeki hücre tutunması ve yayılması davranışını saptamak için kullanılmıştır. Hücreler, literatürdeki protokole göre taze insan deri altı adipoz lipoaspiratlarından izole edilmiştir [78].

Örnekler, hücre ekiminden önce %70 etanol ile 1 saat boyunca steril edilmiş ve ardından laminar akış kabini içerisinde 30dk boyunca kurumaya bırakılmıştır. Süspanse ASC (pasaj 3) kültürü her bir örneğin üzerine 25×10³ hücre/cm² olacak şekilde ekilmiştir ve 37°C'de nemli atmosfer ve %5 CO₂ içeren ortamda 2 hafta boyunca yüksek glukozlu DMEM (10% FBS, 1% Penisilin/Streptomisin) içerisinde

2-3 günde bir ortam değiştirilerek inkübe edilmiştir. Örnekler 2, 7 ve 14. günlerde hücre tutunması ve canlılığının analizi için toplanmıştır.

Hücre canlılığı ve morfolojisi, “Live/Dead Kit” (Calcein-AM and Ethidium Homodimer-1 staining) kullanılarak konfokal lazer taramalı mikroskopta (Leica, Germany) gözlemlenmiştir. Bu kit, Calcein-AM ve Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) moleküler problemleri ile hücre içi esteraz aktivitesi ve plazma zarı bütünlüğünü baz alarak iki renkli görüntü alınmasını sağlamaktadır. Canlı hücreler, floresan olmayan Calcein-AM'nin hücre içinde esteraz aktivitesiyle geçirdiği enzimatik dönüşüm sonrasında floresan üretmesiyle belirlenmektedir. EthD-1, hücre zarı hasar görmüş ölü hücrelere girip nükleik asitlere bağlanmakta ve böylece ölü hücrelerde parlak bir kırmızı flüoresans üretilmektedir. Genellikle alternatif yöntemlerden daha hızlı, daha ucuz, daha güvenli ve daha duyarlı bir testtir.

Hücre canlılığı Alamar Blue® (Thermo Fisher Scientific, NY, USA) kiti kullanılarak nicel olarak değerlendirilmiştir. Alamar mavisi tahlili, canlı hücrelerin zarından geçerek mitokondriyal enzimleri tarafından, floresan olmayan mavi resazurin boyasının kırmızı floresan resorufine indirgenmesine dayanır [79]. Alamar mavisi testinin, MTT testine göre daha hassas ve yüksek performanslı olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir [80]. Alamar mavisi analizi için 1 ml Alamar Blue® boyası çözeltisi (%10), örnek içeren kuyucuklara eklenmiş ve 37°C, %5 CO₂'li ortamda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuktan 200 µL alınıp 96'lık kuyucuklu plakaya aktarılmıştır. 570/590nm'de mikropilaka okuyucuda (Biochrom EZ Read 400, UK) absorban değerleri ölçülmüştür. Kalibrasyon eğrisine göre yüzde değerler hesaplanarak canlı hücre sayısı bulunmuştur.

14.günde phalloidin ve draq5 boyası ile F-aktin ve çekirdek boyaması yapılarak hücrelerin membran üzerindeki morfoloji ve hücre iskeleti organizasyonları konfokal mikroskop altında analiz edilmiştir. Phalloidin, aktin filamentlerinin (F-aktin olarak da bilinir) boyanması için kullanılan oldukça seçici bir bisiklik peptittir [81]. Draq5, canlı veya fiksasyon işlemi ile sabitlenmiş hücreler için kırmızı renk veren DNA boyasıdır [82].

Membranlar üzerinde kültür edilen hücrelerin daha detaylı morfolojik analizleri için SEM kullanılmıştır. Yukarıda belirtilen zaman aralıklarında toplanan hücre/membran yapıları kakodilat tamponu ile yıkanarak %3.7'lik formalaldehit çözelti ile fikse

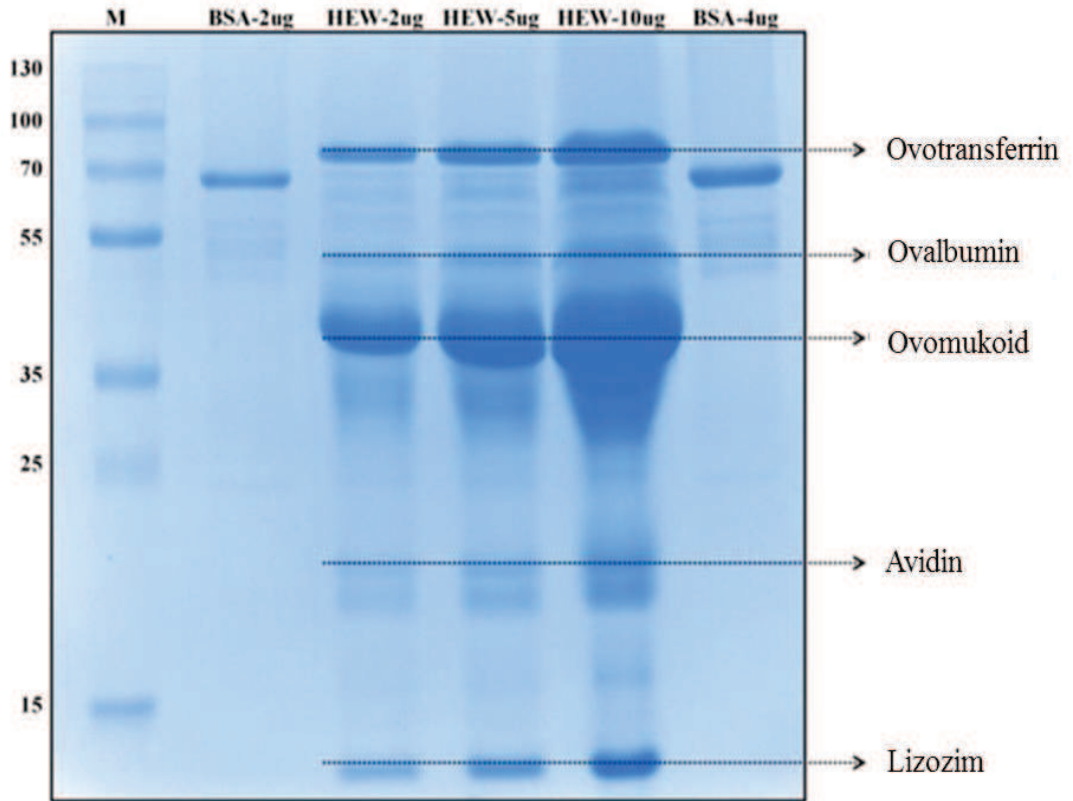
edilmiştir. PBS ile defalarca yıkanan örnekler, artan konsantrasyonlardaki (%25, %50 ve %75'lik etanolde 20 dakika, %95 etanolde 30 dakika ve %100'lük etanolde 60 dakika) etanol çözeltileri ile dehidrate edilerek oda sıcaklığında kurutulmuştur. Platin ile kaplanan örnekler, yukarıda belirtilen koşullarda taramalı elektron mikroskopu altında incelenmiştir.



4 BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 SDS-Page Analizi

SDS-Page analizi proteinleri büyüklüklerine göre ayırarak, molekül ağırlıkları ve protein altbirimlerin bileşimi hakkında bilgi veren bir yöntemdir [83]. Liyofilize edilmiş HEW protein karışımına uygulanan SDS-Page analizine göre (Şekil 4.1), literatürdeki çalışmalarla tutarlı olarak HEW içerisinde bulunan, ovalbümin, ovotransferrin, ovomukoid, avidin ve lizozim ana proteinlerine karşılık gelen 5 bant gözlemlenmiştir [76, 84].



