

DEMET ERDAĞ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2019





**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİYOBOZUNUR VE BİYUYUMLU POLİMERLERİN İN
VİTRO UYGULAMALARI**

DEMET ERDAĞ

**DANIŞMAN
PROF. DR. LEMAN YALÇINTEPE
GÜNEŞTUTAR**

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BİYOFİZİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans öğrencisi Demet Erdağ tarafından Prof. Dr.Leman Yalçıntepe Güneştutar'ın danışmanlığında hazırlanan "Biyobozunur ve Biyoyumlu Polimerlerin İn Vitro Uygulamaları" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 25/01/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı
Prof.Dr.Muhammet BEKTAŞ
İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı



Jüri-Danışman
Prof.Dr.Leman YALÇINTEPE GÜNEŞTUTAR
İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı



Jüri
Prof.Dr.Serkan Naci KOÇ
İ.Ü.Cerrahpaşa Mühendislik Fakültesi
Kimya Mühendisliği

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Demet ERDAĞ

İTHAF

Sevgili babam Metin Erdağ, annem Gülümzer Erdağ, kardeşlerim Serhat ve Arzu Erdağ, Rukiye ve Murat Şahin, Levent Erdağ, yeğenlerim Elif Erdağ, Mert Erdağ ve yakında dünyaya gözlerini açacak olan minik yeğenime ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde mesleki bilgi ve birikimleri ile sonsuz desteğini esirgemeyen ve beni aydınlatan Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden başta tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Leman Yalçın-tepe Güneş-tutar, yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Muhammet Bektaş ve bu süreçte birlikte olmaktan büyük mutluluk duyduğum tüm Biyofizik Anabilim Dalı çalışanlarına, benden desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Serkan Naci Koç ve sevgili eşi Ebru Koç, Dr. Öğr. Üyesi Murat Şimşek, Arş. Gör. Hasan Özdemir, Arş. Gör. Sibel Küçükertuğrul ve Emrah Aksoy'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:31320

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. DOKU MÜHENDİSLİĞİ.....	5
2.1.1. Jelatin (JE).....	9
2.1.2. Poli (vinil) alkol (PVA).....	10
2.1.3. Elektroeğirme Yöntemi.....	10
2.1.4. Dondurma/Kurutma Yöntemi	11
2.1.5. Sodyum Selenit (Selenyum).....	12
2.2. PVA/JE Doku İskelelerinin Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler.....	13
2.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	13
2.2.2. Şişme Analizi	13
2.2.3. Sitotoksosite Analizleri	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. GEREÇLER	15
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	15
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kitler.....	15
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	16
3.1.4. Sarf Malzemeleri.....	16
3.1.5. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	17
3.1.6. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı	17

3.2. YÖNTEMLER.....	17
3.2.1. Hücre Kültür Çalışmaları.....	17
3.2.2. Hücrelerin Dondurulması ve Çözülmesi.....	17
3.2.3. PVA/JE Çözeltilsinin Hazırlanması ve Elektroğirme Yöntemi.....	18
3.2.4. PVA/JE Çözeltilsinin Hazırlanması ve Dondurma/Kurutma Yöntemi.....	19
3.2.5. PVA/JE Polimerik Doku İskelelerinin Karakterizasyon İşlemi.....	20
3.2.6. Su Emme Kapasite (Şişme Oranı) Testi.....	21
3.2.7. Sitotoksisite Analizi.....	21
4. BULGULAR.....	23
4.1. PVA/JE Polimerik Doku İskelelerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Morfolojik Karakterizasyonu.....	23
4.2. Şişme Analizi.....	26
4.3. Sitotoksisite Analizleri.....	28
4.3.1. Selenyum Sitotoksisite Analizi.....	28
4.3.2. Elektroğirme PVA/JE Doku İskelelerinin Sitotoksisite Analizi.....	29
4.3.3. Dondurma/Kurutma PVA/JE Doku İskelelerinin Sitotoksisite Analizi.....	31
5. TARTIŞMA.....	34
KAYNAKLAR.....	37
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	47

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3-1 Dondurma/kurutma yöntemi ile hazırlanan doku iskelesinin hazırlanış koşulları	20
Tablo 4-1 Elektroğirme PVA/JE doku iskelelerinin % canlılık oranları ($p < 0,05$)	31
Tablo 4-2 Dondurma/kurutma (5) PVA/JE doku iskelelerinin % canlılık oranları ($p < 0,05$).....	33
Tablo 4-3 Dondurma/kurutma (8) PVA/JE doku iskelelerinin % canlılık oranları ($p < 0,05$).....	33



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Doku mühendisliği bileşenleri (Çakmak, 2015).....	7
Şekil 2.2 Doku mühendisliği üçgeni, biyosinyaller (kimyasal olarak büyüme faktörleri veya fiziksel olarak bir biyoreaktör tarafından sağlanır) ve doku iskelesi (Hücrelerin göç etmesini, yapışmasını ve çoğalmasını sağlayan doku oluşumu için bir şablon görevi görür)	9
Şekil 2.3 Elektroğirme aparatları ve elde edilen nanofiber iskele yapısı (Pilehvar-Soltanahmadi ve ark. 2016).	11
Şekil 3.1 Elektroğirme yöntemi ile elde edilen PVA/JE nanofiber iskele	19
Şekil 3.2 Dondurma/kurutma yöntemi ile elde edilen PVA/JE polimerik iskele	20
Şekil 4.1 Dondurma/kurutma PVA/JE iskelelerinin SEM Görüntüleri. A) 5 ml GP ilaveli hücreli dondurma/kurutma doku iskelesi (250x), B) 5 ml GP ilaveli hücreli dondurma/kurutma doku iskelesi (4000x), C) 8 ml GP ilaveli hücreli dondurma/kurutma doku iskelesi (250x), D) 8 ml GP ilaveli hücreli dondurma/kurutma doku iskelesi (4000x).....	23
Şekil 4.2 Dondurma/kurutma doku iskeleleri SEM gözenek görüntüleri. A) 5 ml GP’li dondurma/kurutma iskeleleri (500x) , B) 8 ml GP’li dondurma/kurutma iskeleleri (500x), (C) 8 ml dondurma/kurutma iskeleleri (250x)	24
Şekil 4.3 Elektroğirme doku iskeleleri SEM gözenek görüntüsü	24
Şekil 4.4 8 ml GP içeren dondurma/kurutma doku iskelesi (48 saat ‘lik SEM görüntüsü)	25
Şekil 4.5 PVA/JE elektroğirme nanofiber doku iskeleleri SEM görüntüleri. A) Hücreli elektroğirme doku iskelesi (20000x), B) Hücreli elektroğirme doku iskelesi (2000x).....	25
Şekil 4.6 Elektroğirme PVA/JE iskelelerinin ters mikroskop altındaki görüntüleri. A) Hücreli elektroğirme PVA/JE doku iskeleleri görüntüleri, B) Hücreli elektroğirme PVA/JE doku iskeleleri görüntüleri	26
Şekil 4.7 5 ml GP içeren PVA/JE iskeleleri ve 8 ml GP içeren PVA/JE iskeleleri dondurma/kurutma iskeleleri şişme oranları.....	27
Şekil 4.8 Elektroğirme PVA/JE iskeleleri şişme oranları	28
Şekil 4.9 Selenyumun 3T3 hücreleri ile 24, 48, 72 saat MTT canlılık analizleri	29

- Şekil 4.10 Elektroğirme iskelelerin 24, 48, 72 saat MTT analizleri.). 1. Hücre/medyum (h/m), 2. Hücre/medyum / selenyum (h/m/se), 3. Hücre/medyum doku iskelesi (h/m/i), 4. Hücre/medyum doku iskelesi / selenyum (h/m/i/se). (p < 0,05)..... 30
- Şekil 4.11 5 ml GP içeren dondurma/kurutma iskelelerin MTT analizleri). 1. Hücre/medyum (h/m), 2. Hücre/medium/selenyum (h/m/se), 3. Hücre/medium/doku iskelesi (h/m/i), 4. Hücre/medium/doku iskelesi/selenyum (h/m/i/se). (p < 0,05) 32
- Şekil 4.12 8 ml GP içeren dondurma/kurutma iskelelerin MTT analizleri). 1. Hücre/medyum (h/m), 2. Hücre/medium/selenyum (h/m/se), 3. Hücre/medium/doku iskelesi (h/m/i), 4. Hücre/medium/doku iskelesi/selenyum (h/m/i/se). (p < 0,05) 33



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

3T3	Fare Fibroblast Hücre Soyusu
JE	Jelatin
PVA	Polivinil Alkol
GA	Gluteraldehit
GP	Genipin
Se	Selenyum
nM	Nano molar
μ M	Mikro molar
MTT	4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR)
UV	Ultraviyole (morötesi)

ÖZET

Erdağ, D. Biyobozunur ve biyouyumlu polimerlerin *in vitro* uygulamaları. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul 2019.

Son yıllarda doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanındaki gelişmeler, biyo-polimerlerden hazırlanan gözenekli yapay doku iskelelerinin oluşturulmasında önem olmuştur (Arıkan 2013). Bu tez çalışmasında, toksik özelliği olmayan, biyouyumlu ve biyobozunur polivinil alkol (PVA) ve jelatin (JE) polimerinlerden elde edilen üç boyutlu ve gözenekli yapay doku iskelelerine 3T3 fare fibroblast hücrelerin ekilmesi ve selenyumun iskele üzerindeki hücre canlılığına ve proliferasyona etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, % 8 PVA / % 10 JE (1:1) karışımı elde edildikten sonra elektroğirme ve dondurma/kurutma yöntemleri kullanılarak çapraz bağlanmış yapay doku iskeleleri hazırlanmıştır. Selenyumun hücre canlılığı üzerindeki etkin dozunun belirlenmesi için selenyum sitotoksikite deneyleri yapılarak ideal doz 200 nM kaydedilmiştir.

Elektroğirme ve dondurma/kurutma yöntemi ile oluşturulan PVA/JE doku iskeleleri % 0,75 genipin (GP) ve % 2 gluteraldehit (GA) ile çapraz bağlandı. Elde edilen bu gözenekli yapay doku iskelelerinin morfolojik yapısı, gözenek çapı taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Daha sonra iskeleler, laminar akım kabini içinde 30 dakika UV ile dezenfekte edilip 24 kuyulu hücre plakalarına alınarak 3T3 deri hücreleri ile 24 saat inkübe (37 °C, % 5 CO₂) edilmiştir. Hücrelerin iskele üzerinde tutunmasının ardından selenyumlu ve selenyumsuz olarak MTT analiz testleri yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, iskelelerin birbiri ile bağlantılı uygun gözenek yapılarının olduğu ve hücrelerin gözeneklere tutunduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanında, selenyumun iskele üzerinde ekili hücrelerin canlılığı ve çoğalmayı artırdığı incelendi. Sonuç olarak, selenyumun yara iyileştirmelerinde kullanılan doku iskeleleri ile birlikte yara iyileştirmelerini hızlandıracağı düşünülmektedir. Bir sonraki adımda, selenyum ve PVA/JE doku iskelelerinin sinerjik etkilerini gözlemek üzere *in vivo* çalışmalar planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: 3T3; PVA; jelatin; selenyum; doku iskeleleri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31320

ABSTRACT

Erdag, D. *In vitro* applications of biodegradable and biocompatible polymers. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Biophysics. Master Thesis. Istanbul 2019.

Recent advances in methods used in tissue engineering and regenerative medicine have aroused interest in the creation of porous artificial scaffolds prepared from biopolymers (Arikan 2013). The aim of this thesis, to observed effects of selenium to proliferation and viability of cells seeded on the tissue scaffolds which have nontoxic, biodegradeble and biocompatible cross linked and pores tissue scaffolds were formed from PVA 8 % and GE 10 % polymers as using electrospinnig and freeze drying tecniques. Results of selenium citotoxicity experiments were made with MTT analysis test were showed ideal dose was 200 nM.

PVA/GE tissue scaffolds were crosslinked with 0,75 % genipin (GP) and 2 % gluteraldehyde (GA). The morphology of the scaffolds, the pore diameter, the images of the cells adhered were examined using SEM. It was disinfected in a laminar flow cabinet for 30 minutes with UV and then put into 24-well cell plates and incubated with 3T3 skin cells for 24 hours (37 °C, 5 % CO₂.) Following the adherent of the skin cells on the scaffold, MTT analysis tests were carried out with and without selenium. It has been observed that the scaffolds have appropriated interconnected pore structures and that the skin cells atherented to the pores. Selenium was observed increased the viability and proliferation of skin cells on the scaffolds. Considering the results, selenium is thought to accelerate wound healing with tissue scaffolds used in wound healing. In the next studies, wound healing rates of selenium will be carry out *in vivo* on scaffolds.

Key Words: 3T3; PVA; gelatin; selenium; tissue scaffold

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 31320

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Canlı sağlığı bakımından doku/organ kaybı veya hasarı, hem moral hem de maliyet olarak sıklıkla görülen ciddi sağlık problemleri arasındadır. Günümüzde doku/organ hasarı veya kayıp durumunda, yapısal fonksiyonlarını geliştirip işlevsel duruma getirebilmek için, tıp ve mühendisliğin ortak uygulamalarını oluşturan doku mühendisliği alanı, bilim insanları arasında ilgi uyandırmıştır (Langer ve Vacanti 1993).

Doku mühendisliği hastadan veya donörden elde edilen hücrelerin büyüme faktörleri ile birlikte yapay olarak elde edilen doku iskelelerinde çoğaltılarak hastanın lezyon bölgesine yerleştirilmesi temeline dayanır. Doku mühendisliğinde geçmişten bugüne araştırma faaliyetleri gittikçe artış göstermektedir. Fakat, kompleks organların çalışılmasının zor olmasından dolayı klinik çalışmaların sayısı ve ticari ürünler halen azınlıktadır. Bu ticari ürünler ağırlıkla basit yapıda olan, çok hücre çeşitine ihtiyaç duymayan ve damarlaşmaya gerek duymayan deri dokusu ürünleri oluşturmaktadır (Gümüşderelioğlu 2010).

Son otuz yıldaki çalışmalarda, “Yara iyileşmesi” çalışmalarına yönelik çok sayıda deri ürünleri (iskeleleri) elde edilmiştir. Bu malzemeler, hasarlı bölgenin özelliğine uygun yapılar olarak elde edilir. Kolajen, hiyalüronik asit veya bunlar gibi uygun biyopolimerlerden elde edilen yapay doku iskeleleri türlü deri hücrelerinin (fibroblast, melanosit gibi) ekilmesi ile hazırlanır. Ticari olarak bu ürünleri bulmak mümkün (Gümüşderelioğlu 2010).

Üç boyutlu, biyobozunabilir, biyouyumlu polimerik doku ürünleri, biyolojik olarak aktif, destekleyici, güçlendirici gibi önemli bir görevler üstlenir (Qingpu ve ark. 2003). Aynı zamanda polimerik doku iskeleleri hücreler için kalıcı olmayan ekstrasellüler matriks görevini üstlenerek hücrelerin çoğalmasına yardımcı olur (Karakeçili 2006). Polimerik doku iskelelerinin fiziksel, mekanik ve biyolojik özellikleri, hasarlı veya kaybolan dokunun özellikleri ile uyumlu olacak şekilde geliştirilmelidir. Doku iskeleleri uygun bozunma hızına, yeterli mekanik dayanıma, hücrelerin üremesi ve göç edebilmesinin yanı sıra, besin ve atıkların difüzyonuna olanak sağlayacak gözenekli yapıya ve hücre çoğalmasını sağlayacak yüzey özelliklerine sahip olması istenen üç boyutlu yapılardır (Kim ve ark. 2011). Bununla birlikte, vücut içine yerleştirilecek doku iskelesi yapımında kullanılan biyomalzemeler vücutta

gereksiz tepkilere yol açmayacak derecede biyouyumlu ve biyobozunur olmalıdır. Ayrıca, bu yapay iskele toksik özellik göstermemelidir (Gümüşderelioğlu 2007).

Polimerik iskele tasarlamada en önemli faktörlerden biri, iskelelerin biyouyumluluğudur. Bu da doku iskelesinin bağışıklık reddi olmaması veya olumsuz bir inflamatuvar yanıt ortaya çıkarmamasıdır (Babensee ve ark. 2000). Biyolojik olarak bozunabilen polimerler, diğer doku mühendisliği materyallerine alternatif olarak önerilmiştir ve kullanımı oldukça yaygındır. Bu polimerlerden biyobozunur ve biyouyumlu özelliklere sahip Polivinil alkol (PVA) ve jelatin (JE), implant malzemeleri, ilaç taşıyıcıları ve doku iskeleler olarak geniş uygulamalara sahiptir (Yanzhong ve ark 2005; Yang ve ark. 2007; Vrana ve ark. 2008; Liu X ve ark 2009; Jegal ve Lee 1999; Habraken ve ark.2009).