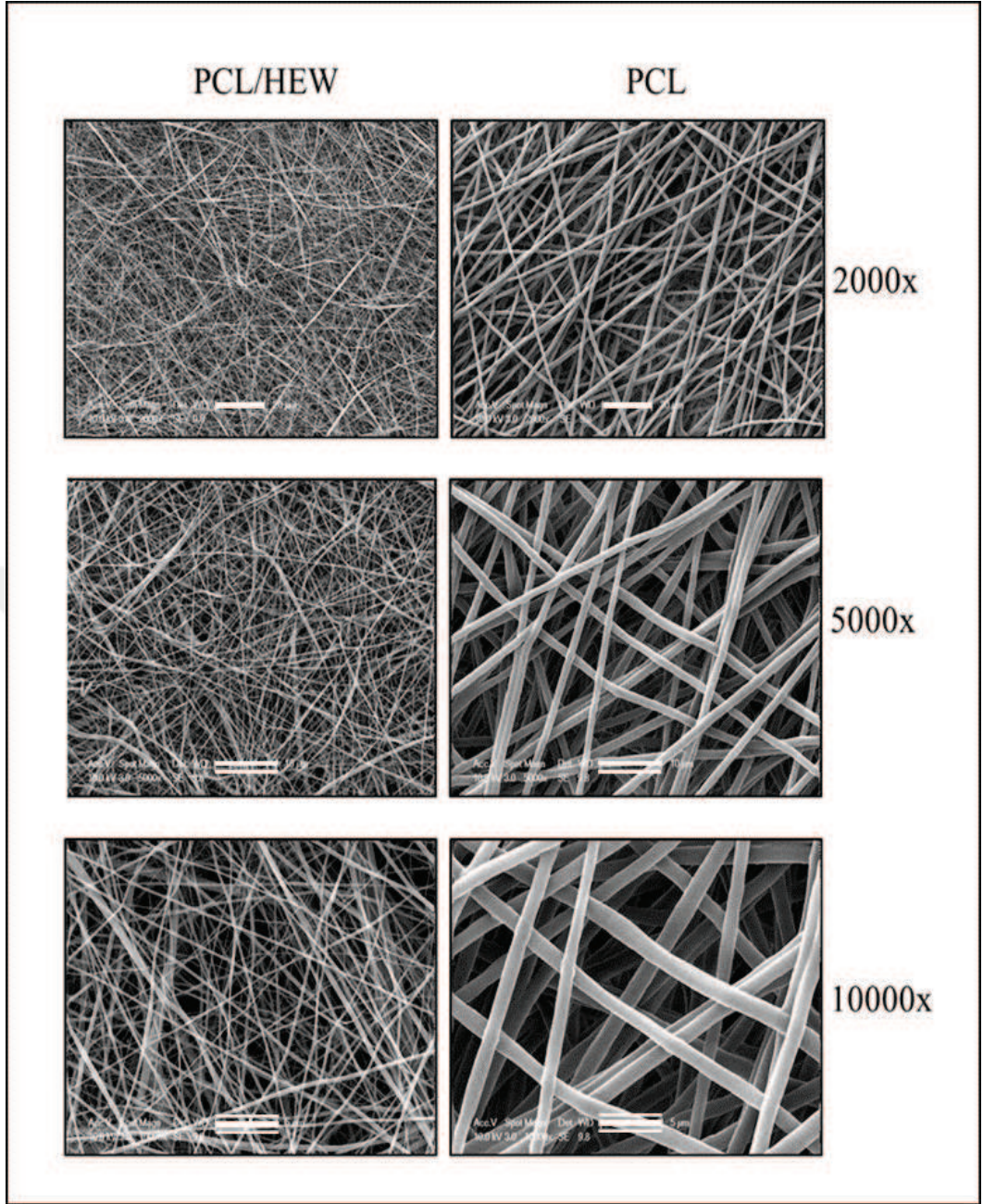
Şekil 4.1: SDS-Page analizinde görünen 5 temel HEW proteini bandı.

4.2 Morfolojik Analiz

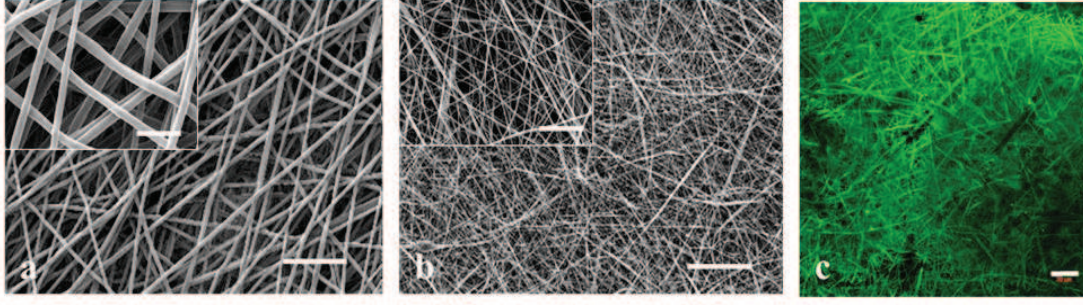
Doku iskelesi tasarımında damarlaşmanın sağlanması, hücreler için oksijen ve besin taşınması, atıkların uzaklaştırılması açısından gözenek yapısı, gözenek boyutu ve

gözeneklerin bağlantılı olması gibi özelliklerin yanında, hücrelerin tutunup yayılabilmesi açısından fiber yapıları ve çapları da önem taşımaktadır. PCL yapısına HEW proteininin eklenmesinin, nanofiberlerin ve dolayısıyla tüm membranın morfolojisine olan etkisini belirlemek amacı ile örnekler taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Optimize edilmiş şartlarda yapılan elektro eğirme işlemi sonucunda elde edilen fiberlerin SEM mikrografikleri Şekil 4.2’de verilmiştir. Elektroegirme prosesi sırasında sıklıkla karşılaşılan sorunlardan biri olan boncuk oluşumunun olmaması ve fiber yüzeylerinin pürüzsüz olması, seçilen proses koşullarının uygunluğunu göstermiştir. Elektro eğirilmiş PCL ve PCL/HEW fiber çapı aralıkları her farklı örnek için en az 10 fiber çapı ölçülerek belirlenmiştir. Buna göre, PCL ve PCL/HEW fiber çaplarının sırasıyla 0.90-1.60 µm ve 50-254 nm aralığında olduğu belirlenmiştir. Her ne kadar çözelti konsantrasyonları birbirine eşit tutulsa da, HEW’in yapısında en fazla bulunan ovalbumin başta olmak üzere diğer proteinlerin çoğunluğunun molekül ağırlığının PCL’ye göre düşük olması çözelti viskozitesinin düşmesine sebep olmuştur. Çözelti vizkozitesinin nanofiber çapı ile doğru orantılı olarak azaldığı gözönüne alındığında bu beklenen bir sonuçtur[37].

HEW proteinlerinin, fiber yüzeyleri üzerindeki homojen dağılımını belirlemek için HEW ana proteini olan ovalbumin, karşı antikor kullanılarak immünohistokimyasal olarak analiz edilmiştir. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) görüntüleri, ovalbumin proteininin nanofiberler boyunca uzamsal dağılımını göstermektedir (Şekil 4.3). Elektroegirilmiş doku iskelelerinin hücre proliferasyonu için önemli olan nanofiber yüzeylerinin başlangıçtaki karakterisitik yapısında fiziksel bir değişikliğe sebep olmadan, proteinin sağlayacağı kimyasal desteğin eklenmesi kullanılan “polimer/protein karışımından elektroegirme” stratejisinin önemli bir sonucudur[29]. Bu bakımdan; malzemenin bir özelliğini arttırırken başka özelliklerinde olumsuz yönde değişiklik yapabilen yüzey modifikasyonu ya da kaplanması gibi tekniklere göre üstünlük gösterdiği söylenebilir.



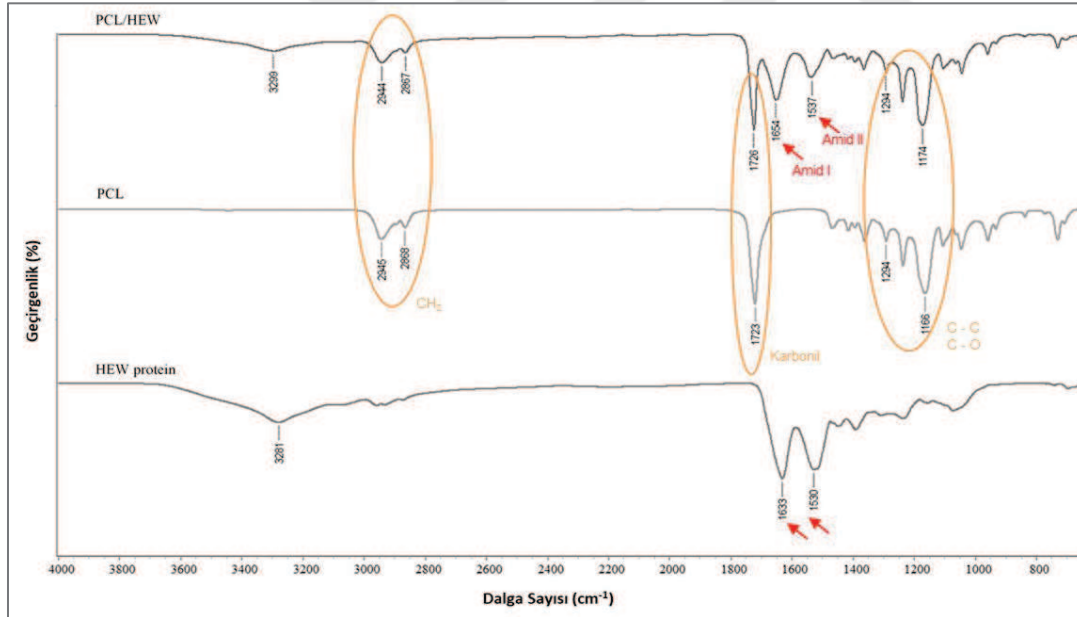
Şekil 4.2: PCL/HEW ve PCL nanofiber membranların SEM görüntüleri (Ölçek çizgisi: – 20 μ m, = 10 μ m, \equiv 5 μ m).



Şekil 4.3:a.PCL, b.PCL/HEW nanofiber membranın SEM görüntüsü, c.PCL/HEW nanofiber membranın immünohistokimyasal boyaması CLSM görüntüsü (Ölçek çizgisi: 20 μm . İç mikrograflardaki ölçek çizgisi: 5 μm).

4.3 FTIR-ATR Analizi

Doku iskelesinin yüzeyi, hücre tepkisi açısından birincil öneme sahip olduğundan, hücre zarı reseptörlerini bağlamak için uygun kimyasal ve topografik özelliklere sahip olması önemlidir. Nanofiber yüzeylerin kimyasal yapısı hakkında bilgi edinmek amacıyla yapılan FTIR-ATR analizi sonucu Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



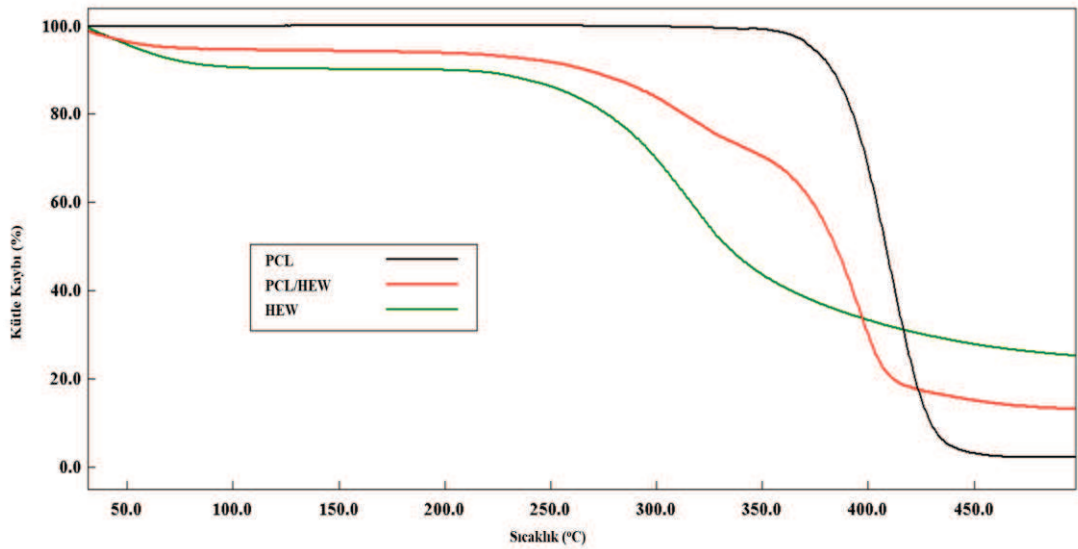
Şekil 4.4: PCL/HEW, PCL ve HEW proteininin FTIR spektrumu.

PCL nanofiber membranların FTIR spektrumunda PCL'ye ait karakteristik bantlar olan karbonil gerilme (1729 cm^{-1}), CH_2 gerilme ($2867\text{--}2944\text{ cm}^{-1}$), kristalin (1293 cm^{-1}) ve amorf (1168 cm^{-1}) fazların C-C ve C-O gerilmeleri bantları gözlemlenmiştir[85]. PCL/HEW örneklerinde ise karakteristik PCL bantlarının yanı sıra proteinlerle ilişkili olarak 1648 cm^{-1} dalga sayısında amid I, 1535 cm^{-1} dalga

sayısında amid II bantları görülmüştür [86, 87]. -NH₂ grupları, biyomateryal yüzeyine hücre tutunmasında önemli rol oynayan fibrinojeni bağlamak için çok önemlidir. Aynı zamanda biyomateryal yüzeyindeki amin grupları, hücre tutunmasında fokal adezyon fonksiyonuna ve sinyalleşmeye yardımcı olmaktadır [88].

4.4 Termogravimetrik-Diferansiyel Termal Analiz

PCL/HEW doku iskelesinin, PCL doku iskelesinin ve yalnızca HEW proteininin termal özelliklerinin belirlenmesi için yapılan TGA analizinden elde edilen termogram Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



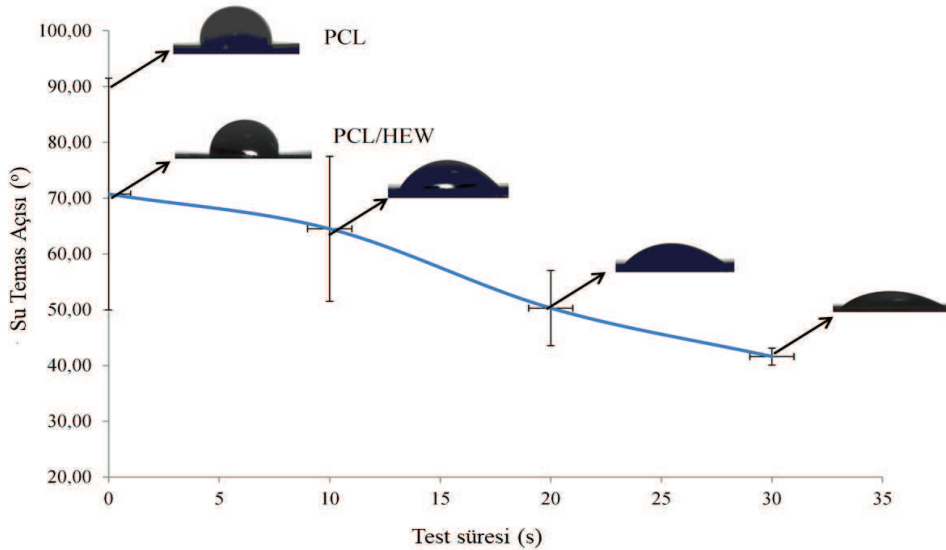
Şekil 4.5: TGA analizi grafiği.

Sadece PCL'den üretilen membranların TGA eğrilerinde, 350–439°C sıcaklık aralığında tek aşamalı bir termal dekompozisyon görülmüştür ve bu durum literatür ile uyumaktadır [89, 90]. Başlangıçta suyun buharlaşmasından kaynaklanan bir ağırlık kaybının gözlenmemesi PCL'nin hidrofobik karakterinin göstergesidir. Tek başına yumurta beyazının TGA profili analiz edildiğinde, dekompozisyonun 230-328°C gibi çok daha geniş bir sıcaklık aralığında gerçekleştiği ve analiz sonunda örneğin sadece %74.5'inin bozunduğu görülmüştür. Ayrıca, başlangıçta suyun buharlaşmasından kaynaklanan %9.6'lık bir ağırlık kaybı sözkonusudur. PCL/HEW nanofiber membranların TGA termogramlarında ise her iki bileşenin dekompozisyonu ayırt etmek mümkündür. Bileşenlerin birbiri ile etkileşiminden dolayı başlangıçtaki su kaynaklı kayıp %5.3'e düşmüştür. PCL'nin tek başına hemen

hemen tamamının (%97.6) dekompoze olduğu düşünüldüğünde, PCL/HEW örneklerinde kalan atığın HEW olduğu sonucuna varılabilir. Buna göre yapılan hesaplar sonucunda, kompozit nanofiberlerdeki HEW protein oranının %36 civarında olduğu saptanmıştır.

4.5 Su Temas Açısı Ölçümü

Literatürde yapılan çalışmalar sonucu, insan adipoz kaynaklı kök hücrelerinin; hidrofobik ve pürüzsüz yüzeyler yerine hidrofilitesi yüksek ve pürüzlü yüzeyleri tercih ettiği ve büyük oranda gerilerek uzayan bir morfoloji sergiledikleri rapor edilmiştir [91]. Bunun sebebinin, hücrelerin yüzeye bağlanmasında daha aktif özellik gösteren fibronektinin ikincil düzenlenmesi olduğu düşünülmektedir. Bütün bu bilgiler ışığında, üretilen nanofiber membranların hidrofilitesi yani ıslatılabilirliği su temas açısı ölçümü yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Şekil 4.6'da verildiği gibi sadece PCL'den üretilen nanofiber membranların temas açısı 90° olarak ölçülmüş ve bu değer deney süresince sabit kalmıştır. Diğer taraftan, PCL/HEW membranlar çok yüksek hidrofilikte bir karakter sergileyerek başlangıçta 70° olarak ölçülen temas açısının deney süresince hızla düşerek su damlacığının membran tarafından absorblandığı tespit edilmiştir.