Poli (vinil alkol) (PVA), hidrofilik, iyi derecede kimyasal ve termal kararlılığı olan yarı kristal bir polimerdir (Qin ve Wank 2006). PVA'nın en bilinen avantajı, fizyolojik ortamlarda biyobozunabilir özellikte olmasıdır. PVA toksik olmayan bir maddedir, temas halinde cilde herhangi bir zarar vermez. Test edildiğinde, hayvanlar üzerinde olumsuz bir etkiye rastlanmamıştır. Ancak, eğer PVA deri altına veya akciğerlere enjekte edilirse, doku tarafından bozunuma uğramaz, yabancı bir cisim gibi *in situ* olarak kalır (Steinbu ve Matsumura 2002).

Jelatin (JE), kollajenden elde edilen, glisin, prolin, glutamik asit, hidroksprolin, alanin, aspartik asit ve diğer amino asitler gibi bir çok fonksiyonel grup içeren doğal, biyobozunabilir, biyouyumlu bir polimerdir. Mükemmel biyouyumluluk ve biyobozunabilirliği olan jelatin, yara, cerrahi tedaviler, kemik, deri ve kırık gibi birçok doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır. (Chen ve ark. 2009; Li ve ark. 2006; Zhang ve ark 2005; Liu ve ark. 2009). Jelatin, kollajen gibi doğal bir polimer olduğundan deri doku mühendisliği uygulamalarında yara sargı malzemelerinin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Choi ve ark. 1999; Choi ve ark. 1999a; 2001b).

Yapay doku iskelesi üretmede kullanılan yöntemler, doku iskelelerinin dış görünüşünü, morfolojisini, mekanik özelliklerini ve biyouyumluluğunu etkilemektedir. Bu yöntemlerden bazıları, çözücü döküm/partikül uzaklaştırma, faz ayrımı, fiber bağlama, elektroçirime, dondurarak kurutma, gaz köpükleştirme, eriyik kalıplama ve hızlı prototip gibi yöntemlerdir. Yöntemlerin bir kısmında organik çözücülere

gereksinim vardır (Singh ve ark. 2013). Toksik olabilen bu çözücüler, çok miktarda kullanılma durumları olabiliyor. Bu çözücüler yapıdan uzaklaştırılmadığında hücrenin tutunması ve çoğalması zarar görebilir. Böyle durumlardan etkilenmemek için ek kurutma işlemlerine ihtiyaç duyulabilmektedir (Liu ve ark. 2007; Singh ve ark. 2013).

Nanofiber yapıda iskele elde etmek için faz ayırma (Zhang ve ark. 2001), kendinden montaj (Paramonov ve ark. 2006), şablon sentezi (Rambo ve ark. 2008) ve elektrospinning gibi çeşitli yöntemler bilinmektedir.

Elektroçirime tekniği, diğer nanofiber üretim teknikleri ile karşılaştırıldığında, polimerik nanofiberler üretmek için kolay, yüksek verime sahip, maliyeti düşük ve spesifik oryantasyonlu nanofiberler oluşturabilen bir yöntemdir (Pilehvar-Soltanahmadi ve ark. 2018). Bu yöntem, birbiri ile ilişkili gözenek yapısı olan, yüksek gözeneklilik, geniş yüzey alanı, üstün gerilme mukavemeti ve daha birçok benzersiz özelliklere sahip doğal ve sentetik biyopolimerler kullanılarak çapları mikrometre ve nanometre arasında olan ultra-ince lifler üretebilir (Pilehvar-Soltanahmadi ve ark. 2016). Elektroçirime nanofiber iskeleleri göze çarpan bu özellikleri sayesinde, yara sargı uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Rieger ve ark. 2013; Abrigo ve ark. 2014).

Polimerik doku iskelesi üretimde kullanılan farklı bir teknik ise dondurma/kurutma yöntemidir. Bu yöntemde, çeşitli istenilen büyüklükte gözeneği olan iskeleler elde etmek kolay olmasının yanında kullanışlıdır. Bu teknikle hazırlanan iskeleler dondurulmuş olarak liyofilizatör cihazında vakumlanarak kalan su ortamdan uzaklaştırılır. İskelelerin çok gözenekli yapıda olması, hücrelerin beslenmesine yardımcı olması ve üretilen artıkların atılmasında da avantaj sağlar. (Xiao ve ark. (2011). Gözenek boyutunun istenilen boyutta (küçük veya büyük) hazarılanaabileceği polimerik iskeleleri bu yöntemle elde edilmesi mümkündür. (Singh ve ark. 2013).

İskelelerin karakterizasyon işlemlerinde; morfolojik yapısının incelenmesinde taramalı elektron mikroskobu (SEM), şişme deneyleri ve sitotoksisite analizleri yapılmıştır. İstatistiklerde student-t testi kullanılmıştır.

Elde edilen iskele üzerine hücreler ekilir ve doku oluşumu boyunca hücrelerin çoğalma, göç etme ve farklılaşma gibi fonksiyonlarının devam etmesi beklenir (Gümüşderelioğlu 2010). Bu işlevleler için dışarıdan destek maddeler kullanılmaktadır. Bu çalışmada, birçok biyolojik fonksiyonda önemli rol oynayan temel bir eser element olan selenyum (Nazıroğlu ve Yürekli 2013) destek madde olarak kullanılmıştır.

Selenyumun eser miktarları, insanlar dahil tüm memelilerde yaşam için hücresel işlevler ve antioksidan özelliklere sahip birkaç selenoproteinlerin sentezlenmesi için önemlidir (Hatfield 2016; Babensee 2000; Labunskyy ve Hatfield 2014). Antioksidazın (glutasyon peroksidaz) önemli bir bileşeni olan selenyum, vücutta E vitamini ile serbest radikal homeostazisini korur (Nazıroğlu ve ark. 2004). Ayrıca selenyumun etkin bir antikanser ajan olduğu bilinmektedir (Tran ve ark. 2010).

Bu tez çalışmasında, selenyumun antibakteriyel, toksisiteyi azaltıcı ve hücrelerin çoğalması gibi özelliklerinden faydalanılarak elektroğirme ve dondurma/kurutma yöntemlerinden elde edilen hücre ekilmiş gözenekli yapay doku iskelelerine takviye edilmesi ile iskelelerin işlevselliğine yönelik etkileri incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Doku mühendisliği, altta yatan patolojiyi düzeltmek amacıyla organ işlevini koruma, yenileme veya onarımı için biyomalzemelerin kullanımı olarak tanımlanabilir. Bu biyomalzemeler küçük moleküller, hücreler, genler veya gen ürünleri içeren veya içermeyen yapılar olabilmektedir (Pablo ve ark. 2004). Bu yeni tıp alanı, hücre, doku ve sentetik materyallerin mühendislik yöntemleri kullanımıyla hastanın yaşamını uzatabilme ve kolaylaştırmaya dayanmaktadır. Şu anda, organ veya doku kaybı için tedaviler arasında organ nakli, cerrahi rekonstrüksiyon, mekanik cihazların kullanımı ve yakın zamanda hücresele tedavi yer almaktadır (Langer ve Vacanti 1997).

Doku ve hücre temelli ürünlerin araştırılması ve geliştirilmesi, rejeneratif tıp alanının ilerlemesine birçok yaklaşımla katkıda bulunmuştur. Bu da, birden fazla hücre hattının kullanılmasını ve hücre dışı bir matrisi içerir. Böylece hücre-hücre etkileşimleri ve hücre-matris etkileşimleri yoluyla aradaki iletişimin artmasına kolaylık sağlayan bir doku mimarisi oluşturur. Bu etkileşimlerde, çeşitli sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınması aracılığı ile dokuyu desteklemek ve işlevselliğini sağlamak için esastır (Pablo ve ark. 2004).

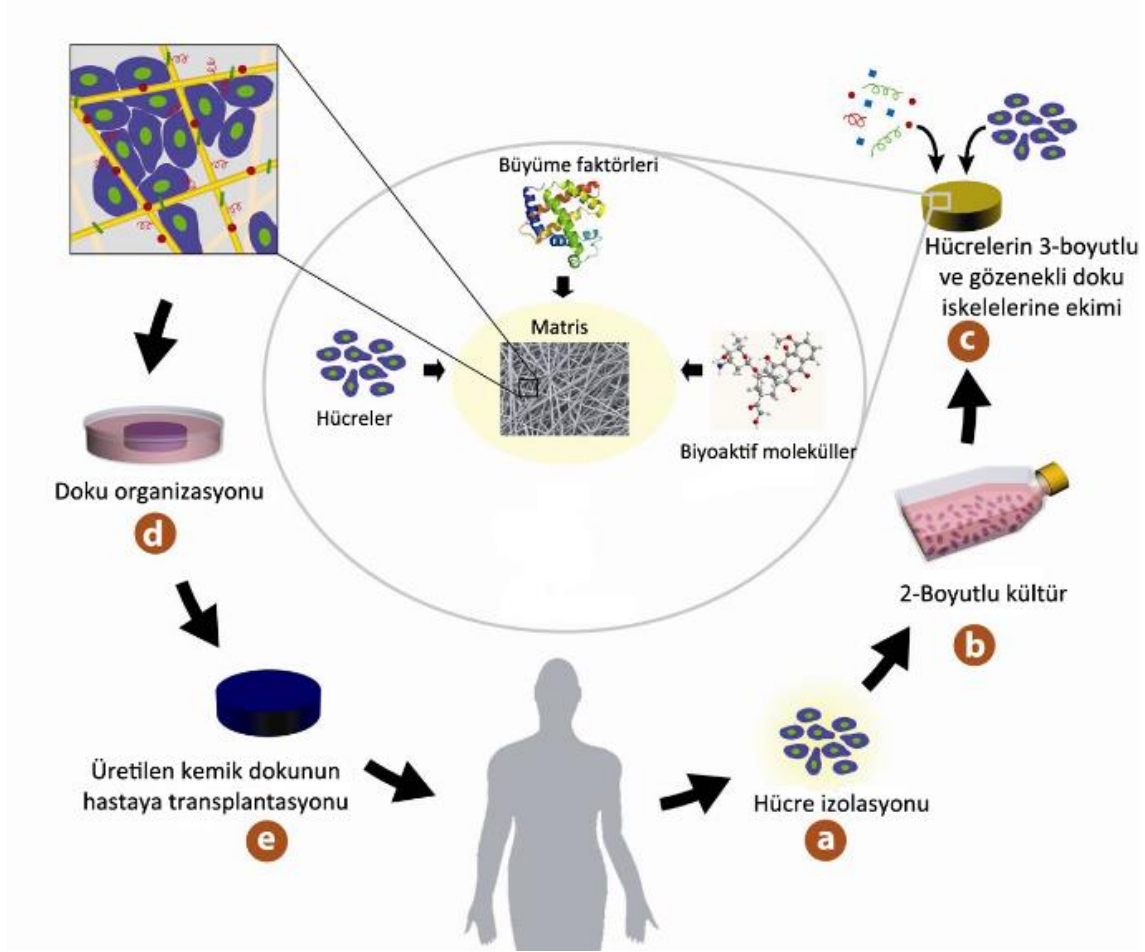
Doku mühendisliği yaklaşımı, trasplantasyon cerrahisi temellidir. Hastadan hücrelerin biyopsi yöntemiyle alınmasıyla doku iskelesi veya biyopolimerlerden elde edilen yapay destek dokuları üzerinde, gerekli biyosinyal moleküllerinin de eklenmesiyle birlikte kültüre edilmesi ve oluşturulan bu yapının vücuttaki hasarlı veya kayıp bölgeye implante edilmesiyle doku rejenerasyonunun gerçekleşmesi yöntemidir (Langer ve Vacanti 1993, Gümüşderelioğlu 2007).

Hasarlı veya kayıp bölgeye yapay dokunun implante edilmesinde, doğrudan hastanın kendisinden izole edilen hücreler kullanılarak vücudun organı reddetmesi ve enfeksiyon riski gibi engellerin ortadan kalkması bu yöntemin kullanılmasında büyük avantaj sağlamıştır. Bu sebeple *in vitro* koşullarda yeni dokunun üretilmesi ve vücuttaki hasarlı bölgeye implante edilmesi donör organ naklinde de önemli adımlardan biri sayılmıştır (Reverchon ve Cardea 2012).

Günümüzdeki çalışmalarda, doku mühendisliği ürünlerinin geliştirilmesinde üç genel strateji kullanılmaktadır. Bunlardan ilki, ekstrasellüler matriks olmadan sadece hücrelerin kullanımını içerir. Bu yöntemde hücreler, hasarlı veya yaralı organ/dokuya nakledildiğinde onların işlevlerini geri kazandırmayı amaçlar. Bu yaklaşım kök hücre tedavisi ve otolog hücre nakli gibi yöntemlerle yapılmaktadır. İkinci strateji, sentetik polimerlerin veya biyomalzemelerin geliştirilmesidir. Bunlar tek başına kullanıldığı gibi kontrollü bir şekilde salınabilecek büyüme faktörleri ve sitokinler gibi proteinlerin eklenmesiyle de organ sistemi işlevini geri kazanmaya yarayan yapay doku iskeleleridir. Son terapötik yaklaşım ise, hücrelerin 3 boyutlu bir matris içinde kullanılmasını içerir. Örneğin, keratinositler ve fibroblastlardan oluşan çift katmanlı cilt ikameleri, biyolojik kolajen matrislerine veya sentetik biyobozunur yapı iskelelerine implantasyondan önce katılımı ve doku tamir işlemlerini arttırmaya yönelik kullanımıdır (Pablo ve ark. 2004).

Ekstrasellüler matris görevini üstlenecek yapay doku iskeleleri için optimal kullanım, hücrenin bakımı ve büyümesinin bütünlüğü için hayati öneme sahiptir. Çünkü hücreler, uygun bir mekanik dayanıma sahip, birbiri ile ilişkili kontrollü gözeneklileri olan malzeme desteği ortamına ihtiyaç duyarlar (Yang ve ark. 2002).

Doku mühendisliği uygulamaları temelli, başarılı bir şekilde doku veya organ yenilenmesi veya onarılması için, üç farklı özellik göz önünde bulundurulmalıdır. İlk olarak, işlemin gerçekleşmesini sağlayacak hücrelerdir. Hücrelerin işlevlerini yerine getirebilmeleri için hücresel fonksiyonları ve hücrelerin morfolojik yapılarını etkileyen hücre dışı ortam koşulları uygun olması gerekmektedir. Bu sebepten dolayı, hücre ve oluşturulan ya McKeehy doku iskelesi arasındaki etkileşimi sağlayacak biyosinyal moleküller de önemlidir. Diğer önemli faktör ise, doku iskelelerinin hücreler için geçici bir destek görevi görerek, hücrelerin yapışması, çoğalması ve göç edebilmesini sağlamasıdır (Karakeçili 2006) (Şekil 2.1).



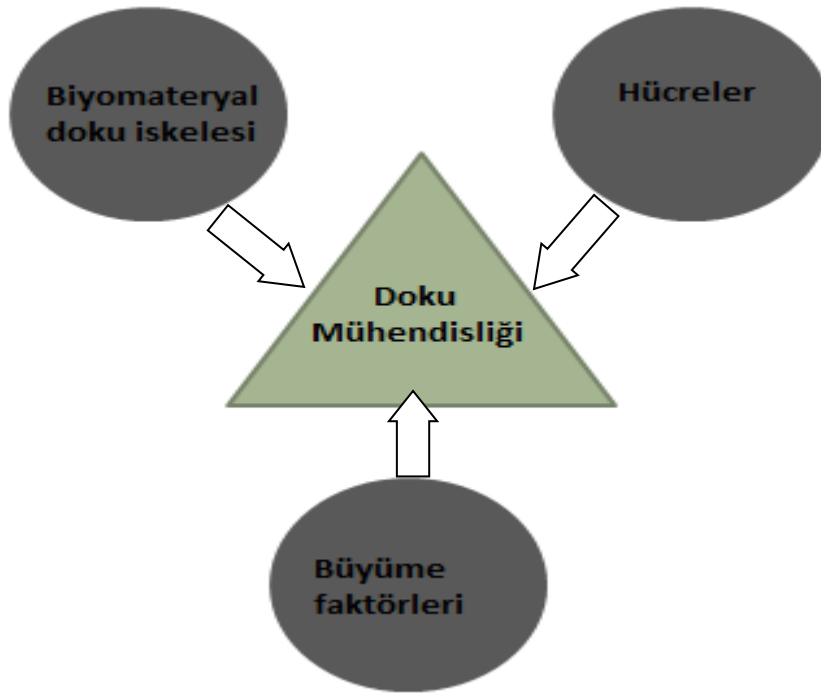
Şekil 2.1 Doku mühendisliği bileşenleri (Çakmak, 2015)

Bugüne kadar en yüksek başarı oranlarına ulaşılan deri (Yannas ve ark. 1989), mesane (Atala ve ark. 2006) ve kemik (Schimming ve Schmelzeisen 2004; Warnke ve ark. 2004) alanlarında doku mühendisliği yapılarının hastalarda başarıyla kullanıldığı ve matriks kaynaklı otolog kondrosit implantasyonunun kıkırdak onarımı için bir miktar başarı gösterdiği görülmektedir. Bu yeni ve genişleyen araştırma alanları, doku mühendisliği alanının ne kadar disiplinli olduğunu ve zorlukların ne kadar geniş olduğunu gösterse de, çeşitli alanlarda insan sağlığının iyileştirilmesine yönelik fırsatlar vardır (Fergal 2011).