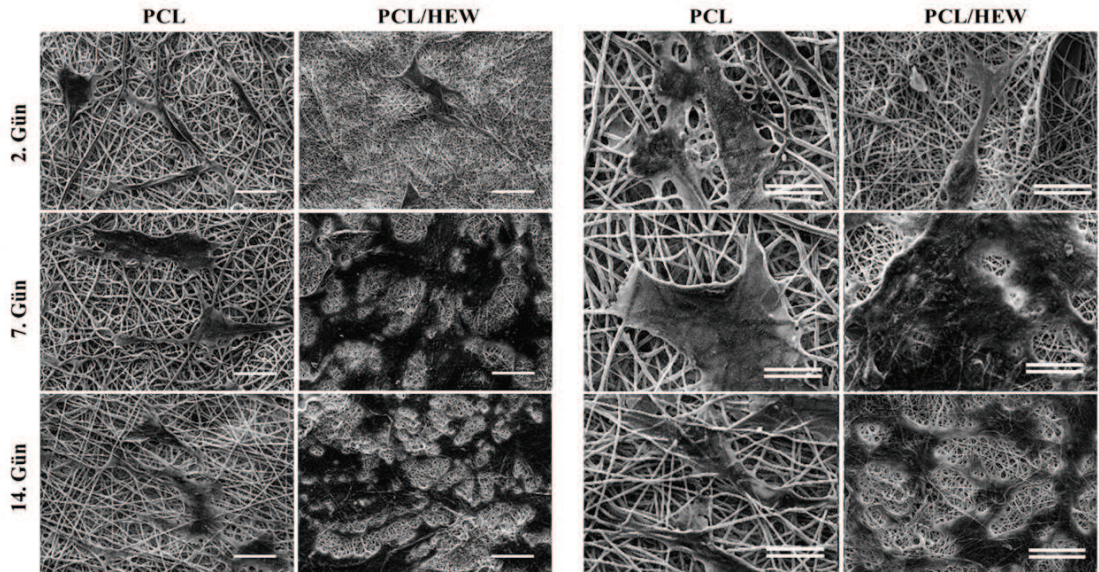


Şekil 4.6: PCL ve PCL/HEW membranların test süresince su temas açısı değişimlerinin gösterimi.

4.6 Hücre Kültürü Çalışmaları

4.6.1 SEM analizi

Hücre kültürünün 2., 7. ve 14. günlerindeki PCL/HEW ve PCL örnekleri üzerine tutunan adipoz kaynaklı kök hücrelerinin morfolojisi SEM ile gözlemlenerek karşılaştırılmıştır. Şekil 4.7’de de verildiği üzere, PCL/HEW membranlar üzerine ekilen hücrelerin kültür süresi boyunca daha uniform bir yayılma ve dağılım gösterdiği görülmektedir. Kültürün 2. gününde, tutunan hücrelerin kapladığı alan bakımından iki grupta da önemli bir fark görülme de PCL membranların üzerindeki hücrelerin geniş bir iskeletsel yayılım sergilediği gözlemlenmiştir. Buna karşılık, kültür zamanı ilerledikçe hücrelerin iki yüzey üzerindeki yayılımı arasında belirgin bir farklılık olduğu ve PCL/HEW yüzeyi üzerinde yayılımın çok daha fazla olduğu görülmüştür. Özellikle 14.günde, PCL fiberler arasında gerilerek yayılan hücre sayısının çok az olduğu göze çarpmaktadır.

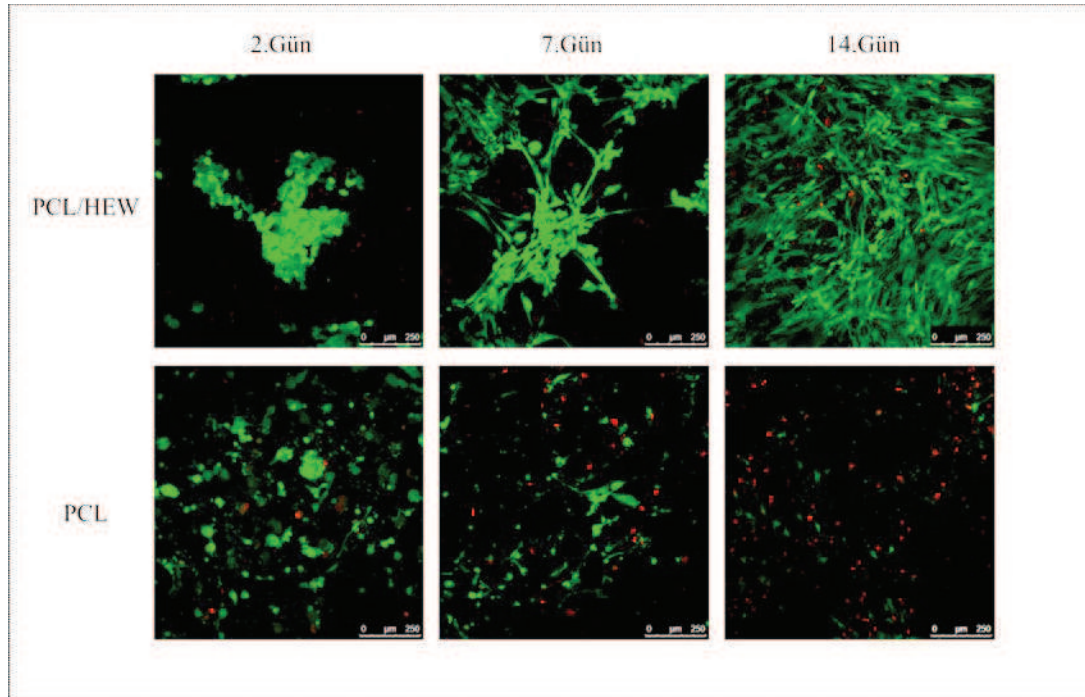


Şekil 4.7: PCL ve PCL/HEW örneklerinde kültüre edilmiş ASC’lerin SEM mikrografları (- 50 μm , = 20 μm).

4.6.2 Calcein-AM boyaması

Calcein-AM boyaması ile elde edilen sonuçlar da SEM analizini destekler niteliktedir (Şekil 4.8). Örneklere uygulanan canlı/ölü boyamasından elde edilen görüntülerde yeşil renkte görünenler Calcein-AM’nin canlı hücre zarından geçerek geçirdiği enzimatik dönüşüm sonucunda yeşil floresan üretmesi sonucu görüntülenen hücrelerdir. Kırmızı renkte görünenler ise canlı hücre zarından geçemeyen ancak ölü

hücre zarından hücre içine girip nükleik asit ile bağlanması sonucu floresan ışığa yapan EthD-1 ile boyanan ölü hücrelerdir. Hücrelerin başlangıçta PCL membranlar üzerinde daha fazla yayıldığı, ancak zamanla PCL/HEW üzerine ekilen hücrelerin yayılma hızı ve uzayarak bütün yüzeyi kaplama bakımından PCL üzerindeki hücrelerden çok daha üstün olduğu görülmüştür. Özellikle kültürün 14. gününde PCL üzerindeki hücrelerin canlılığını koruyamadığı bulunmuştur. Bu durum, HEW proteineri kullanarak fiber yüzeylerinde yapılan değişikliklerin hücre canlılığını ve hücresel davranışları olumlu etkilediğini göstermektedir.