Doku mühendisliği sektöründe, ekonomik faaliyet katlanarak artmış durumdadır. Özellikle pazar ve klinik denemelerdeki ürünlerin sayısının artması ve yenilenen biyomalzemelerle birlikte, satışları yılda 240 milyon ABD dolarını aşmaktadır (Lysaght ve ark. 2008).

Tedavi tipik olarak aynı hastada bir bölgeden diğerine (otograft) veya bir kişiden diğerine (transplant veya allograft) doku nakli ile gerçekleşmekte. Fakat bu tedavi yöntemleri hayat kurtarıcı olsa da, her iki teknikte de önemli sorunlarla karşılaşmaktadır. Otograftların maliyetli olmasının yanı sıra ağırlı olup, anatomik kısıtlamalarla sınırlıdır. Bunun yanında enfeksiyon ve hematom nedeniyle donör morbiditesi de dezavantajlarından. Benzer şekilde, allograftlar ve transplantlar da, yeterli dokuya erişme problemleri nedeniyle ciddi kısıtlamalara sahiptir. Ek olarak, hastanın bağışıklık sistemi tarafından reddedilme riskleri olduğu ve donörden hastaya enfeksiyon veya hastalık geçme olasılığı da tercih edilmeme sebeplerindedir (Fergal 2011).

Doku iskeleleri esasen doku oluşumu için bir şablon görevi görür ve tipik olarak hücreler ve bazen büyüme faktörleriyle kültürlenir veya bir biyoreaktör şeklinde biyofiziksel uyarıcılara tabi tutulur. Diğer bir deyişle hücrelere farklı tipte mekanik veya kimyasal uyarıları uygulayan bir cihaz veya sistemdir (Martin ve ark. 2004). Bu hücre tohumlu iskeleler, daha sonra yaralı bir bölgeye implante edilebilecek dokuları sentezlemek için *in vitro* kültürlenir veya vücudun kendi sistemlerini kullanarak, doku veya organların yenilenmesinin *in vivo* olarak indüklendiği vücudun kendi sistemlerini kullanarak doğrudan yaralanan bölgeye implante edilir. Hücre, biyosinyal faktörler ve iskele kombinasyonu genellikle bir doku mühendisliği temel üçlüsü olarak bilinmektedir (Şekil.2.2) (Fergal 2011.)



Şekil 2.2 Doku mühendisliği üçgeni, biyosinyaller (kimyasal olarak büyüme faktörleri veya fiziksel olarak bir biyoreaktör tarafından sağlanır) ve doku iskelesi (Hücrelerin göç etmesini, yapışmasını ve çoğalmasını sağlayan doku oluşumu için bir şablon görevi görür)

İyileşmesi uzun süren yaraların iyileştirilmesinin hızlandırılarak yaranın kapatılması gerekir (Balasubramani 2001). Büyük ve derin yara iyileştirilmesine yönelik yaklaşımların başında hastanın kendisinden alınan deri parçasının hasarlı bölgeye implante edilmesi gelmektedir. Fakat bu yöntemde hastanın acı çekmesi, iltihap oluşumu gibi dezavantajlar olduğundan günümüzde elde edilen yapay deri doku ürünleri kullanılmaktadır.

2.1.1. Jelatin (JE)

Jelatin, kolajenden elde edilen ve hayvanların deri, tendon, kıkırdaklarında fazla oranda olan bir sentetik olmayan ve bundan dolayı yara sargı bezlerinde sıklıkla tercih edilen bir polimerdir (Choi ve ark. 1999a). Ancak, jelatinin mekanik dayanımı az olduğundan başka polimerlerle desteklenerek bu zayıflığı giderilir veya değiştirilerek kullanılmaktadır (Pilehvar-Soltanahmadi ve ark. 2016). Jelatin, elektroçirme yapılırken glutaraldehid (GA) gibi kimyasallar ile çapraz bağlanarak ile nanofiber iskeleleri elde edilmektedir. Bu iskeleler, fibroblast hücrelerin çoğalmasını ve göç edebilmesine destek sağlar (Zhang ve ark. 2006).

2.1.2. Poli (vinil) alkol (PVA)

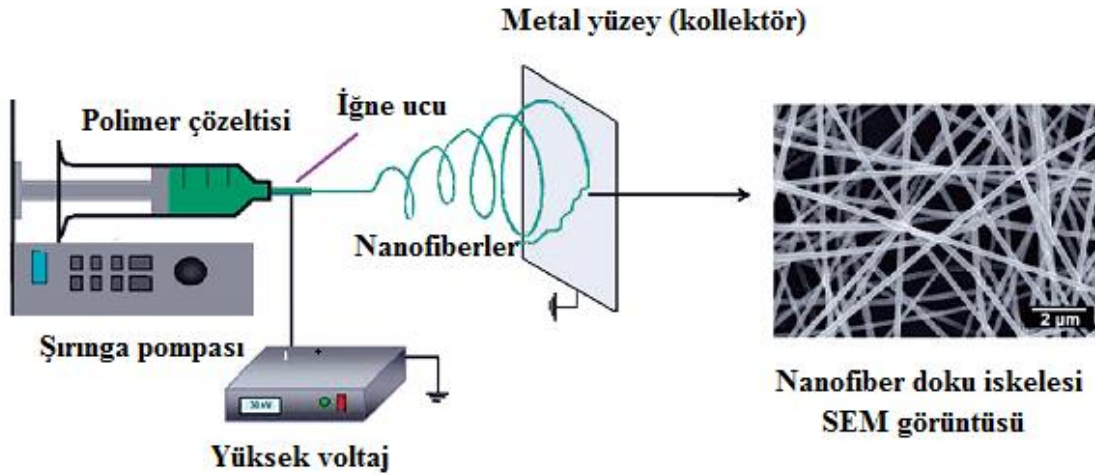
Poli (vinil) alkol (PVA), hidrofolik, yarı kristal yapıda ve suda kolaylıkla çözünebilen bir biyomateryaldir. PVA'nın kimyasal direncinin çok kuvvetli olmasının yanında vücut içinde biyoyumlu, biyobozunur ve toksik olmayan özelliklere sahip olmasından ticari olarak kullanımı da yaygındır (Maheshwari ve ark. 2013, Briscoe ve ark. 2000). PVA'nın su geçirgen özelliği yüksek olduğundan şişme oranı yüksektir (Maheshwari 2013). Bu özelliği de elde edilen doku iskelelerinde yüksek gözenek avantajı sağlar.

2.1.3. Elektroğirme Yöntemi

Elektroğirme yöntemi elektrostatik kuvvetler kullanılarak polimerlerin fiber yapıda elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde kapiler bir besleme ünitesinde bulunan polimer çözeltisine yüksek voltaj uygulanır. Oluşan elektrostatik kuvvetler polimer çözeltisinin yüzey gerilimini bozduğunda fiber jet formunda oluşan çözelti kararsız bir yapıda fiber formunda iletken bir toplayıcı üzerinde toplanır.

Elektroğirme yöntemi birçok polimere uygulanabilmesi nedeniyle de doku mühendisliği uygulamalarında önemli bir yer tutmaktadır (Sill ve Von Recum 2008). Elektroğirme yöntemi kullanılarak farklı proses koşulları altında nanometre boyutlarından mikron boyutlarına kadar örülmemiş ağ yapıda ya da doğrusal yapıda fiberlerin elde edilmesi mümkündür. Elde edilecek ürünün özelliklerini polimerin ve çözücünün özellikleri, çözeltinin akış hızı, uygulanan voltaj, iğnenin toplayıcıya olan uzaklığı ve polimer derişimi gibi birçok parametre etkiler (Holzwarth ve Ma 2011).

Elektroğirme işleminde, bir enjektör içine alınan polimer çözeltisi, yüksek voltaj kaynağı kullanılarak elektrik alanına maruz bırakılır. Bu sayede çözelti yüzeyinde elektrik yüklerinin çözelti yüzey gerilimini tetiklemesiyle iğne ucunda koni oluşturur ve hedef bölgeye (metal yüzey) doğru çözeltiyi eğirmeye başlar. Çözeltinin akış hızı, ve hedefle arasındaki mesafe belirlendikten sonra eğirme işlemi başlar ve enjektör içindeki çözelti bittiğinde nanofiber iskele oluşur (Şekil 2.3) (Pilehvar-Soltanahmadi ve ark. 2016). Doğal polimerlerin elektro eğirme nanofiber ürünlerinin girdikleri ortamda çözünmesini engellemek, stabilitesini artırmak için çapraz bağlama ihtiyacı gerektirir. Fakat, çapraz bağlamalar doku iskelesinin morfolojik yapısını ve gözeneklerini etkilemektedir (Zhang ve ark. 2006). Bu çalışmada PVA/JE nanofiber iskeleleri %2 GA ile çapraz bağlanmıştır.



Şekil 2.3 Elektroçirime aparatları ve elde edilen nanofiber iskele yapısı (Pilehvar-Soltanahmadi ve ark. 2016).

Elektroçirime tekniği kullanılarak oluşturulan nanofiber iskeleler, yara sargı bezleri veya hemostatik örtü ürünleri gibi deri doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır (Wnek ve ark. 2003).

2.1.4. Dondurma/Kurutma Yöntemi

İskele üretmede bir diğer yöntem olan dondurma/kurutma, aynı zamanda liyofilizasyon olarak da tanımlanır. Düşük sıcaklıklarda kurutma yapan bu yöntemin kullanım alanlarına doku iskelesi üretmenin yanında ilaç ve gıda sektörü de girmektedir.

Dondurma/kurutma, süblimasyon işlemleri temelli bir yaklaşımdır. Donuk halde olan çözücünün süblimleştirilmesi gibidir. Oluşan buz kristalleri, düşük sıcaklıkta kurutma tekniği ile oldukça gözenekli bir iskele oluşturur. Dondurma/kurutma tekniğinin diğer çeşitlerinden farkı, malzemenin kurutulma işlemlerinden önce katılaştığı ve işlem sırasında da büyük miktarda suyun uzaklaştırılmasıyla, katı haldeki su (kristalleşmiş buz) düşük sıcaklıkta direk olarak buharlaştırılarak gözenekli yapı oluşturulur. Böylelikle doku mühendisliği yaklaşımında yaygın kullanılır hale gelmiştir. Bu yöntemle, doğal ve sentetik polimerler kullanılarak gözenekli polimerik iskeleler üretilmektedir (Haaparanta 2015).

Sulu çözeltilerde çözünen doğal biyomateryaller için çoğunlukla dondurma/kurutma yöntemi kullanılmaktadır. Jelatinin doğal bir polimer olması sebebi ile genellikle dondurma/kurutma tekniğinde en çok tercih edilen biyomalzemedir. Bu yöntemle oluşturulan jelatin temelli iskelelerin yoğun bir yüzeyi vardır. Jelatinden elde

edilen bir yara sargı malzemesindeki bu yoğun yüzey, iskelenin buharlaşan atıkları yaradan uzaklaştırır ve yaradaki bakterilerden korur (Lee ve ark. 2005).

2.1.5. Sodyum Selenit (Selenyum)

Selenyum (Se) önemli bir eser element olmanın yanında, uzun yıllardır hücre kültür ortamlarında farklı hücre hatlarının çoğaltılmasında kullanılmakta ve biyolojik fonksiyonlarda rol oynamaktadır (Ganther ve ark. 1976, McKeehan ve ark. 1976, Çiğ 2018). 1960' ve 1970 yıllarındaki çalışmalar, Se, hücrel ve humoral bağışıklığın işlevselliği için önemli olduğunu göstermiştir (Spallholz ve ark. 1990, McKenzie ve ark. 1998). Aynı zamanda Se'nin ultraviyole kaynaklı deri kanserini önleyebildiği fareler üzerinde denenmiştir (Overvad ve ark. 1985).

Önceki çalışmalar, Se'nin sinyal iletimi ve sinir sisteminin fizyolojik işlevlerinin sürekliliğine önemli katkılar sağladığı bilinmektedir (Wirth ve ark. 2010). Bununla birlikte GSH-Px (Glutathione peroxidase) enzimi için kofaktör rolünü üstlenir. Ayrıca memeli proteinlerine (selenosistein ve selenometiyonun gibi) ve antioksidan savunmada yer alan selenoproteinlere katılırlar (McKenzie ve ark. 2002, Schweizer ve ark. 2004). Se düşük konsantrasyonlarda epilepsi (Nazıroğlu 2009) ve ağrı gibi bir çok nörolojik hastalıklarda nöroprotektif özellik göstermesine rağmen yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösterir. Se'nin nöroprotektif özelliği, apoptozu önleme kabiliyeti ve iyon kanalları aracılığı ile Ca^{+2} girişini düzenlemesine bağlıdır (Uğuz ve ark. 2012).

Epilepsi gibi bazı hastalıklarda selenyum ve antioksidanlarla tedavi süresince gözlemlenen kliniksel yanıtlar, patolojik süreçte Ca^{+2} kanalları yoluyla oksidatif stress ve ROS'un kritik rolü için önemli veriler sağlamıştır (Tang ve ark. 2008, Nazıroğlu ve ark. 2008, Gosso ve ark. 2011). Ayrıca, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, selenyumun yüksek doz uygulamasının Ca^{+2} kanalları üzerinde ters etki oluşturduğunu göstermiştir (Uğur ve ark. 2002). Se'nin yararlı etkilerinin yanı sıra toksik etkileri de görülmektedir. Ek olarak, Se'nin toksik etkileri doz derişimine bağlı olarak Ca^{+2} girişini uyardığı bilinmektedir (Schweizer 2004, Uğuz ve ark. 2009, Uğuz ve Nazıroğlu 2012).

TRPM2 ve TRPV1 kanalları, hipokampal ve DRG nöronlarında Ca^{+2} girişinin neden olduğu nöronal ölüme görev almaktadır. Selenyum ve melatonin uygulaması ile kanalların aktivitesi azalır ve bu sayede selenyumun apoptoz ve Ca^{+2} girişine karşı nöroprotektif özellik göstermiştir. Bu bulgudan yola çıkarak melatonin ve selenyumun nöronal ölüm ve periferik ağrıyı yok etmeye yönelik aktivitelerinin olduğu söylenebilir.

TRPM2 ve TRPV1 kanallarının diyabetin sebep olduğu oksidatif hipokampal yaralanma ve ağrı tedavisinde önemli bir hedef haline gelebileceği görülmektedir (Nazıroğlu 2013). Se aktivitesi, doğrudan serum ve doku konsantrasyonlarına bağlıdır ve düşük konsantrasyonları hücre büyümesini artırırken, yüksek konsantrasyonları büyümeyi engelleyerek hücre ölümünü tetikler. Selenyum takviyesinin, oksidatif stresin neden olduğu hücresel hasarın engellenmesi için tedavi edici bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir (Nazıoğlu ve ark. 2012).

Bu çalışmalar kapsamında, selenyumun oluşturulan doku iskeleleri ile birlikte yara iyileştirilmesine yönelik etkileri *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi önerilmektedir.

2.2. PVA/JE Doku İskelelerinin Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler

Elde edilen iskelelerin belirli özelliğe sahip olması gerektiği Genel Bilgiler 2.1 kısmında belirtilmiştir. Bu özellikler taşıyıp taşımadığı, istenilen dokuya özgü bir malzemenin olup olmadığının anlaşılabilmesi için karakterizasyonun yapılması gerekmektedir.

2.2.1. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)

İskelelerin morfolojik yapılarını, gözenek çaplarını belirlemede kullanılan SEM, yüzey analizi yaparak örneklerin üç boyutlu topoğrafik verilerini sağlamaya yardımcı olur. Elektron demetleri yüksek vakum altında örnekler üzerine gönderilerek yüzeyden saçılan ikincil elektronlar ölçülür ve böylelikle yüzeyin yapısının bilgisi alınır (Hauch, ve Ratner 2013).