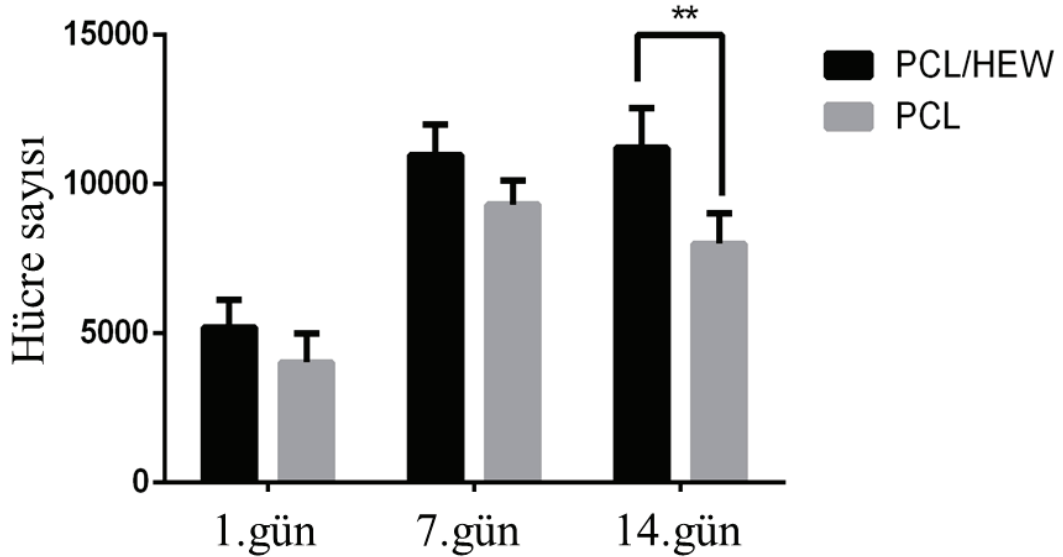


Şekil 4.8: PCL ve PCL/HEW nanofibröz matrisler üzerine ekilen ASC'lerin Calcein-AM ile canlılık ve morfoloji analizi.

4.6.3 Alamar Blue ile Hücre Yaşayabilirliği Analizi

Yukarıda verilen sonuçları desteklemek amacı ile hücrelerin yaşayabilirliği Alamar Blue® kiti kullanılarak kantitatif olarak analiz edilmiştir. İlk 7 gününde PCL ve PCL/HEW üzerinde kültür edilen hücre sayılarında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmasa da kültürün 14. gününde PCL/HEW örnekleri üzerindeki yaşayan hücre sayısının istatistiksel olarak daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Literatürde PCL ile yapılan benzer çalışmalarda da ispatlandığı üzere, hücrelerin 7.günden sonra canlılıklarını yitirmesi PCL'nin yüzey özelliklerinin tek başına hücresel canlılığı desteklemediğinin bir göstergesidir [92-94]. Her ne kadar PCL nanofiberlerin fiziksel açıdan doğal ECM'i taklit edebilmesi mümkün olsa da

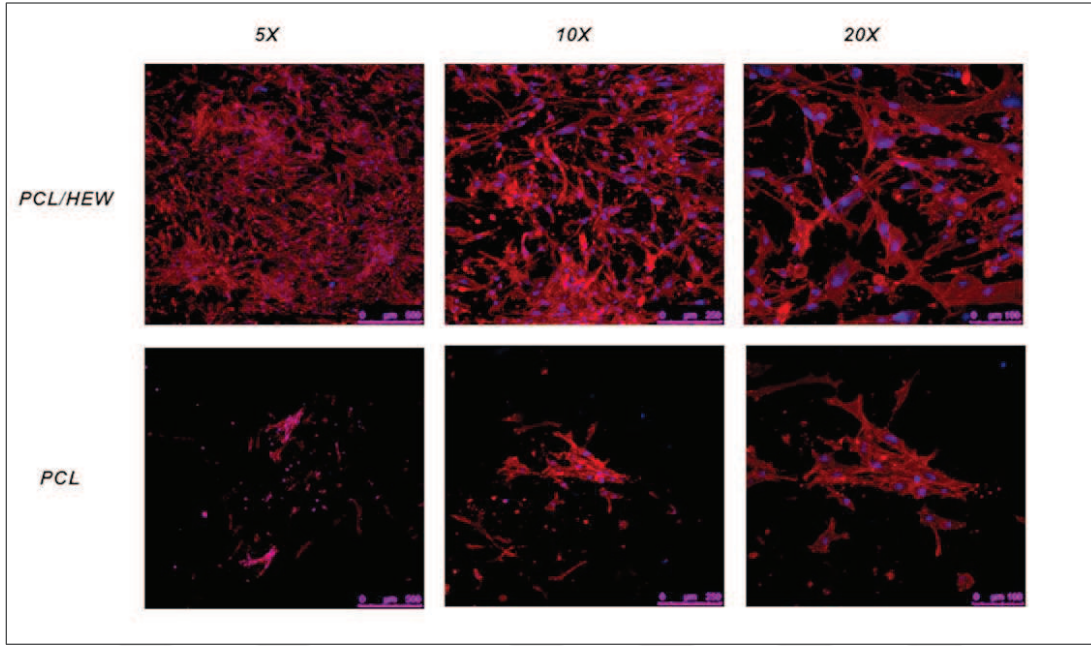
yüzeylerinde amin, karboksil, hidroksil veya sülfat gibi fonksiyonel grupların olmayışı hücrelerin yapışması ve canlılıklarını koruması açısından önemi bir eksikliklerdir. Bu bakımdan, ana malzemeye karıştırma yolu ile eklenen HEW proteinleri ile plazma proteinleri yoluyla integrinleri bağlayabilen $-NH_2$ gibi fonksiyonel grupların ve hücre bağlama özelliği gösteren aminoasit sekanslarının yapıya eklenmesi kolaylıkla sağlanabilmektedir [95, 96]. Ovalbumin ve ovomukoidin farklılaşmamış C2C12 miyoblastların proliferasyonu ve farklılaşmış C2C12 hücrelerinin de büyümesi üzerinde olumlu etkileri olduğu literatürde yer almaktadır [97]. Bununla birlikte, sığır serum albumini ile çok benzer amino asit içeriğine sahip olan ovalbuminin adipojenesis ve anjiojenesisini desteklediğine dair çalışmalar da mevcuttur [98]. Yine, ovalbumin preosteoblastların proliferasyonunu ve farklılaşmasını arttırdığından dolayı kemik doku mühendisliğinde doku iskelesi malzemesi olarak önerilmiştir [99]. Bu tez kapsamında sunulan çalışmalar ile de adipoz kaynaklı kök hücrelerin proliferasyonu ve büyümesinin yumurta akında bulunan bu proteinlerin sinerjik bir kombinasyonu sonucu desteklendiği gösterilmiştir.



Şekil 4.9: PCL ve PCL/HEW nanofiber membranlarına ekilen ASC'lerin proliferasyonu. (** p < 0.05).

4.6.4 Aktin filamentleri ve çekirdek boyaması

Hücelere uygulanan phalloidin ve draç5 boyaması ile hücresel iskeletin morfolojisi görüntülenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Phalloidin ve draç5 boyası ile F-aktin(kırmızı) ve çekirdek(mavi) boyaması.

Canlı/ölü boyama sonuçları ile benzer olarak PCL/HEW örnekleri üzerinde ekili hücrelerin phalloidin boyamasında, aktin filamentlerinin yayılarak tipik aksel morfoloji sergiledikleri görülmektedir. Yalnızca PCL içeren örnek üzerinde ise küçük bir grup hücre hariç ekilen hücrelerin sağlıklı bir büyüme gösteremedikleri teyit edilmiştir (Şekil 4.10). Bilindiği üzere aktin filamentlerinin organizasyonu, integrin reseptörleri ile matriks proteinleri arasındaki etkileşim tarafından belirlenmektedir [100]. Burada elde edilen sonuçlar da PCL/HEW üzerindeki fonksiyonel grupların bu proteinlerin adsorpsiyonunu destekleyerek hücre iskeletinin organizasyonunu etkilediğini göstermiştir.

5 SONUÇ ve ÖNERİLER

Doku mühendisliğinde verimlilik, biyolojik ve fiziksel performanslar açısından üstün özelliklere sahip bir iskele gerektirir. Bu sebeple doku iskelelerinde istenen özellikleri elde etmek için çeşitli üretim teknolojileri ve mühendislik yöntemleri beraber kullanılmaktadır. Sentetik polimerlerden oluşturulan doku iskeleleri iyi yapısal ve mekanik özellikleri gösterebilirler ancak hücre tutunması ve doku oluşumu için uygun olmayabilir. Bunun aksine doğal polimerler çok iyi biyolojik özellikler sağlayabilir. Ancak doğal polimerler de fizyolojik ortamlarda iyi mekanik dayanım ve kararlılık gösteremezler. Bu sebeple, sentetik ve doğal bileşenlerden oluşan kompozit doku iskelelerinin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır.

Sunulan tez çalışmasında da sentetik ve biyobozunur bir polimer olan PCL ile doğal bileşen olarak liyofilize HEW proteininden elektroğirme ile kompozit nanofiber doku iskelesi oluşturulmuştur. Biyoaktif doğal bileşen olan HEW proteininin nanofiber yapının yüzey özelliklerini ne şekilde değiştirdiği incelenmiş ve ASC'ler ile hücresel tepkisi test edilmiştir.

- Elektro eğirme yöntemi ile elde edilen PCL/HEW nanofiber yapıdaki doku iskelelerinin SEM görüntüleri değerlendirildiğinde istenilen fiber morfolojisine ulaşıldığı söylenebilmektedir. Yalnızca PCL'den oluşturulmuş membranların fiber çaplarıyla karşılaştırıldığında HEW içeren membranların fiber çaplarının daha küçük olduğu görülmüştür bu da istenen bir özelliktir.
- HEW proteininin PCL nanofiber membran üzerinde dağılımını görebilmek için yapılan immunohistokimyasal boyama işleminin sonucunda HEW proteininin nano fiberler üzerinde homojen bir şekilde dağıldığı yani doku iskelesinin yüzeyinin her noktasında protein varlığı gösterilmiştir.
- Üretilen PCL/HEW doku iskelelerinin kimyasal yapılarının analizi FTIR spektroskopisi ile yapılmış, kompozit doku iskelelerinde protein varlığını gösteren $-NH_2$ piklerine rastlanmıştır.

- Doku iskelelerinin termal bozunma davranışlarının belirlenmesi için yapılan termogravimetrik analiz (TGA) sonucunda yalnızca PCL içeren membranın hidrofobik özelliğinden dolayı görülmeyen başlangıç su kaybı, bileşenlerin birbiri ile etkileşiminden dolayı PCL/HEW membranda %5.3 civarında görülmüştür. Kompozit nanofiberlerdeki HEW protein oranının %36 civarında olduğu saptanmıştır.
- PCL'nin hücre tutunması ve çoğalmasında olumsuz etkiye neden olan düşük hidrofilitesinin HEW proteini kullanılarak arttırıldığı, su temas açısı ölçüm işlemi sonucunda kanıtlanmıştır.
- ASC'ler ile yapılan hücre kültür çalışmaları sonucunda, PCL/HEW doku iskelelerinin hücre tutunmasını ve çoğalmasını desteklediği Alamar Blue® kiti kullanılarak kantitatif olarak analiz edilmiştir. Bunun dışında yapılan SEM analizi ve Calcein-AM boyaması sonucunda PCL/HEW membranlarda 14 gün boyunca hücre canlılığının arttığı görülmüş ve HEW proteinlerinin fiber yüzeylerinde oluşturduğu değişikliklerin hücre canlılığını ve hücresel davranışları olumlu etkilediği hipotezi desteklenmiştir.
- Aktin filamentleri ve çekirdek boyaması sonuçlarına bakıldığında PCL/HEW örnekleri üzerinde ekili hücrelerin, aktin filamentlerinin yayılarak tipik aksenel morfoloji sergiledikleri görülmektedir. Yalnızca PCL içeren örnek üzerinde ise küçük bir grup hücre hariç ekilen hücrelerin sağlıklı bir büyüme gösteremedikleri teyit edilmiştir. Bu da HEW proteinlerinin hücre morfolojisi üzerinde de olumlu etkisi olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre PCL/HEW nanofiber doku iskelelerinin yüzey özellikleri açısından yeterli özelliklere sahip olduğu ve mevcut biyobozunur sentetik polimerlere alternatif olarak doku mühendisliğinde kullanılmak üzere iyi bir potansiyel oluşturduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Barnes, C.P., et al., *Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **59**(14): p. 1413-1433.
- [2] Ergin, E., Y. Ekici, and F.B. Ataç, *Doku Mühendisliği ve Uygulama Alanları*. Türkiye Klinikleri. Tıp Bilimleri Dergisi, 2018. **38**(1): p. 70-78.
- [3] Ramalingam, M. and S. Ramakrishna, *Nanofiber composites for biomedical applications*. 2017: Woodhead Publishing.
- [4] Janmohammadi, M. and M. Nourbakhsh, *Electrospun polycaprolactone scaffolds for tissue engineering: a review*. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2019. **68**(9): p. 527-539.
- [5] Mendes, A.C., K. Stephansen, and I.S. Chronakis, *Electrospinning of food proteins and polysaccharides*. Food Hydrocolloids, 2017. **68**: p. 53-68.
- [6] O'Brien, F.J., *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. Materials Today, 2011. **14**(3): p. 88-95.
- [7] Salgado, A.J., O.P. Coutinho, and R.L. Reis, *Bone tissue engineering: state of the art and future trends*. Macromolecular bioscience, 2004. **4**(8): p. 743-765.
- [8] Lewandrowski, K.-U., et al., *Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats*. Biomaterials, 2000. **21**(8): p. 757-764.
- [9] Murugan, R. and S. Ramakrishna, *Nanophase biomaterials for tissue engineering*. Nanotechnologies for the Life Sciences: Online, 2007.
- [10] Subia, B., J. Kundu, and S. Kundu, *Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications*. Tissue engineering, 2010. **14**1.
- [11] Dhandayuthapani, B., et al., *Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review*. International journal of polymer science, 2011. **2011**.
- [12] Appel, A.A., et al., *Imaging challenges in biomaterials and tissue engineering*. Biomaterials, 2013. **34**(28): p. 6615-6630.
- [13] Maquet, V. and R. Jerome. *Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation*. in *Materials Science Forum*. 1997. Trans Tech Publ.
- [14] Vunjak-Novakovic, G. *The fundamentals of tissue engineering: scaffolds and bioreactors*. in *Novartis Foundation Symposium*. 2003. Wiley Online Library.
- [15] Ramakrishna, S., et al., *Biomedical applications of polymer-composite materials: a review*. Composites science and technology, 2001. **61**(9): p. 1189-1224.
- [16] Chan, B. and K. Leong, *Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations*. European spine journal, 2008. **17**(4): p. 467-479.

- [17] Edwards, S., et al., *Design of nonwoven scaffold structures for tissue engineering of the anterior cruciate ligament*. AUTEX Research Journal, 2004. **4**(2): p. 86-94.
- [18] Muschler, G.F., C. Nakamoto, and L.G. Griffith, *Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering*. JBJS, 2004. **86**(7): p. 1541-1558.
- [19] Drosse, I., et al., *Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach*. Injury, 2008. **39**: p. S9-S20.
- [20] Balta, U., *Yapay Tendon Olarak Kullanılmak Üzere Elektro Eğirme Yöntemi ile Doğal/Sentetik Polimerik Membranların Hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Yalova Üniversitesi, 2014.
- [21] Liu, X. and P.X. Ma, *Polymeric scaffolds for bone tissue engineering*. Annals of biomedical engineering, 2004. **32**(3): p. 477-486.
- [22] Celik, C., *Hibrit İskele Yaklaşımlarının 3B Damarlı Kemik Doku Mühendisliği Amacıyla Üretim Ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, 2015.
- [23] Chung, H.J. and T.G. Park, *Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering*. Advanced drug delivery reviews, 2007. **59**(4-5): p. 249-262.
- [24] Garg, T., et al., *Scaffold: Tissue engineering and regenerative medicine*. Int Res J Pharm, 2011. **2**(12): p. 37-42.
- [25] Hutmacher, D.W., *Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2001. **12**(1): p. 107-124.
- [26] Tuzlakoglu, K., et al., *Nano-and micro-fiber combined scaffolds: a new architecture for bone tissue engineering*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2005. **16**(12): p. 1099-1104.
- [27] Liu, C., Z. Xia, and J. Czernuszka, *Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering*. Chemical Engineering Research and Design, 2007. **85**(7): p. 1051-1064.
- [28] Arslan, A., *Poli(Bütülenadipat-Ko-Tereftalat) (Pbat) Bazlı Doku İskeleleri: Sentez, Karakterizasyon Ve Osteoblastik Aktivite*. . Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 2015.
- [29] Özdemir, D., *Kemiksi Dokuların Polimer Yöntemiyle Üretilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, 2006.
- [30] Arıkan, A., *Doku İskelelerinin Süperkritik Karbondioksit Ortamında Hazırlanması ve Karakterizasyonu*. . Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, 2013.
- [31] Singh, M.v., *Tissue Engineering Scaffolds, In: Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine*. , B.D. Ratner, Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. , Editor. 2013, Elsevier Academic Press. p. 1138-1159.
- [32] Cakir, C.Ö., *Yara/Yanık Örtü Materyali Olarak Antibakteriyel Özellik Taşıyan Gözenekli Polimerik Membranların Hazırlanması ve Karakterizasyonu*. 2013, Yalova Üniversitesi: Yalova.
- [33] Sunar, B.S. and C. Hasçıçek, *Elektroeğrilmiş Nanoliflerin İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak ve Doku Mühendisliğinde Kullanımı*. Marmara Pharmaceutical Journal, 2017. **21**(3): p. 425-435.
- [34] Sell, S.A., et al., *The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues*. Polymers, 2010. **2**(4): p. 522-553.