2.2.2. Şişme Analizi

Yara sargı bezlerinin yaralı bölgenin nemini koruyabilecek yapıda olması beklenir (Sheridan ve ark. 2001). Bundan dolayı elde edilen doku iskelelerin suyu hapsetme kapasiteleri önemli olmaktadır.

2.2.3. Sitotoksosite Analizleri

Oluşturulan doku iskelelerinin ve kullanılan maddelerin toksik olup olmadığının belirlenmesi için *in vitro* deneyler yapılarak test edilmektedir. Testler genellikle MTT (3-[4,5-dimethylthylthiazol-2-yl]- diphenyltetrazolium bromür) analizi ile

yapılmaktadır. Burada formazal kristallerin enzimatik oluşumuyla renk değişimi gerçekleşir ve ölçümler 570 nm’de bir okuyucu tarafından alınır (Dusinska 2012).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu bölümde, sunulan tez çalışmasında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ile ilgili bilgi verilmiştir. Öncelikle, çalışma içerisinde kullanılan kimyasal maddeler özetlenmiştir. Ardından, elektro-eğirme ve dondurma/kurutma teknikleri ile PVA/JE doku iskelelerinin üretimine yönelik yöntemler açıklanmıştır. Buna ek olarak, doku iskelelerine 3T3 hücre ekilmesi ve selenyum maddesinin verilmesiyle hücre kültür deneyleri yapılmıştır. Diğer yandan, karakterizasyon analiz çalışmaları (SEM, FTIR ve su tutma kapasitesi çalışmaları) verilmiştir.

Son bölümde ise, bu çalışmada üretilen malzemelerin kullanım potansiyelinin araştırılması amacıyla yürütülmüş olan hücre ekili doku iskelelerinin selenyumlu selenyumsuz sitotoksosite çalışmalarına yer verilmiştir.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

PVA % 8 (98 g/mol, % 99 hidrolize, Inner Mongolia Shuangxin)

JE % 10 (Kervan Gıda San. ve Tic. Aş.)

Asetik asit (Sigma Aldrich)

Etanol % 98 (Sigma Aldrich)

Genipin (LesenPhytochem & Herbs Extracts Solutions)

Gluteraldehit (Sigma Aldrich)

Glisin (Sigma Aldrich)

Sodyum selenyum (Sigma Aldrich)

DMEM F-12 (Dulbecco'nun Modifiye Kartal Medyumu F-12) (Gibco)

FBS (Fetal sığır serumu) (Gibco)

Penisilin-streptomisin solüsyonu (Gibco)

Tripsin (% 25 EDTA'lı)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kitler

MTT Assay Kit (Sigma Aldrich)

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Eppendorf Micropipet (0,5-10 μ l, 20-200 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l)

Vorteks (Biosan)

Elektro-eğirme (Harvard)

Liyafilizatör (Operon)

SEM (Zeiss)

UV (Sterin-Room)

Distile Su Cihazı (GFL)

Etüv (Sanyo)

Laminar Hava Akım Cihazı (Heraus)

Otoklav (Hirayama)

Santrifüj (Hettich)

Manyetik karıştırıcı (İKAMAG)

Hassas terazi (MET)

Sıvı Azot Tankı (34 XT Taylor-Wharton)

Ters Mikroskop (Olympus IM) Vorteks (Biosan)

3.1.4. Sarf Malzemeleri

50 mL, 250 mL beher

Enjektör (5 ml, 10 ml)

2.5mL, 5 mL ve 10 mL pipet

Puar

Pastör pipet

Cam petri kabı

Mezür

Bisturi

Pens

24 kuyulu plakalar

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

PBS (Tuz İçeren Yıkama Eriği): 1,44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l KH_2HPO_4 , 8,0 g/l NaCl , 0,2 g/l KCl , 800 ml dH_2O ile çözülerek pH HCl ile 7,4 olacak şekilde ayarlanarak son hacm 1 lt'ye tamamlanır.

PVA : 8 g PVA. Hazırlanışı: 80 ml distile su ile 8g PVA karıştırılır son hacmi 100 ml'ye tamamlanır.

JE: 10 g JE. 1.Hazırlanış: 80 ml distile su ile 10 g JE karıştırılır son hacmi 100 ml'ye tamamlanır. 2. Hazırlanış: 35 ml distile su ve 15 ml asetik asit ile 10 g JE karıştırılır. Son hacim 100 ml olacak şekilde 7:3 v/v oranında dH_2O ve asetik asit ile tamamlanır.

3.1.6. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

NIH/3T3 fare fibroblast hücre hattı

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre Kültür Çalışmaları

Bu tez çalışmasında yararlanılan, NIH/3T3 (fare fibroblast) hücreleri *in vitro* kültür ortamında, DMEM F-12 içerisinde (% 10 FBS ve % 1 antibiyotik (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomisin ve 100 U/ml penisilin içerir) kültür şişelerine aktararak, inkübatörde (37 °C, % 5 CO_2) çoğaltıldı. Hücreler, 48-72 saat süre ile ters mikroskopta kontrol edilerek yarı konfluent olduğunda tripsin yardımı ile kaldırılıp 15 ml'lik steril falkon tüplerine aktarıldı. Santrifüjlenerek (3000 rpm, 5 dakika) ve üst sıvının atılması ile pelet, yeni hazırlanmış cDMEM (1-2 ml) içerisinde çözdürüldü. Hücrelerin pasaj işlemleri, taze hazırlanmış cDMEM içeren kültür şişelerine $1-2 \times 10^5$ hücre/ml eklenerek yapıldı. Böylelikle 2-3 günde bir gözlenen hücrelerin, konfluent durumlarına göre belirli sürelerle pasajları yapıldı.

3.2.2. Hücrelerin Dondurulması ve Çözülmesi

Hücre dondurma yönteminde, tripsin (2-3 ml/25 cm^2) ile inkübe edilerek kültür şişesi yüzeyinden kaldırılan hücreler, 15 ml'lik falkon tüplerine alınarak santrifüjlendi (3000 rpm, 5 dakika) ve pelet alındı. Falkon tüpü içerisinde 5×10^5 hücre bırakıldı. Ardından hücrelere DMSO/FBS (1:9 v/v) eklenerek, -80 °C'ye dayanıklı kryo tüplere

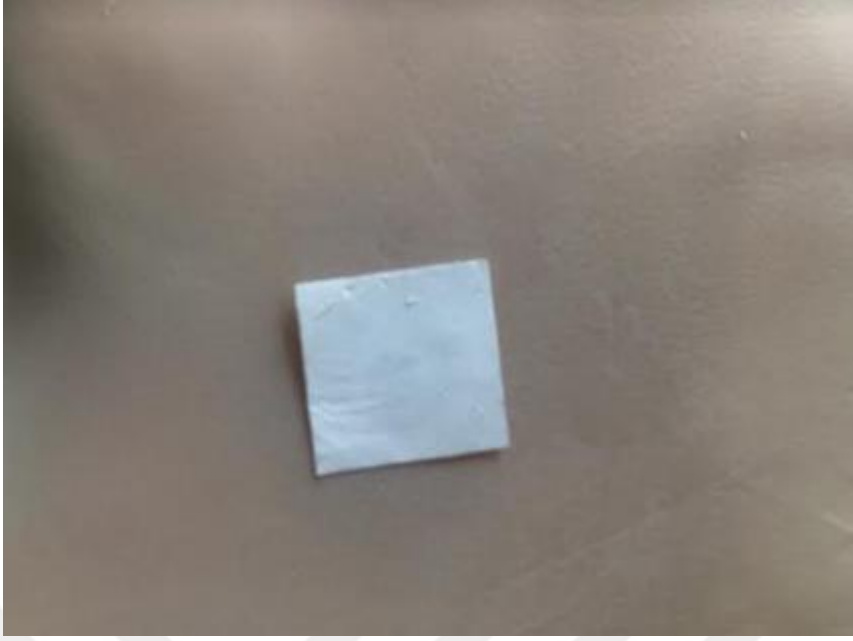
alındı ve 30 dakika buzda bekletildi. Bu süre sonunda kryotüpler, -20 °C'ye kaldırılarak 24 saat bekletildi ve son olarak -80 °C'ye bırakıldı. Hücrelerin uzun sürelerde saklanması gerektiği durumlarda sıvı azot tankına aktarıldı.

Dondurulmuş hücrelerin çözülme işlemi ise hücreler -80 °C veya sıvı azottan alınarak, dışarıda bekletilmeden hızlıca 37 °C'ye konuldu. % 50 çözülme görüldüğünde, içerisinde cDMEM eklenmiş falkon tüplere (15 ml'lik steril) alındı. Santrifüjlenerek (3000 rpm) pelet alındı. Daha sonra cDMEM ilave edilerek kültür şişelerine aktarıldı.

3.2.3. PVA/JE Çözeltisinin Hazırlanması ve Elektroegirme Yöntemi

Ağırlıkça % 8 olarak hazırlanan PVA, distile su içerisinde 80 °C'de 3 saat boyunca sürekli karıştırıldı. Ağırlıkça % 10 olarak hazırlanan jelatin ise, distile su:asetik asit'den (7:3 v/v) oluşan çözücü içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ağır ağır karıştırılarak çözüldü. Ardından PVA/JE çözeltisi elde etmek için, PVA çözeltisine JE çözeltisi (1:1 w/w) eklendi. Bu çözelti, elektro egirme yapmadan hemen öncesinde homojen bir karışım elde edilene kadar 15 dakika karıştırıldı.

Nanofiber doku iskelesi üretimi için elektroegirme cihazı; yüksek voltaja sahip güç kaynağı (0-30 kV), bir pompa, polimerik çözeltileri enjekte edebilmesi için iç çapı 0,16 mm iğneli bir plastik şırıngadan (10 ml'lik) ve bir adet metal toplayıcısından oluşuyordu. Homojen PVA/JE çözeltisi 10 ml plastik şırınga içerisine alınarak pompaya yerleştirildi. Oda sıcaklığında, alüminyum toplayıcı ve şırınganın iğnesi arasındaki mesafe 15 cm uzunluğunda olacak şekilde yerleştirildi. İğneden çözeltinin akış hızı 25 µl/dakika olarak ayarlandı. Ardından voltaj kaynağının 2 ayrı kablolarının bir ucu iğnenin ucunda diğer uç metal hedefe tutturulması ile işlem alanını kuvarz cam kapakla kapatıldı, voltaj kaynağı açıldı ve bu şekilde elektroegirme işlemi gerçekleşti (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Elektroğirme yöntemi ile elde edilen PVA/JE nanofiber iskele

3.2.4. PVA/JE Çözeltisinin Hazırlanması ve Dondurma/Kurutma Yöntemi

PVA materyalinin hazırlanışı elektroğirme yönteminde hazırlandığı gibi ağırlıkça % 8 PVA, distile su içerisinde 80 °C’de 3 saat boyunca sürekli karıştırıldı. Ağırlıkça % 10 jelatin, distile su içerisinde 60 °C’de 1 saat karıştırılarak çözüldü. Her iki çözelti de hazırlandıktan sonra 1:1 v/v oranında 15 dakika karıştırılarak homojen bir karışım elde edildi. Bu PVA/JE karışımının çapraz bağlaması için belli oranlarda ağırlıkça % 0.75 genipin (GP) distile suda çözdürülerek ilave edildi. GP oranına göre 2 ayrı karışım elde edildi: ilk olarak 10 ml PVA/JE karışımına hazırlanan % 0,75 GP’den 5 ml verildi; diğer 10 ml’lik PVA/JE karışımına ise 8 ml GP ile 30 dakika homojen bir karışım elde etmek için karıştırıldı (Tablo 3.1).

% 8 PVA / % 10 JE	% 0,75 Genipin
10 ml	5 ml
10 ml	8 ml

Tablo 3-1 Dondurma/kurutma yöntemi ile hazırlanan doku iskelesinin hazırlanış koşulları

Elde edilen bu karışımlar 5 ml'lik enjektörler içerisine alınarak başta oda sıcaklığında 24 saat, ardından $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletildiler. Enjektörlerin uç kısımları kesilerek malzemeler çıkarıldı. Daha sonra, 24 saat süreliğine $-49\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de liyofilizatöre aktarıldı. Bu süre sonunda polimerler, kalınlıkları cetvel ile ölçülerek 1mm olacak şekilde bisturi ile kesilerek parçalara ayrıldı (Şekil 3.2) ve % 0.75 glisinde (distile su içinde) 8 saat bekletildikten sonra PBS ile yıkandı.



Şekil 3.2 Dondurma/kurutma yöntemi ile elde edilen PVA/JE polimerik iskele

3.2.5. PVA/JE Polimerik Doku İskelelerinin Karakterizasyon İşlemi

3.2.5.1. Doku İskelelerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Morfolojik Karakterizasyon

Doku iskelelerinin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanıldı ve 5-20 kV voltaj aralığında çalışıldı. Görüntüleme yapmadan önce, örnekler alüminyum aparatlara monte edildi ve platin ile kaplandı. Image J yazılım programı ile

Nanofiberlerin ortalama çapı görüntü üzerinde farklı noktalar ile ölçüldü (Şimşek ve ark. 2012).

3.2.5.2. Hücre Morfolojisinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

PVA/JE polimerik iskeleleri üzerindeki hücrelerin yapışma ve morfolojik görüntüleri 24 ve 48 saatlik kültür sonunda taramalı elektron mikroskobu ile gözlenmiştir. Hücre ekili örnekler PBS ile yıkandı ve ağırlıkça % 2.5 glutaraldehit (PBS içinde) ile 30 dakika süreyle oda sıcaklığında sabitlendi. Ardından, örnekler farklı oranlarda etanol (% 30, % 50, % 70, % 90 ve % 100) ile dehidre edildi ve heksametildisilazan (HMDS) (Glentham Lifes Ciences) ile 5 dakika yıkandı (Şimşek ve ark. 2012). Kurutma işlemi yapıldıktan sonra, görüntümeden önce örnekler alüminyum aparatlara monte edildi ve platin ile kaplanarak SEM görüntüleri incelendi.

3.2.6. Su Emme Kapasite (Şişme Oranı) Testi

PVA/JE polimerik doku iskelelerinin su emme yüzdesini belirlemek için örneklerin 25 ml PBS (pH 7.4) içinde 37 °C'de şişme testleri yapıldı. Öncelikle doku iskelelerinin kuru ağırlıkları hesaplandı (M0). Ardından iskelelerin belirli zaman aralıklarında (10, 20, 30, 40 ve 60 dakika) tartılarak PBS'den alındıktan sonraki ıslak ağırlıkları belirlendi (M1). İskelelerin suyu tutma kapasitesi aşağıdaki formül ile hesaplandı. Testler art arda 3 kontrol ile yapıldı.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(M1 - M0) / M0] \times 100$$

3.2.7. Sitotoksosite Analizi

Bu tez çalışmasında, elektroçirime ve dondurma/kurutma yönteminden elde edilen PVA/JE polimerik doku iskelelerinin ve selenyumun toksik özellikleri 3T3 fibroblast hücreleri üzerinde belirlendi.

3.2.7.1. Selenyumun Sitotoksosite Analiz Yöntemi

MTT analiz yöntemi ile ilk olarak Se sitotoksosite deneyleri yapıldı. 3T3 hücreleri, 15×10^3 hücre/kuyu yoğunluğunda 96 kuyulu hücre plakalarına ekildi. Hücreler, 24 saat sonra konflent duruma geldiğinde belirli konsantrasyonlarda Se (50 nM – 1 µM) ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi (37 °C, % 5 CO₂). Belirlenen süreler sonunda, 5 mg/ml (PBS içinde çözünmüş) MTT her kuyuya 4 µl olarak verilerek 3-4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ortamdaki medyum alındı ve aynı miktarda DMSO (Dimetil sülfoksit) ortama verilerek, ışık almayan ortamda 30 dakika bekletildi.

Kuyularda oluşan mor renk yoğunluğuna göre absorbans değerleri Gen5 programı ile 570 nm'de okutuldu (Uğuz ve Nazıroğlu 2012).

3.2.7.2. Elektroeğirme PVA/JE Doku İskelelerinin Sitotoksisite Analiz Yöntemi

Elektroeğirme doku iskeleleri, hücre ekilmeden önce steril edilmek amacıyla % 70 etanol içerisinde 30 dakika bekletildi ve PBS ile yıkandı ve ardından 30 dakika UV lamba (254 nm) altında tutuldu. Ürünlerin sterilizasyon işleminden sonra 24 kuyulu plakalara konularak, her ürün üzerine 5×10^4 hücre/100 μ l medyum içinde ekildi ve 3 saat inkübatörde bekletildi. Daha sonra inkübatörden alınan plakalardaki her kuyuya 1ml cDMEM ile eklenerek 24 saat inkübe edildi (37 °C, % 5 CO₂) (Huang 2016).

Hücrelerin iskeleler üzerinde yapıştıkları ters mikroskopla gözlemlendikten sonra öncesinden belirlenen etkili doz 200 nM selenyum elektroeğirme doku iskeleleri üzerine verildi ve 24, 48, 72 saat süreler için inkübe edildi (37 °C, % 5 CO₂). Belirlenen süre sonrasında her kuyu için 50 μ l/ml MTT maddesi verilerek 3-4 saat inkübatörde bekletildi. Ardından ortam kaldırılıp aynı miktarda DMSO ile değiştirildi ve 30 dakika karanlık ortamda bekletildikten sonra absorbans değerleri okuyucuda (Gen5 programı) okutuldu.

3.2.7.3. Dondurma/Kurutma PVA/JE Doku İskelelerinin Sitotoksisite Analiz Yöntemi

Dondurma/kurutma yöntemi ile elde edilen doku iskelelerinin sitotoksisite deneyleri elektroeğirme yönteminden oluşturulan doku iskelelerin MTT analiz yöntemi ile aynı şekilde yapılmıştır. Yukarıda belirtildiği gibi yapılan sterilizasyon işleminden sonra, 24 kuyulu plakalara ekilen 5×10^4 hücre/100 μ l medyum ile 3 saat inkübatörde bekletildi. Daha sonra inkübatörden alınan plakalardaki her kuyuya 1ml cDMEM ile eklenerek 24 saat inkübe edildi (37 °C, % 5 CO₂) (Huang 2016).

24 saatin sonunda iskelelere yapıştığı belirlenen hücreler, 200 nM selenyum ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edildiler (37 °C, % 5 CO₂). Belirlenen bu sürelerin sonunda MTT deneyi ile absorbans değerleri okundu.

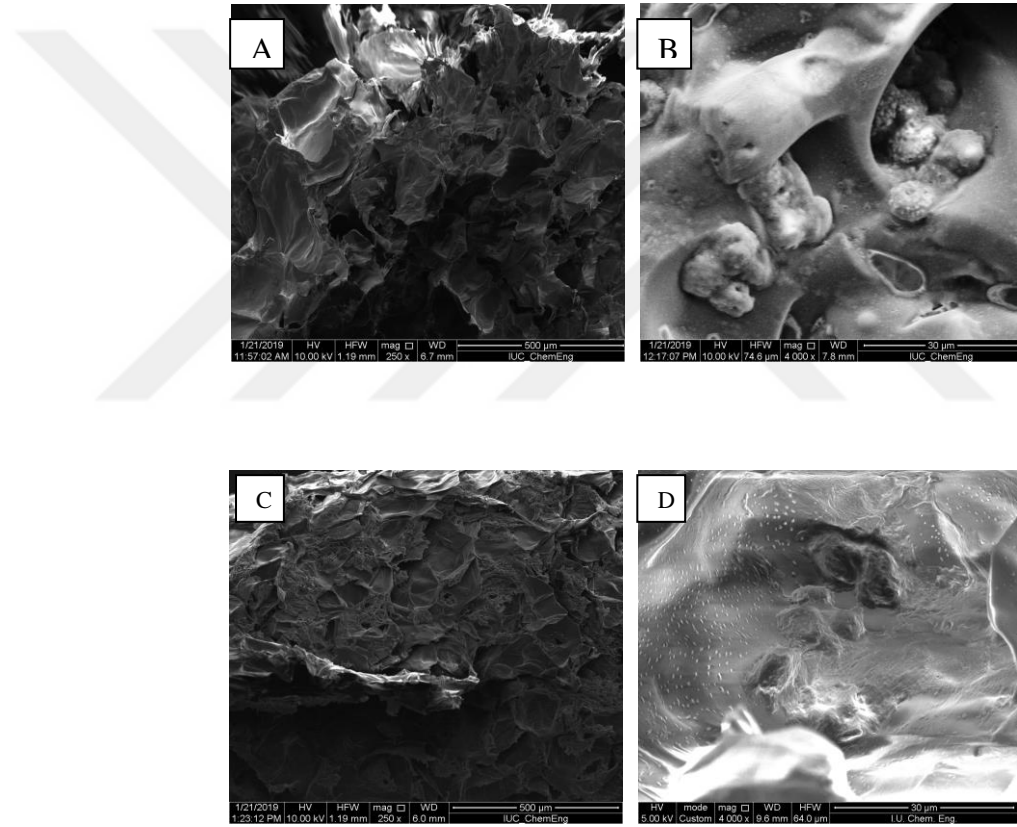
Bu yöntem sayesinde selenyumun doku iskeleleri ile birlikte 3T3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir.

4. BULGULAR

Elde edilen bu iskelelere 3T3 fibroblast hücreleri ekildi ve ardından selenyum verilerek doku iskelesi ve hücrelerin birbirleri ile etkileşimleri incelendi.

4.1. PVA/JE Polimerik Doku İskelelerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İle Morfolojik Karakterizasyonu

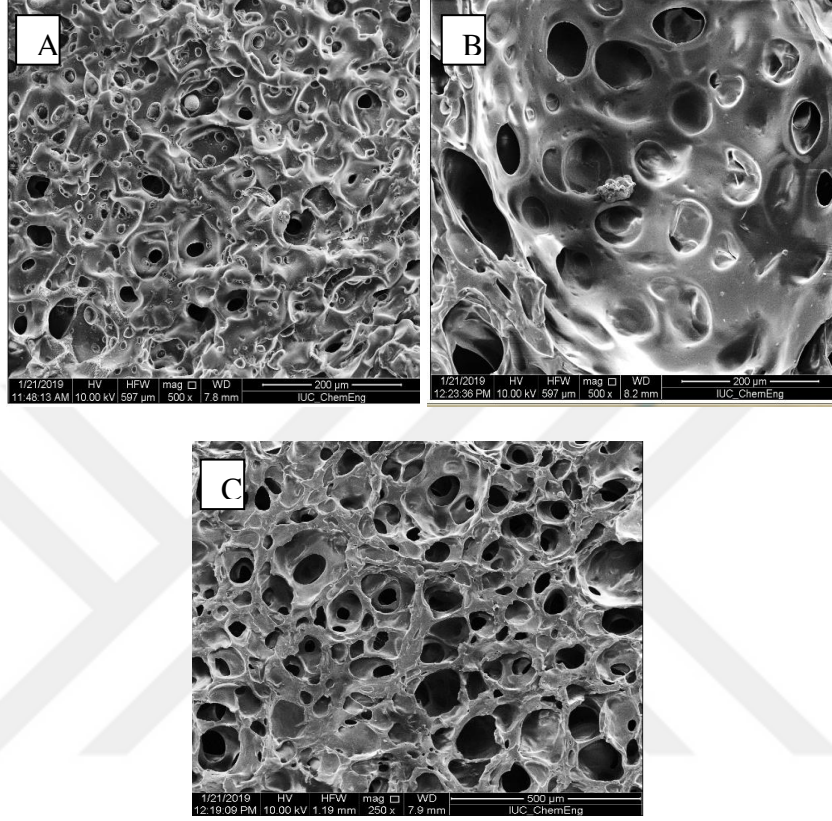
Şekil 4.1’de dondurma/kurutma yöntemi ile elde edilen doku iskelelerine ait SEM görüntüleri verilmektedir. Hüresiz doku iskelelerinin görüntüleri, 250x ve hücre ekilmiş doku iskelelerinin görüntüleri ise 4000x büyütmede alınmıştır.



Şekil 4.1 Dondurma/kurutma PVA/JE iskelelerinin SEM Görüntüleri. A) 5 ml GP ilaveli hüresiz dondurma/kurutma doku iskelesi (250x), B) 5 ml GP ilaveli hücreli dondurma/kurutma doku iskelesi (4000x), C) 8 ml GP ilaveli hüresiz dondurma/kurutma doku iskelesi (250x), D) 8 ml GP ilaveli hücreli dondurma/kurutma doku iskelesi (4000x)

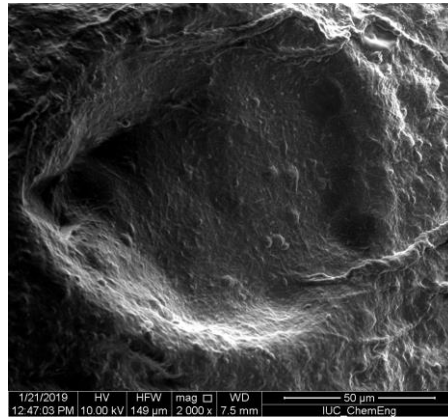
SEM görüntüleri *Imaje J* programı ile gözenek boyutları incelendi (Şekil 4.2), 5 ml GP’li dondurma/kurutma PVA/JE doku iskelelerinde gözenek boyutu ortalaması 110 µm olarak hesaplanırken (Şekil 4.2 A), 8 ml GP’li dondurma/kurutma doku iskelelerinin gözenek boyutu ortalama değeri 98 µm olarak belirlendi (Şekil 4.2 B). Çapraz bağlama

yapılırken GP oranı yüksek olan dondurma/kurutma iskelelerinin çok sayıda gözeneğe sahip olduğu fakat gözenek boyutlarının daha küçük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2).

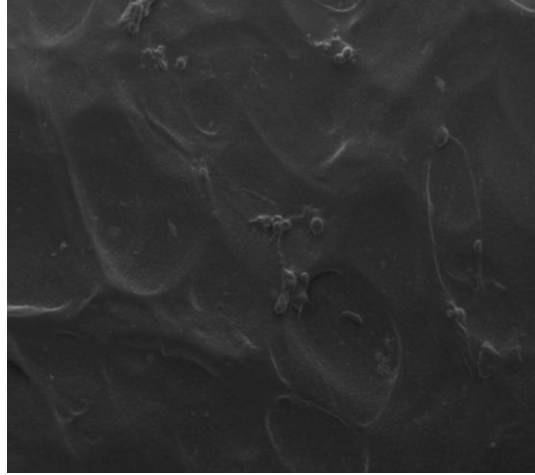


Şekil 4.2 Dondurma/kurutma doku iskeleleri SEM gözenek görüntüleri. A) 5 ml GP'li dondurma/kurutma iskeleleri (500x), B) 8 ml GP'li dondurma/kurutma iskeleleri (500x), C) 8 ml dondurma/kurutma iskeleleri (250x)

Elektroçirime ile elde edilen PVA/JE doku iskelelerinin ortalama gözenek boyutu 97 μm olarak kaydedildi (Şekil 4.3).

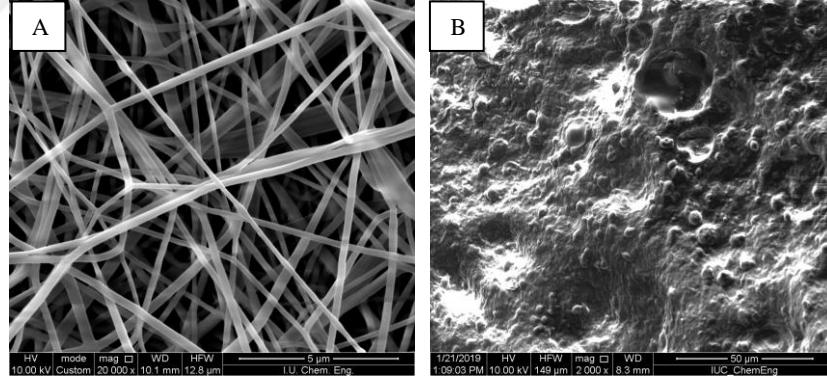


Şekil 4.3 Elektroçirime doku iskeleleri SEM gözenek görüntüsü



Şekil 4.4 8 ml GP içeren dondurma/kurutma doku iskelesi (48 saat 'lik SEM görüntüsü)

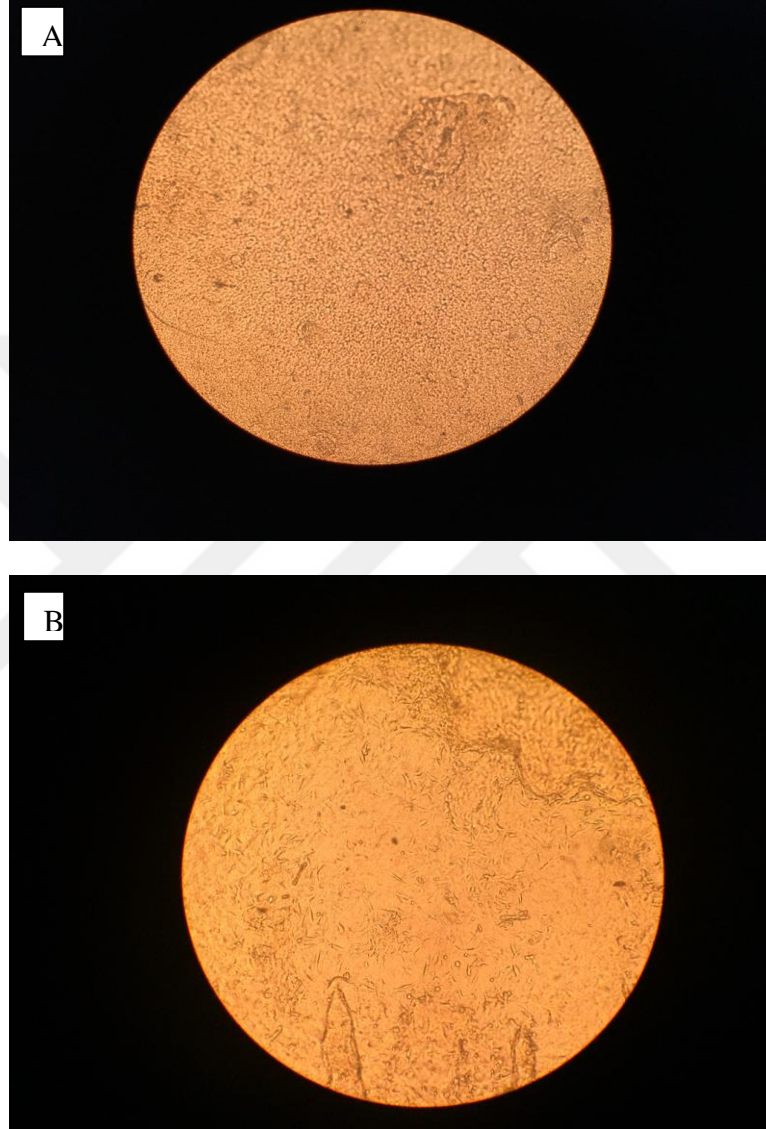
Nanofiber yapıları doku iskeleleri oluşumunda kullanılan diğer yöntem elektroçirme yöntemidir. Jelatinden elde edilmiş elektroçirme nano fiberleri hücre yapışmasını arttırdığı bilinmektedir (Bhardwaj ve Kundu 2010). Bu tez çalışmasında da hücrelerin nanofiber yüzeylere yapıştığı gözlemlendi. Elektroçirme tekniği kullanılarak elde edilen nanofiber yapıları doku iskelelerin gözeneklerinin morfolojik yapıları Şekil 4.5'te gösterildi.



Şekil 4.5 PVA/IE elektroçirme nanofiber doku iskeleleri SEM görüntüleri. A) Hücresiz elektroçirme doku iskelesi (20000x), B) Hücreli elektroçirme doku iskelesi (2000x)

Şekil 4.5 A'da elektroçirme nanofiber iskelelerin 20000x büyütmede ve Şekil 4.5 B'de 2000x büyütme ile SEM görüntüleri incelendi. Görüntülerde, fiberlerin yapısında damla oluşmadığı görülmektedir. Nanofiber iskeleler oluşumunda eğirmenin yapıldığı esnada enjektör ucundan damla oluşumu çoğunlukla karşılaşılabilen bir durum olması ile birlikte nanofiber iskelelerde görülmesi istenmemektedir (Bhardwaj ve Kundu 2010).