- [35] Wen, P., et al., *Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds*. Trends in Food Science & Technology, 2017. **70**: p. 56-68.
- [36] Hu, X., et al., *Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications*. Journal of controlled release, 2014. **185**: p. 12-21.
- [37] Sill, T.J. and H.A. von Recum, *Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering*. Biomaterials, 2008. **29**(13): p. 1989-2006.
- [38] Qu, J., et al., *Electrospun silk fibroin nanofibers in different diameters support neurite outgrowth and promote astrocyte migration*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2013. **101**(9): p. 2667-2678.
- [39] Liu, H. and Y.L. Hsieh, *Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate*. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 2002. **40**(18): p. 2119-2129.
- [40] Meechaisue, C., et al., *Electrospun mat of tyrosine-derived polycarbonate fibers for potential use as tissue scaffolding material*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2006. **17**(9): p. 1039-1056.
- [41] Megelski, S., et al., *Micro-and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers*. Macromolecules, 2002. **35**(22): p. 8456-8466.
- [42] Malafaya, P.B., G.A. Silva, and R.L. Reis, *Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications*. Advanced drug delivery reviews, 2007. **59**(4-5): p. 207-233.
- [43] Okamoto, M. and B. John, *Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds*. Progress in Polymer Science, 2013. **38**(10-11): p. 1487-1503.
- [44] Khang, G., M.S. Kim, and H.B. Lee, *A manual for biomaterials/scaffold fabrication technology*. Vol. 4. 2007: World Scientific Publishing Company.
- [45] Martins, A.J., et al., *Physical and mass transfer properties of electrospun ϵ -polycaprolactone nanofiber membranes*. Process Biochemistry, 2015. **50**(6): p. 885-892.
- [46] Griffin, M., et al., *Chemical group-dependent plasma polymerisation preferentially directs adipose stem cell differentiation towards osteogenic or chondrogenic lineages*. Acta biomaterialia, 2017. **50**: p. 450-461.
- [47] Mondal, D., M. Griffith, and S.S. Venkatraman, *Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges*. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2016. **65**(5): p. 255-265.
- [48] Guarino, V., et al., *Polycaprolactone: Synthesis, properties, and applications*. Encyclopedia of Polymer Science and Technology, 2002: p. 1-36.
- [49] Nair, L.S. and C.T. Laurencin, *Biodegradable polymers as biomaterials*. Progress in polymer science, 2007. **32**(8-9): p. 762-798.
- [50] Tokiwa, Y. and T. Suzuki, *Hydrolysis of polyesters by lipases*. Nature, 1977. **270**(5632): p. 76.
- [51] Leja, K. and G. Lewandowicz, *Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers-a Review*. Polish Journal of Environmental Studies, 2010. **19**(2).
- [52] Uhrich, K.E., et al., *Polymeric systems for controlled drug release*. Chemical reviews, 1999. **99**(11): p. 3181-3198.
- [53] Dash, T.K. and V.B. Konkimalla, *Polymeric modification and its implication in drug delivery: poly- ϵ -caprolactone (PCL) as a model polymer*. Molecular pharmaceutics, 2012. **9**(9): p. 2365-2379.

- [54] Cohn, D., et al., *Biodegradable poly (ethylene oxide)/poly (ϵ -caprolactone) multiblock copolymers*. Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 2002. **59**(2): p. 273-281.
- [55] Cohn, D. and A.H. Salomon, *Designing biodegradable multiblock PCL/PLA thermoplastic elastomers*. Biomaterials, 2005. **26**(15): p. 2297-2305.
- [56] Ali Akbari Ghavimi, S., et al., *Polycaprolactone/starch composite: Fabrication, structure, properties, and applications*. Journal of biomedical materials research Part A, 2015. **103**(7): p. 2482-2498.
- [57] Jose, M.V., et al., *Fabrication and characterization of aligned nanofibrous PLGA/Collagen blends as bone tissue scaffolds*. Polymer, 2009. **50**(15): p. 3778-3785.
- [58] Lee, S.J., et al., *Development of a composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions*. Biomaterials, 2008. **29**(19): p. 2891-2898.
- [59] Zhang, Y., et al., *Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 2005. **72**(1): p. 156-165.
- [60] Cegielska-Radziejewska, R., G. Lesnierowski, and J. Kijowski, *Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations-a review*. Polish Journal of food and nutrition sciences, 2008. **58**(1).
- [61] Omana, D.A., J. Wang, and J. Wu, *Co-extraction of egg white proteins using ion-exchange chromatography from ovomucin-removed egg whites*. Journal of Chromatography B, 2010. **878**(21): p. 1771-1776.
- [62] Miguel, M. and A. Aleixandre, *Antihypertensive peptides derived from egg proteins*. The Journal of nutrition, 2006. **136**(6): p. 1457-1460.
- [63] Mine, Y., *Egg proteins and peptides in human health-chemistry, bioactivity and production*. Current Pharmaceutical Design, 2007. **13**(9): p. 875-884.
- [64] Fujita, H., R. Sasaki, and M. Yoshikawa, *Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidylcholine*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1995. **59**(12): p. 2344-2345.
- [65] Battistuzzi, G. and M. Sola, *Fe³⁺ binding to ovotransferrin in the presence of alpha-amino acids*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1118**(3): p. 313-7.
- [66] Ibrahim, H.R., Y. Sugimoto, and T. Aoki, *Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2000. **1523**(2-3): p. 196-205.
- [67] Giansanti, F., et al., *Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin*. Biochemistry and cell biology, 2002. **80**(1): p. 125-130.
- [68] Valenti, P., et al., *Antifungal activity of ovotransferrin towards genus Candida*. Mycopathologia, 1985. **89**(3): p. 169-175.
- [69] Sugahara, T., et al., *The mode of actions of lysozyme as an immunoglobulin production stimulating factor*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2000. **1475**(1): p. 27-34.

- [70] Pacor, S., et al., *In vitro down regulation of ICAM-1 and E-cadherin and in vivo reduction of lung metastases of TS/A adenocarcinoma by a lysozyme derivative*. International journal of molecular medicine, 1999. **4**(4): p. 369-444.
- [71] Sava, G., *Reduction of B16 melanoma metastases by oral administration of egg-white lysozyme*. Cancer chemotherapy and pharmacology, 1989. **25**(3): p. 221-222.
- [72] Sava, G., *Pharmacological aspects and therapeutic applications of lysozymes*. Exs, 1996. **75**: p. 433-449.
- [73] Phillips, G.O. and P.A. Williams, *Handbook of food proteins*. 2011: Elsevier.
- [74] Watanabe, K., et al., *Antitumor effects of pronase-treated fragments, glycopeptides, from ovomucin in hen egg white in a double grafted tumor system*. Journal of agricultural and food chemistry, 1998. **46**(8): p. 3033-3038.
- [75] Nagaoka, S., et al., *Egg ovomucin attenuates hypercholesterolemia in rats and inhibits cholesterol absorption in Caco-2 cells*. Lipids, 2002. **37**(3): p. 267-272.
- [76] Nojima, T. and T. Iyoda, *Egg white-based strong hydrogel via ordered protein condensation*. NPG Asia Materials, 2018. **10**(1): p. e460.
- [77] Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. nature, 1970. **227**(5259): p. 680.
- [78] Huri, P.Y., *Effect of culture conditions on the multinucleation of human adipose-derived stem cells*. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering, 2015. **5**(3): p. 234-240.
- [79] Rampersad, S.N., *Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays*. Sensors, 2012. **12**(9): p. 12347-12360.
- [80] Hamid, R., et al., *Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening*. Toxicology in vitro, 2004. **18**(5): p. 703-710.
- [81] Tang, X., S.A. Lancelle, and P.K. Hepler, *Fluorescence microscopic localization of actin in pollen tubes: comparison of actin antibody and phalloidin staining*. Cell motility and the cytoskeleton, 1989. **12**(4): p. 216-224.
- [82] Smith, P.J., M. Wiltshire, and R.J. Errington, *DRAQ 5 Labeling of Nuclear DNA in Live and Fixed Cells*. Current protocols in cytometry, 2004. **28**(1): p. 7.25. 1-7.25. 11.
- [83] Hsieh, J.-F. and S.-T. Chen, *Comparative studies on the analysis of glycoproteins and lipopolysaccharides by the gel-based microchip and SDS-PAGE*. Biomicrofluidics, 2007. **1**(1): p. 014102.
- [84] Miguel, M., et al., *Comparative study of egg white proteins from different species by chromatographic and electrophoretic methods*. European Food Research and Technology, 2005. **221**(3-4): p. 542-546.
- [85] Kuppan, P., S. Sethuraman, and U.M. Krishnan, *PCL and PCL-gelatin nanofibers as esophageal tissue scaffolds: optimization, characterization and cell-matrix interactions*. J Biomed Nanotechnol, 2013. **9**(9): p. 1540-55.
- [86] Phillipson, K., J. Hay, and M. Jenkins, *Thermal analysis FTIR spectroscopy of poly (ϵ -caprolactone)*. Thermochimica acta, 2014. **595**: p. 74-82.
- [87] Barth, A., *Infrared spectroscopy of proteins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2007. **1767**(9): p. 1073-1101.