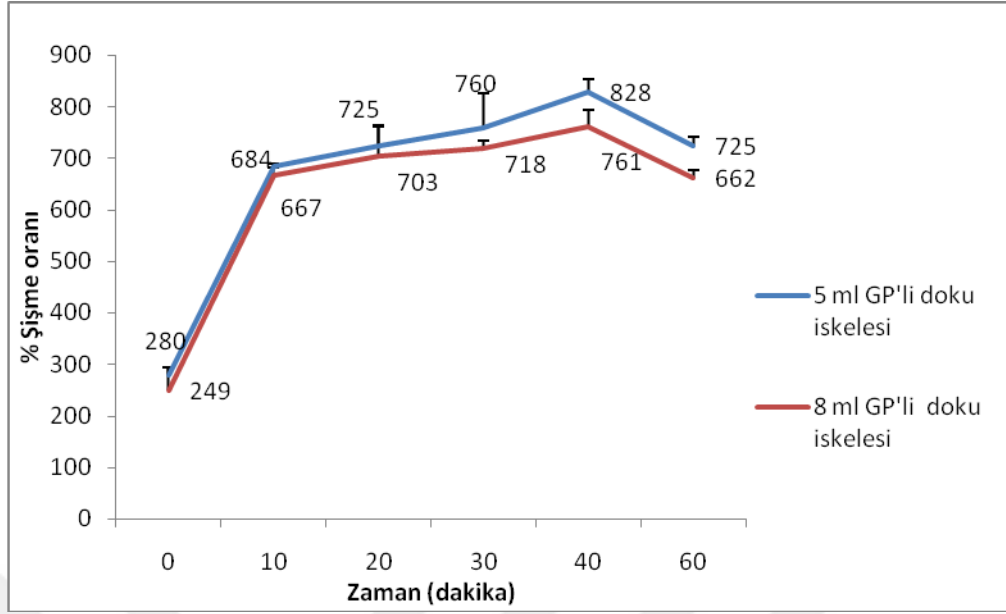
Elektroğirme doku iskeleleri, ters mikroskop ile hücresiz ve hücre ekili olarak incelenerek hücrelerin yüzeye tutunup tutunmadığı takip edilebildi (Şekil 4.6). Şekil 4.6 A hücresiz nanofiber yapılı doku iskelesi görüntüsüyken, Şekil 4.6 B'deki görüntü hücre ekili nanofiber yapılı doku iskelesidir.



Şekil 4.6 Elektroğirme PVA/JE iskelelerinin ters mikroskop altındaki görüntüleri. A) Hücresiz elektroğirme PVA/JE doku iskeleleri görüntüleri, B) Hücreli elektroğirme PVA/JE doku iskeleleri görüntüleri

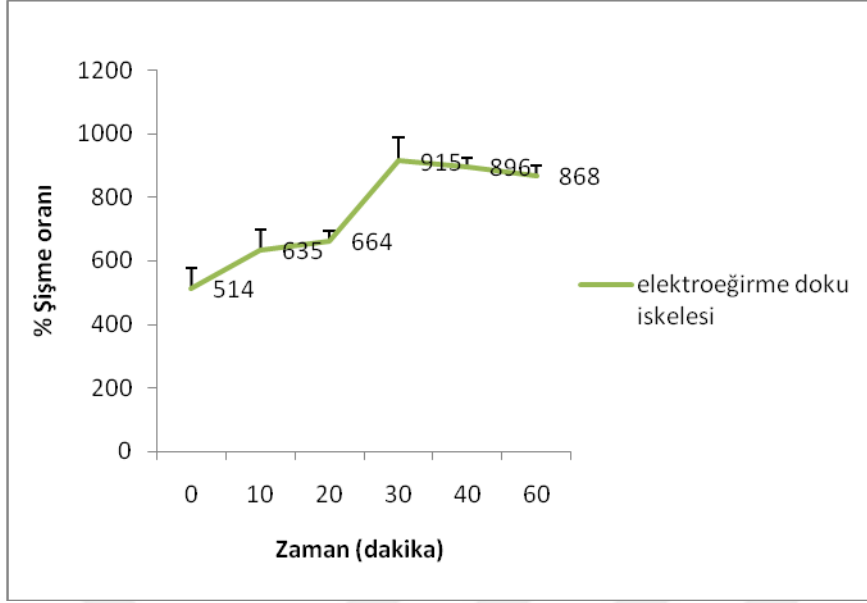
4.2. Şişme Analizi

Su tutma kapasitesi analiz grafiği verilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 5 ml GP içeren PVA/IE iskeleleri ve 8 ml GP içeren PVA/IE iskeleleri dondurma/kurutma iskeleleri şişme oranları.

Farklı GP oranlarına sahip dondurma/kurutma doku iskelelerine ait şişme oranları Şekil 4.7'te verilmiştir. Genel bilgilerde jelatinin bir kolajen türevi olduğu bildirilmiştir. Kolajenin doğal yapısı gereği sulu ortamlarda suyu hapsedme ve şişme özelliğinden dolayı yüksek bir şişme oranı olduğu gözlemlenmiştir. Grafikte görüldüğü gibi ilk 40. dakikaya kadar şişme oranı değerlerinde artma gözlemlenmiştir. En yüksek şişme oranlarına sahip oldukları görülen 40. dakikada 5 ml dondurma/kurutma yönteminde %828; 8 ml dondurma/kurutma yönteminde ise %761 olarak belirlenmiştir. Elde edilen PVA/IE doku iskeleleri yaraya implante edildiğinde veya sargı bezi olarak kullanımı durumunda, yara bölgesindeki sıvıyı absorbe ederek bölgenin nemli kalmasını sağlayabimesi açısından önemlidir.



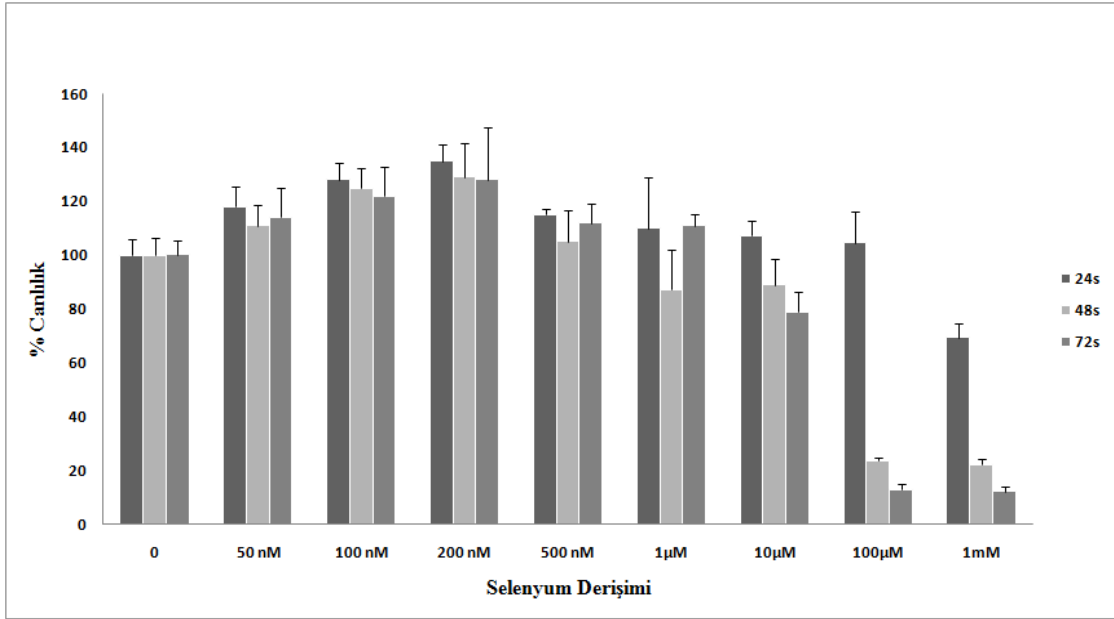
Şekil 4.8 Elektroğirime PVA/JE iskeleleri şişme oranları

Şekil 4-8 incelendiğinde; İlk 30. dakikaya kadar artış görülmektedir. Elde edilen PVA/JE doku iskeleleri yaraya implante edildiğinde veya sargı bezi olarak kullanımı durumunda, yara bölgesindeki sıvıyı absorbe ederek bölgenin nemli kalmasını sağlayabimesi açısından önemlidir.

4.3. Sitotoksosite Analizleri

4.3.1. Selenyum Sitotoksosite Analizi

Öncelikle bir antioksidan olan ve Se'un artan derişimlerde (50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1 mM) 3T3 hücrelerin canlılığına etkileri MTT deneyleri ile belirlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Selenyumun 3T3 hücreleri ile 24, 48, 72 saat MTT canlılık analizleri

Şekil 4.9’de ilk 24 saat içinde 50 nM ve 100 µM aralığında canlılıkta kontrole göre belirgin bir azalış gözlemlenmemiştir. Canlılıkta kontrole kıyasla 48 saat içinde 100 nM ve 200 nM’da artma görülürken doz arttıkça canlılık azalmıştır. 72 saat içinde ise canlılık kontrole kıyasla 50 nM’da artış varken 100 nM’da bir azalma olmuştur ve 200 nM ‘dan yüksek dozlarda azalmaya başlamıştır. Bakıldığında 200 nM’da kontrol ile karşılaştırıldığında 24, 48, 72 saat süre boyunca canlılıkta artış gözlemlendiğinden, canlılık için ideal doz 200 nM belirlenmiştir. Bu deneyler üç kez tekrarlanmıştır.

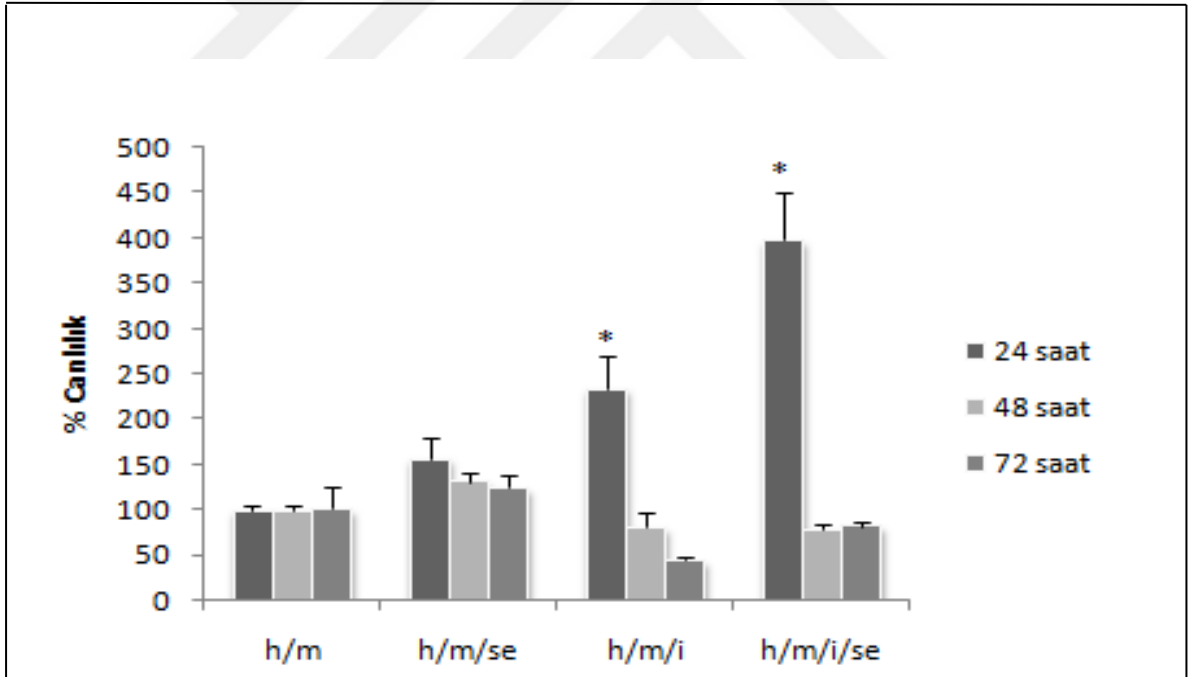
4.3.2. Elektroeğirme PVA/JE Doku İskelelerinin Sitotoksisite Analizi

Hücre ekili doku iskelelerinin MTT analizleri, 24 kuyulu plakalarda gruplar, ortamda selenyumun ve doku iskelesinin varlığında ve yokluğunda oluşturuldu (Şekil 4.8). 1. Hücre/medyum (h/m), 2. Hücre/medyum/selenyum (h/m/se), 3. Hücre/medyum/doku iskelesi (h/m/i), 4. Hücre/medyum/doku iskelesi/selenyum (h/m/i/se). 24, 48, 72 saat sonunda MTT analizleri sonundaki elde edilen değerler, hücrelerin doku iskelesi yüzeyinde canlı olduğunu ve tutunduklarını gösterdi.

Hücrelerin ekili olduğu doku iskelesiz ve doku iskeleli ortama selenyum verildiğinde, selenyumun olmadığı kontrol ile karşılaştırıldığında canlılıkta artış gözlemlendi. İlk 24 saat içinde, elektroeğirme yöntemiyle elde edilen doku iskelelerinin üzerindeki hücrelerde kontrole kıyasla canlılıkta artma görülmüştür. Selenyum ilave

edildiğinde bu artışın yükseldiği gösterilmiştir. 48 saatlik sürede ise iskelesiz ortamlarda selenyum ilavesi ile canlılığın kontrolden fazla olduğu görüldü.

Diğer yandan selenyumsuz doku iskelesinin hücre ve medyumun olduğu kontrole göre canlılıkta azalma görülmüştür. Tekrar selenyum verildiğinde ise iskelenin bulunduğu selenyumsuz ortama kıyasla hücre yaşayabilirliğinin arttığı görülmüştür. 72 saat sürecindeki canlılık sonuçları 48 saat sonundaki bulgular ile benzerlik göstermiştir. Ancak iskelelerin bulunduğu bölgelerde (h/m/i) kontrole göre (h/m) canlılığın 48 ve 72 saat sonunda azaldığı görülmüştür. Nanofiberler, % 2 gluteraldehit (GA) ile çapraz bağlandı. GA, biyobozunur/ biyoyumlu ve maliyeti düşük olduğundan sıklıkla çapraz bağlanma bileşeni olarak tercih edilmesine rağmen toksik özellik göstermektedir. Bu nedenden dolayı çalışmamızdaki canlılık azalışının zaman içinde gluteraldehitin toksik özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, h/m/i ile ifade edilen bölgede canlılık h/m olan bölgeye göre azalmaktayken selenyum ilave edildiğinde (h/m/i/se) canlılık artmıştır (Tablo 4-1).



Şekil 4.10 Elektroçizme iskelelerin 24, 48, 72 saat MTT analizleri. 1. Hücre/ medyum (h/m), 2. Hücre/medyum / selenyum (h/m/se), 3. Hücre/medyum doku iskelesi (h/m/i), 4. Hücre/medyum doku iskelesi / selenyum (h/m/i/se). ($p < 0,05$)

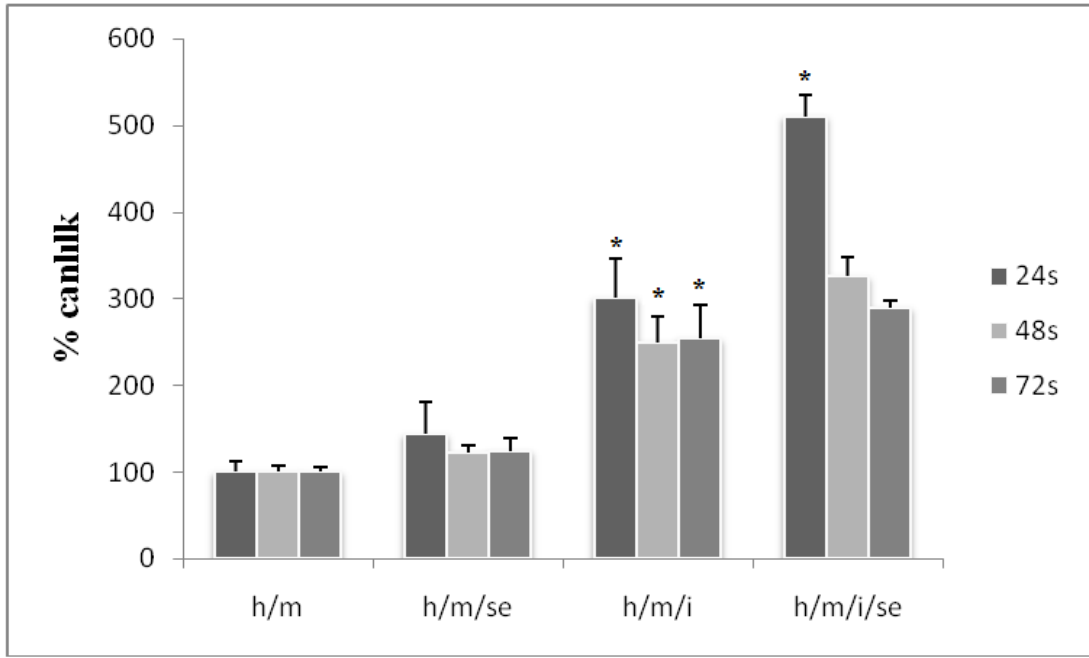
	h/m %canlılık	h/m/se %canlılık	h/m/i %canlılık	h/m/i/se %canlılık
24 saat	100	147	234	392
48 saat	100	131	81	80
72 saat	100	124	44	83

Tablo 4-1 Elektroeğirme PVA/JE doku iskelelerinin % canlılık oranları (p <0,05)

4.3.3. Dondurma/Kurutma PVA/JE Doku İskelelerinin Sitotoksitate Analizi

Diğer yandan Se'nin dondurma/kurutma tekniği ile elde edilen hücre ekili polimerik PVA/JE doku iskeleleri üzerindeki sitotoksik etkisi Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Bu yöntem başlamadan önce PVA/JE (1:1 v/v), % 0.75 GP ile 24 saat oda sıcaklığında çapraz bağlandı. İki ayrı 10 ml'lik PVA/JE karışımının birine 5 ml GP içeren dondurma/kurutma iskelesi ve diğerine 8 ml GP içeren dondurma/kurutma iskelesi verilmek üzere % 0,75 GP çözeltisinden iki ayrı konsantrasyon hazırlandı. GP'nin biyoyumlu olması ve toksisitesinin yok denecek kadar az olmasından dolayı, kolajen ve jelatin bazlı polimerlerin çapraz bağlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Bigi ve ark. 2002). Bunların yanı sıra, *in vivo* deneyler sonucunda GP'nin anti-inflamatuvar özelliğine sahip olduğu ve bu sayede tedavi edici bir yaklaşımının olduğu doğrulanmıştır (Dare ve ark. 2009; Macaya ve ark. 2013). Ayrıca GP'nin, GA'te göre 10,000 kat daha düşük sitotoksiteye sahip olduğu bilinmektedir (Sung 2002).