- [88] Keselowsky, B.G., D.M. Collard, and A.J. Garcia, *Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding*. *Biomaterials*, 2004. **25**(28): p. 5947-54.
- [89] Heydari, Z., D. Mohebbi-Kalhari, and M.S. Afarani, *Engineered electrospun polycaprolactone (PCL)/octacalcium phosphate (OCP) scaffold for bone tissue engineering*. *Materials Science and Engineering: C*, 2017. **81**: p. 127-132.
- [90] Chakrapani, V.Y., et al., *Electrospinning of type I collagen and PCL nanofibers using acetic acid*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2012. **125**(4): p. 3221-3227.
- [91] Ahn, H.H., et al., *Cellular behavior of human adipose-derived stem cells on wettable gradient polyethylene surfaces*. *International journal of molecular sciences*, 2014. **15**(2): p. 2075-2086.
- [92] Abbasi, N., et al., *The Effects of Plasma Treated Electrospun Nanofibrous Poly (epsilon-caprolactone) Scaffolds with Different Orientations on Mouse Embryonic Stem Cell Proliferation*. *Cell J*, 2014. **16**(3): p. 245-54.
- [93] Li, J., et al., *Evaluation of 3D-Printed Polycaprolactone Scaffolds Coated with Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma for Bone Regeneration*. *Materials (Basel, Switzerland)*, 2017. **10**(7): p. 831.
- [94] Chen, M., et al., *Improvement of Distribution and Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Hyaluronic Acid and β -Tricalcium Phosphate-Coated Polymeric Scaffold In Vitro*. *BioResearch open access*, 2015. **4**(1): p. 363-373.
- [95] Faucheux, N., et al., *Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies*. *Biomaterials*, 2004. **25**(14): p. 2721-30.
- [96] Wang, Y., et al., *Effects of surface functional groups on proliferation and biofunction of Schwann cells*. *Journal of Biomaterials Applications*, 2016. **30**(10): p. 1494-1504.
- [97] Zou, C., K. Kobayashi, and A. Kato, *Effects of Chicken Egg-White on the Proliferation and Neurite Outgrowth of Mammalian-Cells*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991. **39**(12): p. 2137-2141.
- [98] Luo, B. and C. Choong, *Porous ovalbumin scaffolds with tunable properties: A resource-efficient biodegradable material for tissue engineering applications*. *Journal of Biomaterials Applications*, 2014. **29**(6): p. 903-911.
- [99] Farrar, G., J. Barone, and A. Morgan, *Ovalbumin-based porous scaffolds for bone tissue regeneration*. *Journal of tissue engineering*, 2010. **2010**: p. 209860-209860.
- [100] Hersel, U., C. Dahmen, and H. Kessler, *RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond*. *Biomaterials*, 2003. **24**(24): p. 4385-415.

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad: Nergis Zeynep RENKLER DEĞİRMENCI

Doğum Yeri ve Tarihi: Bursa – 22.10.1992

E-Posta: nzrenkler@gmail.com

Eğitim

Lisans

Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye, 2011

Yüksek Lisans

Yalova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Polimer Mühendisliği Anabilim Dalı, Yalova, Türkiye, 2019

Mesleki Deneyim

Ziyaretçi araştırmacı; University of Minho, School of Medicine, Neuroscience Lab, Braga, Portekiz, Kasım 2018

Ziyaretçi araştırmacı; University of Minho, School of Medicine, Neuroscience Lab, Braga, Portekiz, Ağustos 2017

Staj; Yalova Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı, Yalova, Türkiye, Ağustos 2014

Araştırma Deneyimi

Omurilik Hasarlarının Biyobozunur Üç boyutlu Matriks Yardımı ile Tedavisi, TÜBİTAK 215M019, Portekiz-Türkiye İkili İşbirliği Projesi(2017-2020), Bursiyer.

Ödüller ve Sertifikalar

Rudolf Cimdins Scholarship, The European Society for Biomaterials, 2018

GMP İyi Üretim Uygulamaları- TSC Akademi- İzmir, Aralık 2013

GLP İyi Laboratuvar Uygulamaları- TSC Akademi- İzmir, Aralık 2013

ISO 9001:2015 Kalite Yönetim Sistemleri- Yalova Üniversitesi SEM- Yalova, Mayıs 2018

Yayın ve Patent Listesi

Uluslararası Yayınlar

Z.B. Ahi, **N.Z.Renkler**, M.Gül Şeker, K.Tuzlakoglu, "Biodegradable polymer films with a natural antibacterial extract as novel periodontal barrier membranes" International Journal of Biomaterials, vol. 2019, Article ID 7932470, 7 pages, 2019.

S.D. Çetmi, **N.Z. Renkler**, A.Köse, C.Celik, S.S. Oncel, “Preperation of electrospun PCL nanofiber mats loaded with microalgal extracts” Engineering in Life Sciences 2019.

Uluslararası Bildiriler

N.Z. Renkler, S.Odabas, K.Tuzlakoglu “Design Of A Novel 3D Combined Bioactive Tissue Matrices For Skeletal Muscle Tissue Repair” 30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials, Dresden, Germany, Eylül 2019.

A. Cakir, B. Baykus, **N.Z. Renkler**, K. Tuzlakoglu “Biomimetic apatite coating onto 3d printed scaffolds for bone tissue engineering applications” International Symposium on 3D Printing in Medicine, Ankara, Turkey, Kasım 2018.

N.Z. Renkler, E. Ergene, Ş. Gokyar, P. Yılgor Huri, K. Tuzlakoglu, “Evaluation of electrospun polycaprolactone/egg white protein scaffolds interaction with adipose derived stem cell” 29th European Conference on Biomaterials, Maastricht, Netherlands, Eylül 2018.

S.D. Cetmi, **N.Z. Renkler**, A. Kose, C. Celik, A. Sendemir, S. Oncel “Utilization of microalgal extracts for construction of tissue scaffolds with electrospinning techniques” VII. International Bioengineering Congress, Izmir, Turkey, Kasım 2015

Z.B. Ahi, **N.Z. Renkler**, E. Tekay, M. Gül Şeker, K. Tuzlakoglu, “Novel PLLA/PCL films with natural antibacterial extracts for guided tissue regeneration”, 20th International Symposium on Biomedical Science and Technology-BIOMED 2014, Köyceğiz, Muğla, Türkiye, Ağustos 2014.

Ulusal Bildiriler

N.Z. Renkler, S. Odabaş, K. Tuzlakoglu, “İskelet kas dokusuna özgü 3 boyutlu biyoaktif polimer temelli doku matrikslerinin geliştirilmesi” 5.Biyomalzeme Günleri-Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye, Ekim 2018.

Z.B.Ahi, **N.Z. Renkler**, K. Tuzlakoglu, “Omurilik hasarlarının tedavisi için çift katmanlı kolajen bazlı matriks geliştirilmesi ve karakterizasyonu”, 4. Biyomalzeme Günleri, Yalova, Türkiye, Ekim 2017.

Kitap Bölümleri

Z.B. Ahi, **N.Z. Renkler**, K. Tuzlakoglu, “Doku Mühendisliğinde Farklı Uygulamalar İçin Çok Katmanlı Doku İskeleleri”, İleri Biyomalzemeler: Biyomalzeme Ve Nanomalzeme Uygulamaları, Hacettepe Yayınları, 2008, 165-179 pp

Tez Çalışmaları

Haematococcus pluvialis mikroalginden astaksantin üretimi ve algal ekstrakt içeren doku iskelesi oluşturulması (2015), Lisans Tezi, Danışman: Doç.Dr. Suphi Öncel, İkinci Danışman: Doç.Dr. Aylin Şendemir

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

N.Z. Renkler, E. Ergene, Ş. Gokyar, P. Yılgor Huri, K. Tuzlakoglu, “Evaluation of electrospun polycaprolactone/egg white protein scaffolds interaction with adipose derived stem cell” 29th European Conference on Biomaterials, Maastricht, Netherlands, Eylül 2018.