Bu yöntemde, elektroeğirme yönteminde kullanılan MTT analizinde olduğu gibi gruplar, ortamda selenyum ve doku iskelesi varlığında ve yokluğunda oluşturuldu: 1. Hücre/medyum (h/m), 2. Hücre/medyum/selenyum (h/m/se), 3. Hücre/medyum/doku iskelesi (h/m/i), 4. Hücre/medyum/doku iskelesi/selenyum (h/m/i/se). 24, 48 ve 72 saat'lik inkübasyonları sonunda MTT analizlerine göre (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10) hücrelerin doku iskelelerine tutunduğu ve canlı olduğu gösterilmektedir.

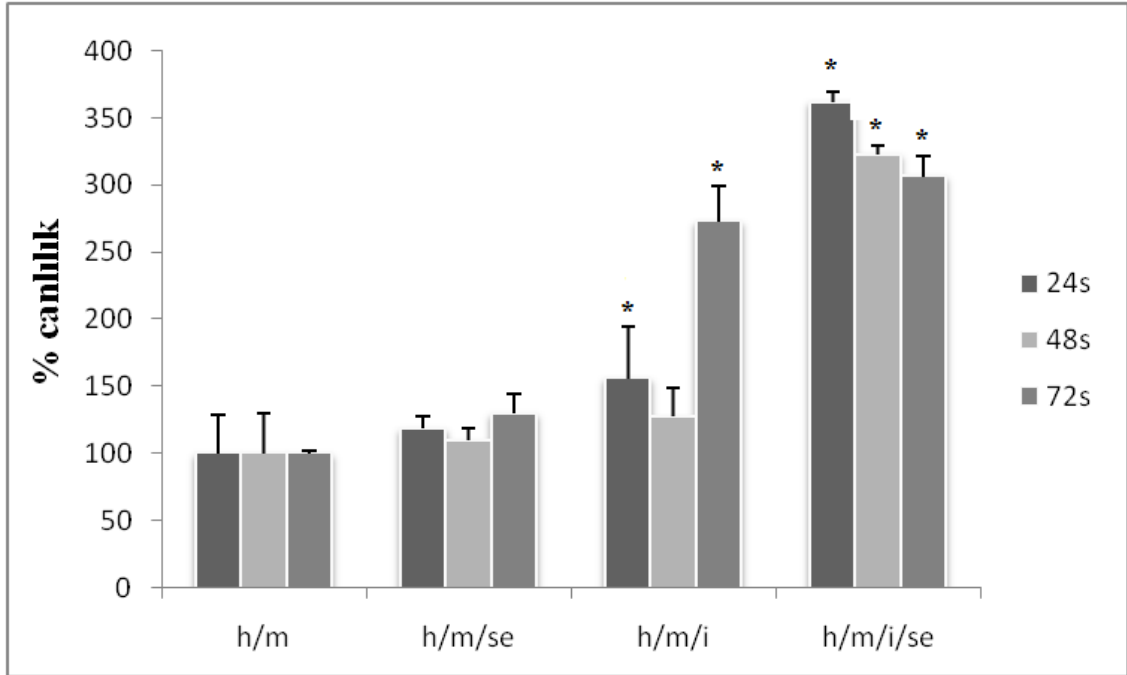


Şekil 4.11 5 ml GP içeren dondurma/kurutma iskelelerin MTT analizleri. 1. Hücre/medyum (h/m), 2. Hücre/medyum/selenyum (h/m/se), 3. Hücre/medyum/doku iskelesi (h/m/i), 4. Hücre/medyum/doku iskelesi/selenyum (h/m/i/se). (p < 0,05)

Dondurma/kurutma iskelelerinin grafiğine (Şekil 4.11) bakıldığında ilk 24 saat içinde iskelede, selenyum ve doku iskelesi bulunan ortamların selenyumun ve doku iskelesinin olmadığı ortamlara göre canlılık artmıştır. 48 ve 72 saat sonunda ise canlılık, selenyumun olduğu ortamın olmadığı ortama ve doku iskesinin olduğu ortamın bulunmadığı ortama göre artmıştır. Grafik, verilen sürelerde incelendiğinde h/m/se ‘de h/m’ye göre anlamlı bir artış görülmemiştir. İncelendiğinde selenyumlu ortamdaki canlılık selenyumsuz ortama göre, iskelenin bulunduğu ortamın bulunmadığı kontrolüne göre anlamlı derecede artmıştır (Tablo 4-2).

	h/m %canlılık	h/m/se %canlılık	h/m/i %canlılık	h/m/i/se %canlılık
24 saat	100	144	318	511
48 saat	100	122	226	324
72 saat	100	119	197	293

Tablo 4-2 5 ml GP içeren dondurma/kurutma PVA/JE doku iskelelerinin % canlılık oranları (p <0,05)



Şekil 4.12 8 ml GP içeren dondurma/kurutma iskelelerin MTT analizleri). 1. Hücre/medyum (h/m), 2. Hücre/medyum/selenyum (h/m/se), 3. Hücre/medyum/doku iskelesi (h/m/i), 4. Hücre/medyum/doku iskelesi/selenyum (h/m/i/se). (p < 0,05)

Şekil 4.12 incelendiğinde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda selenyumun selenyumsuz ortama göre canlılığı arttığı görülmektedir. Aynı şekilde canlılıkta, doku iskelesinin varlığında yokluğuna göre artış gözlemlenmektedir (Tablo 4-1). Bakıldığında 5 ve 8 ml'lik GP içeren her iki grafikte de doku iskelesi ve selenyum bulunan ortamlarda kontrole kıyasla canlılık artmış durumdadır. Burada GP'nin yüksek konsantrasyonlarda toksik olabileceği ile düşünülebilir (Tablo 4-3).

	h/m %canlılık	h/m/se %canlılık	h/m/i %canlılık	h/m/i/se %canlılık
24 saat	100	119	156	361
48 saat	100	109	127	322
72 saat	100	123	215	283

Tablo 4-3 8 ml dondurma/kurutma PVA/JE doku iskelelerinin % canlılık oranları (p <0,05)

5. TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü Türkiye’de 2000 yılında yaklaşık 3 milyon olan diyabetli sayısının 2030 yılında 6,5 milyona ulaşacağı öngörüsünde bulunmaktadır. Fakat, henüz 2014 yılındayken bu tahmin aşılmış ve bugün diyabetli sayısı 7 milyonun üstüne çıkmıştır. Türkiye diyabet vakfi bildirisine göre, Dünya Sağlık Örgütü Türkiye’de 2000 yılında yaklaşık 3 milyon olan diyabetli sayısının 2030 yılında 6,5 milyona ulaşacağını tahmin etmiş, ancak 2030 için tahmin edilen bu değer 2014 yılında aşılmış ve ülkemizdeki diyabetli sayısı 7 milyonun üstüne çıkmıştır. Diyabetik yaralar ile birlikte yanık yaraları, kronik yaralar gibi deri doku ve fonksiyon kaybı oluşturabilen problemler, insan ve hayvan hayatını olumsuz etkilemektedir.

Son yıllarda bu olumsuzluklar göze alınarak, polimerik iskeleler kullanılması ile yara iyileştirilmesi alanında birçok teknik geliştirilmiştir. Yaygın olarak geliştirilen yara sargı bezleri bunların başında gelmektedir. Yara sargı malzemesinin, biyopolimerler ve üretim teknikleri sayesinde yaranın iyileşme sürecini arttıran özelliklere sahip olması beklenmektedir (Zahedi 2009).

Bu çalışmada, elektroğirme ve dondurma/kurutma yöntemleri kullanılarak, biyobozunur PVA/JE yapılı, çapraz bağlı, gözenekli yapay doku iskeleleri elde edildi. Jelatinin, yara iyileşmesinde epitelizasyon ve granülasyon dokusu oluşturduğu gözlemlenmiştir. Fakat jelatinin mekanik dayanımı zayıf olduğundan biyobozunur, toksisitesi düşük polimerler ile birlikte kullanılmaktadır (Zhong 2010). Bu nedenle çalışmada jelatin ile birlikte PVA kullanıldı.

Bu projede yapılan çalışmalar PVA/JE bazlı doku iskeleleri hazırlanarak, 3T3 hücrelerinin varlığında selenyumun etkisinin incelendiği *in vitro* uygulanarak yapılmıştır. Elde edilen iskelelerin SEM analizleri, dondurma kurutma ve elektroğirme yöntemlerin her ikisinde de gözenek boyutunun ve yapısının fibroblast hücrelerin gözeneklere tutunabilmesi için elverişlidir (Bhardwaj 2010). SEM analizi, elektroğirme ile oluşturulan nanofiber yapıların örgüsüz ve boğumsuz olduğunu ve damla oluşturmadığını gösterdi.

SEM görüntülerinin Imaje J programı ile gözenek boyutları incelendi (Şekil 4.2). 5 ml dondurma/kurutma PVA/JE doku iskelelerinde 110 µm olarak hesaplanırken

(Şekil 4.2 A), 8 ml dondurma/kurutma doku iskelelerinin gözenek boyutu ortalama değeri 98 µm olarak belirlendi (Şekil 4.2 B). Çapraz bağlama yapılırken GP oranı yüksek olan dondurma/kurutma iskelelerinin çok sayıda gözeneğe sahip olduğu fakat gözenek boyutlarının daha küçük olduğu gözlemlendi. Elektroegirme ile elde edilen PVA/JE doku iskelelerinin ortalama gözenek boyutu 97 µm olarak kaydedildi (Şekil 4.3).

PV/JE doku iskeleleri hücre varlığında ve yokluğunda birbirleri ile kıyaslandığında SEM fotoğraflarında morfolojik farklılıklar olduğu görülmektedir. Morfolojik yapının değişmesinde en büyük etkenin iskelelere sonradan çapraz bağlama yapılması ve SEM'den görüntü almak için hücrelerin sabitlenmesinde alkol ile dehidre edilmesi düşünülmektedir.

İskelelerin suyu hapsedme kapasitesi test edilerek 5 ml GP içeren dondurma/kurutma iskelesi için % 828'e yükselirken, 8 ml GP içeren iskelede ise % 761'yükseldi. Su tutma oranlarının yüksek olması gözeneklere fibroblast hücrelerin tutunması için uygun görülmüştür. Yara bezleri kullanımında hazırlanan doku iskelesinin su tutma kapasitesi, nem miktarını artırır ve böylelikle yaralı bölgeler için avantaj sağlar (Sheridan 2001).

Diğer yandan selenyumun anti-oksidan, anti-bakteriyel, anti-kanser (Nazıroğlu ve ark. 2013), proliferasyon artırıcı (Zhu ve ark. 1992; Shamberger 1970), yara iyileştirici (Gümüştekin ve ark. 2004) ve iyileşmeyi hızlandırıcı (Bajpai ve ark. 2011) gibi özelliklerinden dolayı hücrelerin ekili olduğu PVA/JE doku iskeleleri ile beraber yara iyileşimi sürecindeki olumlu etkilerinin bilimsel birikime katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Se düşük konsantrasyonlarda epilepsi (Nazıroğlu 2009) ve ağrı gibi bir çok nörolojik hastalıklarda nöroprotektif özellik göstermesine rağmen yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösterir. Se'nin nöroprotektif özelliği, apoptozu önleme kabiliyeti ve iyon kanalları aracılığı ile Ca^{+2} girişini düzenlemesine bağlıdır (Uğuz ve ark. 2012).

Se'nin yararlı etkilerinin yanı sıra toksik etkileri de görülmektedir. Ayrıca, Se'nin toksik etkileri doz derişimine bağı olarak Ca^{+2} girişini uyardığı bilinmektedir (Schweizer 2004, Uğuz ve ark. 2009, Uğuz ve Nazıroğlu 2012).

GA ile çapraz bağı ve hücre ekili elektroegirme iskelelerinin 24 saatten sonra hücre canlılığında, kontrole kıyasla azalma görülürken, aynı doku iskeleleri üzerine selenyum verildiğinde, canlılığın arttığı görüldü. GA'in canlılıkta azalış göstermesi sitotoksitesinin yüksek olmasından kaynaklandığı daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Gough 2002). Diğer yandan GP ile çapraz bağı, dondurma/kurutma ile oluşturulan iskelelerde canlılıkta kontrole göre artış bulundu. Bu iskelelere selenyum verildiğinde ise kontrol ile karşılaştırıldığında yine canlılığın arttığı gözlemlendi (Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12). GP oranının fazla olduğu iskelelerde canlılığın azalması, yüksek konsantrasyonlarda GP'nin toksik olabileceği düşünülmektedir (Sheck 2011).

Burada selenyumun hücre ekili PVA/JE doku iskeleleri üzerinde çoğalmayı arttırdığı incelendi. Doku mühendisliği çalışmaları günümüzde bir çok biyomateryal ve büyüme faktörleri kullanılarak yapılmaktadır. Öte yandan selenyumla birçok araştırma mevcut olmasına rağmen PVA/JE doku iskeleleri ile birlikte sinerjik etki oluşturup oluşturmadığı ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu tez çalışmasında, selenyumun 3T3 hücrelerin proliferasyonunu artırdığı sonucuna göre doku iskeleleri ile kullanılarak yara iyileştirici biyomedikal ürünlerin elde edilmesi ve klinik çalışmalara ön hazırlık yapılması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

Abrigo M, McArthur SL, Kingshott P. “Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: advances, challenges, and future prospects”. *Macromolecular Bioscience* 2014; 14(6): 772-792.

Arıkan A. “Doku iskelelerinin süperkritik karbondioksit ortamında hazırlanması ve karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi 2013.

Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. “Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty”. *The lancet*. 2006; 367:1241-1246.

Bajpai S, Mishra M, Kumar H, Tripathi K, Singh SK, Pandey PH, Singh RK, “Effect of Selenium on Connexin Expression, Angiogenesis, and Antioxidant Status in Diabetic Wound Healing”. *Springer Science+Business Media* 2011; 144: 327–338.

Babensee JE, McIntire LV, Mikos AG, “Growth Factor Delivery for Tissue Engineering”, *Pharmaceutical Research*, 2000; 17:497–504.

Balasubramani M. “ Skin Substitutes: A Review” *Burns* 2002;27:534-544.

Bhardwaj N, Kundu SC. “Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique”. *Biotechnology Advances* 2010; 28: 325–347.

Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Roveri N, Rubini K. “Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin “. *Biotechnology Advances* 2002 28:325-347.

Briscoe B, Luckham P, Zhu S. “The effects of hydrogen bonding upon the viscosity solutions”. *Polymer* 2000; 41:3851–3860.

Chen HC, Jao WC, Yang MC. “Characterization of gelatin nanofibers electrospun using ethanol/formic acid/water as a solvent”. *Polym Adv Technol* 2009; 20:98–103.

Choi YS, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam YS. “Study on gelatincontaining artificial skin: I. Preparation and characteristics of navel gelatin alginate sponge”. *Biomaterials* 1999;20:409–17.

Choi YS, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam YS. “Study on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge”. *J Biomed Mater Res* 1999;48:631–9.

Choi YS, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam YS. “Studies on gelatin-based sponges. Part III: a comparative study of cross-linked gelatin/alginate, gelatin/hyaluronate and chitosan/hyaluronate sponges and their application as a wound dressing in full-thickness skin defect of rat”. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12:67–73.

Çakmak S,” Kemik doku onarımı için hidrosiyapatit/peptit amfifil bazlı nanokompozit doku iskelelerinin geliştirilmesi”. Doktora tezi 2015.

Çiğ B, “Oksaliplatinin neden olduğu nöropatik ağrı ve TRPV1 kanal aktivasyonu üzerinde selenyumun koruyucu etkisinin sıçan ve hücre kültürü ortamında moleküler tekniklerle araştırılması”. Doktora tezi 2018.

Dare EV, Griffith M, Poitras P, Kaupp JA, Waldman SD, Carlsson DJ, Dervin G, Mayoux C, Hincke MT. “Genipin Cross-Linked Fibrin Hydrogels for in vitro Human Articular Cartilage Tissue-Engineered Regeneration”. *Cells Tissues Organs* 2009; 190: 313.

Dusinska M. Runden-Pran E. Carreira SC. Saunders M. “Critical evaluation of toxicity tests, In: Adverse Effects of Engineered Nanomaterials”. Fadeel, B. Pietroiusti A. Shvedua AA. (eds), Academic Press. 2012;63-83.

Fergal J. O’Brien. “Biomaterials & scaffolds for tissue engineering”. *Materials today*, 2011;14:3:88-95.

Ganther H.E. Hafeman D.G. Lawrence R. A., Serfass R.E. Hoekstra.W.G. “Selenium and glutathione peroxidase in health and disease—a review. In Prasad VS. (ed.), *Trace Elements in Human Health and Disease*”. New York, Academic Press, Inc., 1976;165-234.

Gough JE, Scotchford CA, Downes S. “Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis”. *Journal of Biomedical Materials* 2002:121-130.

Gümüşderelioğlu M. “Doku mhendisliğinde nanoteknoloji”. Bilim ve Teknik, TBİTAK 2007.

Gümüşderelioğlu M. “ Doku mühendisliği ve rnleri”. Bilim ve Teknik, TBİTAK 2010.

Gümüştekin K, Seven B, Karabulut N, Aktaş , Grsan N, Aslan şahin, Keleş M, Varoğlu E, Dane ř. “Effects of sleep deprivation, nicotine, and selenium on wound healing in rats”, Intern. J. Neuroscience 2004; 1433-1442.

Habraken WJEM, Wolke JGC, Mikos AG and Jansen JA. “Porcine gelatin microsphere/calcium phosphate cement composites: an in vitro degradation study”. J Biomed Mater Res B 2009; 91B: 555–561.

Haaparanta AM. “Highly Porous Freeze-Dried Composite Scaffolds for Cartilage and Osteochondral Tissue Engineering”. Tampere University of Technology. Publication Tampere University of Technology 2015; 1290.

Hatfield DU, Berry MJ, Gladyshev VN. “Selenium: Its molecular biology and role in human health” Springer Science+Business Media 2016; 4th ed., pp. IX–XI.

Holzwarth JM, Ma PX. “Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering”, Biomaterials 2011; 32 : 9622-962.

Hauch KD, Ratner BD.” Microscopy for biomaterials science. In: Biometaterials Science An Introduction to Materials in Medicine”. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. (eds), Elsevier Academic Press 2013;677-692.

Huang CY, Hu KH, Weil ZH. “Comparison of cell behavior on pva/pva-gelatin electrospun nanofibers with random and aligned configuration”.Scientific Reports 2016;6:37960.

Karakeçili AG. “Mikrodesenli biyoaktif malzemelerin dizaynı, karakterizasyonu ve doku mhendisliğindeki uygulamaları”. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi 2006.

Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. “Selenoproteins: Molecular pathways and physiological roles” Physiological Reviews, 2014; 94 (3) :739-777

Langer R, Vacanti JP. "Tissue engineering". *Science* 1993;260:920– 926.

Lee SB, Kim YH, Chong MS, Hong SH, Lee YM. "Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method". *Biomaterials* 2005;26:1961–8.

Li J, He A, Zheng J, Han CC. "Gelatin and gelatin hyaluronic acid nanofibrous membranes produced by electrospinning of their aqueous solutions". *Biomacromolecules* 2006;7:2243–2247.

Liu Y, Li W, Guo M, Qiu C. "Protective role of selenium compounds on the proliferation, apoptosis, and angiogenesis of a canine breast cancer cell line". *Biol Trace Elem Res* 2015;169:86–93.

Liu X, Smith LA, Hu J and Ma PX. "Biomimetic nanofibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering". *Biomaterials* 2009; 30: 2252–2258.

Lysaght MJ, Jaklenec A, Deweerd E. "Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics". *Tissue Engineering Part A* 2008;14: 2 .

Macaya DJ, Hayakawa K, Arai K, Spector M. "Astrocyte infiltration into injectable collagen-based hydrogels containing FGF-2 to treat spinal cord injury". *Biomaterials* 2013; 34: 3591.

Maheshwari SU, Kumar SV, Nagiah N, Uma TS. "Electrospinning of polyvinylalcohol–polycaprolactone composite scaffolds for tissue engineering applications". *Polymer bulletin* 2013; 70(11) :2995-3010.

McKeehan WL, Uton WG, Ham RG. "Selenium is an essential trace nutrient for growth of WI-38 diploid human fibroblasts". *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*, 1976;73: 2023-2027.

McKenzie RC, Arthur JR, Beckett GJ. "Selenium and the regulation of cell signalling, growth, and survival: molecular and mechanistic aspects". *Antioxid Redox Signal* 2002;4:339;351.

McKenzie RC, Rafferty TS, Beckett GJ. "Selenium: an essential element for immune function". *Immunol Today* 1998; 19: 342±5.

Nazıroğlu M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy". *Neurochem Res* 2009;34:2181-2191.

Nazıroğlu M, Kutluhan S, Yilmaz M. "Selenium and topiramate modulates brain microsomal oxidative stress values, Ca²⁺-ATPase activity, and EEG records in pentylentetrazol-induced seizures in rats". *J Membr Biol* 2008;225:39–49.

Nazıroğlu M, Özgül C, Küçükayaz M, Çiğ B, Hebeisen S, Bal E. "Selenium Modulates Oxidative Stress-Induced TRPM2 Cation Channel Currents in Transfected Chinese Hamster Ovary Cells", *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2013; 96:102.

Nazıroğlu M, Yurekli VA. "Effects of antiepileptic drugs on antioxidant and oxidant molecular pathways: focus on trace elements". *Cell Mol Neurobiol* 2013; 33: 589–599.

Overvad K, Thorling EB, Bjerring P, Ebbesen P. "Selenium inhibits UV-light induced skin carcinogenesis in hairless mice". *Cancer Lett* 1985; 27: 163±70.

Paramonov SE, Jun HW, Hartgerink JD. "Self-Assembly of Peptide–Amphiphile Nanofibers: The Roles of Hydrogen Bonding and Amphiphilic Packing", *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128 (22): 7291–7298.

Rambo CR, Recouvreux DOS, Carminatti CA, Pitlovanciv AK, Antônio RV, Porto LM. "Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering" *Materials Science and Engineering* 2008; 28:549-554.

Reverchon E, Cardea S. "Supercritical fluids in 3-D tissue engineering", *Journal of Supercritical Fluids* 2012; 69:97-107.

Rieger KA, Birch NP, Schiffman JD. "Designing electrospun nanofiber mats to promote wound healing—a review". *Journal of Materials Chemistry B* 2013;1(36): 4531-4541.

Schimming R, Schmelzeisen R. "Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation". *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2004;724-729.

Schweizer U, Brauer AU, Ko'hrle J, Nitsch R, Savaskan NE. "Selenium and brain function: a poorly recognized liaison". *Brain Res Rev* 2004;45:164-178.

Shamberger RJ. "Relationship of Selenium to Cancer. I. Inhibitory Effect of Selenium on Carcinogenesis". *J Nat Cancer Inst* 1970; 44: 931-936.

Sheridan RL, Morgan JR, Mohammad R. "Biomaterials in Burn and Wound Dressings" *Polymeric Biomaterials*, Edited by Dumitriu S. chapter 2001; 17; 8.

Sill TJ, Recum VHA. "Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering". *Biomaterials* May 2008; 29: 1989-2006.

Singh M, Kasper FK, Mikos AG. "Tissue Engineering Scaffolds, In: *Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine*". *Biomaterials Science (Third Edition) An Introduction to Materials in Medicine* 2013; 1138-1159.

Soltanahmadi YP, Akbarzadeh A, Moazzez-Lalaklo N, Zarghami N. "An update on clinical applications of electrospun nanofibers for skin bioengineering". *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* 2016; 44(6): 1350-1364.

Soltanahmadi YP, Mehdi D, Abbas M, Amir F, Roghayeh S, Nosratollah Z. "An Overview on Application of Natural Substances Incorporated with Electrospun Nanofibrous Scaffolds to Development of Innovative Wound Dressings". *Medicinal Chemistry* 2018; 18:414-427.

Spallholz JE, Boylan LM, Larsen HS. "Advances in understanding selenium's role in the immune- system". *Ann N Y Acad Sci* 1990; 587: 123±39.

Steinbu A, Matsumura S. "Biopolymers". Weinheim, Cambridge: Wiley 2002.

Sung HW. "Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin". *Biomaterials* 2002;23:4827-32.

Şimşek M, Çapkın M, Karakeçili A, Gümüşderelioğlu M. "Chitosan and polycaprolactone membranes patterned via electrospinning: Effect of underlying chemistry and pattern characteristics on epithelial/fibroblastic cell behavior". *J Biomed Mater Res Part A* 2012;100A:3332-3343.

Tang M, Xing T, Zeng J, Wang H, Li C, Yin S. “Unmodified CdSe quantum dots induce elevation of cytoplasmic calcium levels and impairment of functional properties of sodium channels in rat primary cultured hippocampal neurons”. *Environ Health Perspect* 2008;116:915–22.

Tran PA, Sarin L, Hurt RH, Webster TJ. “Titanium surfaces with adherent selenium nanoclusters as a novel anticancer orthopedic material”. *Journal of biomedical science* 2010; 1417-1428.

Uğur M, Ayaz M, Ozdemir S, Turan B. Toxic concentrations of selenite shortens repolarization phase of action potential in rat papillary muscle. *Biol Trace Elem Res* 2002;89:227–38.

Uğuz AC, Nazıroğlu M. “Effects of Selenium on Calcium Signaling and Apoptosis in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons Induced by Oxidative Stress”. *Neurochem Res* 2012;37:1631–1638.

Uğuz AC, Nazıroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB et al. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells via regulation of caspase-3, -9 and calcium influx. *J Membr Biol* 2009;232:15–23.

Vacanti JP, Vacanti C. “The challenge of tissue engineering”. In: Chick WL, ed. *Principles of Tissue Engineering*. Austin, TX: Academic Press 1997;1–6.

Vrana NE, Liu Y, McGuinness GB, Cahill PA. “Characterization of poly(vinyl alcohol)/chitosan hydrogels as vascular tissue engineering scaffolds”. *Macromol Symp* 2008;269: 106–110;

Yang D, Li Y, Nie J. “Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs”. *Carbohydr Polym* 2007; 69: 538–543;

Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. “The design of scaffolds for use in tissue engineering. II. Rapid prototyping techniques”. *Tissue Eng* 2002;8:1–11.

Yannas IV, Lee E, Orgill DP, Skrabut EM, Murphy GF. "Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin". PNAS 1989; 86: 933.

Yanzhong Z, Hongwei O, Chwee TL, Seeram R, Zheng MH. "Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds". J Biomed Mater Res 2005; 72B: 156–165;

Zahedi P, Rezaeian I, Omid S, Siadat R, Jafari SH. "A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages", Wiley InterScienc 2009; 77-95.

Zhang RG, Skarina T, Katz JE, Beasley S, Khachatryan A, Vyas S, Arrowsmith CH, Clarke S, Edwards A, Joachimiak A, Savchenko A. "Structure of Thermotoga maritima Stationary Phase Survival Protein SurE: A Novel Acid Phosphatase ". Structure 2001;1095-1106.

Zhang Y, Ouyang H, Lim CT, Ramakrishna S, Huang ZM. "Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds". J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2005; 72: 156–165.

Zhang Y, Venugopal J, Huang Z-M, Lim C, Ramakrishna S. "Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers". Polymer. 2006; 47:2911–2917.

Zhong SP, Zhang YZ, Lim CT. "Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction", Wiley & Sons, Inc. WIREs Nanomed Nanobiotechnol 2010; 510-525

Zhu S, Gray TE, Nettesheim P. "The effect of sodium selenite on cell proliferation and transformation of primary rat tracheal epithelial cells", Carcinogenesis 1992; 1725–1729.

Qin XI, Wang SEI. "Filtration properties of electrospinning nanofibers". J Appl Polym Sci 2006; 1285-1290.

Warnk PH, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmöller M, Russo PAJ, Bolte H, Sherry E, Behrens E, Terheyden H. “Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man”. August–3 September 2004;364:766-770.

Wirth EK, Conrad M, Winterer J. “Neuronal seleno-protein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration”. *FASEB J* 2010;24:844-852.

Wnek GE, Carr ME, Simpson DG, Bowlin GL. “Electrospinning of nanofiber fibrinogen structures”. *Nano Lett.* 2003; 3:213–216.

Xiao J, Duan H, Liu Z, Wu Z, Lan Y, Zhang WLiC, Chen F, Zhou Q, Wang X, Huang J, Wang Z. “Construction of the recellularized corneal stroma using porous acellular corneal scaffold” *Biomaterials* 2011; 32: 6962-6971.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

BİYOBOZUNUR VE BİYOUYUMLU POLİMERLERİN IN VITRO UYGULAMALARI

ORJİNALLIK RAPORU

%**6**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**3**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**5**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to <u>Cumhuriyet University</u> Öğrenci Ödevi	% 2
2	<u>www.tdhd.org</u> İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to <u>Istanbul University</u> Öğrenci Ödevi	<% 1
4	<u>e-dergi.marmara.edu.tr</u> İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to <u>Istanbul Bilgi University</u> Öğrenci Ödevi	<% 1
6	Submitted to <u>Okan Üniversitesi</u> Öğrenci Ödevi	<% 1
7	<u>193.255.140.18</u> İnternet Kaynağı	<% 1
8	<u>Pilehvar-Soltanahmadi, Yones, Abolfazi Akbarzadeh, Nasim Moazzez-Lalaklo, and Nosratollah Zarghami. "An update on clinical</u>	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	DEMET	Soyadı	ERDAĞ
Doğ.Yeri	AKYAKA	Doğ.Tar.	17.01.1989
Email	erdagdem@gmail.com	Uyruğu	T.C

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2019
Lisans	Gaziantep Üniversitesi	2014
Lise	Avcılar Süleyman Nazif Lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Satış ve Proje Mühendisi	Kolaylık Elektrik San.Tic.A.Ş	1,5
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	YÖK DİL Puanı
İngilizce	iyi	iyi	iyi		63,75

--	--	--	--	--	--

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70,69		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Windows	
Linux	
Java, C++, Matlab, Fortran, Phyton	

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlara:

BAP: 2017- Kanser İlaç Direncinde CD38 /Ca²⁺ Sinyal Yolağının Rolü (Proje Yürütücüsü- Prof. Dr. Leman Yalçın-tepe Güneş-tutar- İÜ Çapa Tıp Fak. Biyofizik Anabilim Dalı - devam eden proje)

Uluslararası Yayın: 2018- Intracelluler Calcium [Ca²⁺] Homeostasis in Cisplatin (CDDP) Resistance MDAH-2774 (Proje Yürütücüsü- Prof. Dr. Leman Yalçın-tepe Güneş-tutar- İÜ Çapa Tıp Fak. Biyofizik Anabilim Dalı)

Sertifikalar:

- 2017 Teorik ve Uygulamalı Doku Mühendisliği Sertifikası - Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği
- 2016-2017 İÜ. Sağlık Bil.Ens. İntihal ve Yayın Etiği Çalıştayı Katılım Belgesi
- 2015-2016 Pedagojik Formasyon Eğitimi - Yıldız Teknik Üniversitesi
- 2014 Diksiyon Eğitimi Sertifikası - Başarı Noktası
- 2014 C sınıfı İş Sağlığı ve İşçi Güvenliği Sertifikası - Anadolu Akademi

- 2013 Fotovoltaik Enerji sistemleri Sertifikası – Fizik Mühendisleri Odası

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Kitap – dergi okumak, film izlemek, spor aktivitelerinde bulunmak, ney üflemek, çizim yapmak.

