



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**POLİ(LAKTİK ASİT) KULLANILARAK
NEOVASKÜLARİZASYONA UYGUN *IN SITU*
BAKTERİYEL SELÜLOZ ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Neriman SAFA

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**POLİ(LAKTİK ASİT) KULLANILARAK
NEOVASKÜLARİZASYONA UYGUN *IN SITU*
BAKTERİYEL SELÜLOZ ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

Neriman SAFA

Danışmanlar : Prof. Dr. E. Esin HAMEŞ TUNA

Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR

Biyomühendislik Ana Bilim Dalı
Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir
2019

Neriman SAFA tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan ‘‘Poli(laktik asit) Kullanılarak Neovaskularizasyona Uygun *In Situ* Bakteriyel Selüloz Üretimi ve Karakterizasyonu’’ başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 07.08.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

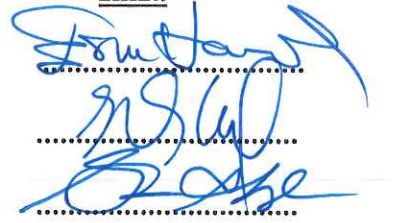
Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı :Prof. Dr. E. Esin HAMEŞ TUNA

Raportör Üye :Doç. Dr. Evrim ÖZKALE KAYA

Üye :Prof. Dr. Sinan AKGÖL

İmza

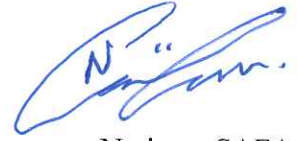


EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Poli(laktik asit) Kullanılarak Neovaskülarizasyona Uygun *In Situ* Bakteriyel Selüloz Üretimi ve Karakterizasyonu” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışım olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

06 / 08 / 2019



Neriman SAFA

ÖZET**POLİ(LAKTİK ASİT) KULLANILARAK
NEOVASKÜLARİZASYONA UYGUN *IN SITU* BAKTERİYEL
SELÜLOZ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

SAFA, Neriman

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. E. Esin HAMEŞ TUNA

İkinci Danışman: Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR

Ağustos 2019, 86 sayfa

Bu tez çalışmasının amacı, 3 boyutlu (3B) yazıcı ile basılan damar modelinde polilaktik asit (PLA) kalıbı kullanılarak hücre göçüne ve neovaskülarizasyona izin verecek şekilde *in situ* modifiye edilen BS membranın yapay deri ikamesi olarak kullanım potansiyelinin belirlenmesidir.

Bu kapsamda 3B yazıcı ile basılan PLA kalıp, *Gluconacetobakter xylinus* üretim ortamına yerleştirilerek BS/PLA biyokompoziti oluşturuldu. İnkübasyon sonrası hasat edilen BS/PLA biyokompozitinden, PLA kalıp kloroform kullanılarak uzaklaştırıldı. Yıkama prosedüründen sonra BS membranında oluşan 3B damar modelinde kanal yapılarının boyutları ve BS membranın saflığının belirlenmesi SEM, ATR-FTIR, Micro-CT, ışık mikroskobu ile karakterize edildi. Ardından BS membranın *in vitro* hayvan hücre kültürü denemeleri için HUVEC hücre hattı kullanılarak floresan ışık mikroskobu ile analizi gerçekleştirildi.

Bu çalışmada, 3B yazıcı ile basılan damar modelinde PLA kalıp kullanılarak yeni bir modifikasyon tekniği ile *in situ* üretilen BS membranın, neovaskülarizasyona imkan sağlayacak özellikte ve deri ikamesi olarak kullanım potansiyelinde olduğu gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: Bakteriye selüloz, polilaktik asit, deri ikamesi, biyomalzeme, 3B yazıcı, neovaskülarizasyon

ABSTRACT***IN SITU* BACTERIAL CELLULOSE PRODUCTION SUITABLE
FOR NEOVASCULARIZATION USING POLY(LACTIC ACID)
AND ITS CHARACTERIZATION**

SAFA, Neriman

MSc in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. E. Esin HAMES TUNA

Second Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aylin SENDEMİR

August 2019, 86 pages

The aim of this study is to determine the potential for use as an artificial skin substitution of the BC membrane modified *in situ* to allow cell migration and neovascularization using vascular structured polylactic acid (PLA) template which printed with a 3 dimensional (3D) printer.

In this context, *in situ* production of BC/PLA biocomposite was formed by PLA template and bacterial cellulose produced using *Gluconacetobacter xylinus* strain. After *in situ* BS production, PLA was removed from the harvested BC/PLA biocomposite using chloroform as a solvent. Characterization tests were carried out with SEM, ATR-FTIR, Micro-CT, light microscopy and *in vitro* animal cell culture experiments using HUVEC cells to determine the size in the 3D vascular model formed in the BC membrane, and purity of the BC after washing procedure of BC membrane.

In this study, it was shown that BC membrane produced *in situ* by a new modification technique has the potential to allow neovascularization and has the potential to be used as skin substitution using a vascular model PLA template which printed with a 3D printer.

Keywords: Bacterial cellulose, polylactic acid, skin substitute, biomaterial, 3D printer, neovascularization.

ÖNSÖZ

Bu araştırmanın amacı, piyasadaki deri ikamelerinin dezavantajlarından biri olan neovaskülarizasyona (damar oluşturma) dikkat çekerek, bir biyopolimer olan bakteriyel selülozun (BS) neovaskülarizasyona ve migrasyona olanak sağlayacak şekilde yeni bir yaklaşım ile 3 boyutlu (3B) polilaktik asit (PLA) kalıp kullanılarak ileri modifikasyonunun yapılmasıdır. Çalışma konusunun belirlenmesinde ve çalışmanın hazırlanma sürecinin her aşamasında bilgilerini, tecrübelerini ve değerli zamanlarını esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. E. Esin HAMEŞ TUNA ve Doç. Dr. Aylın ŞENDEMİR'e ile bana emeği geçen bütün ekibime teşekkürü bir borç bilirim.

İZMİR

06/08/2019

Neriman SAFA

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| İÇ KAPAK | (iii) |
| KABUL ONAY SAYFASI | (v) |
| ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI..... | (vii) |
| ÖZET | (ix) |
| ABSTRACT | (xi) |
| ÖNSÖZ..... | (xiii) |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ..... | (xv) |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | (xix) |
| TABLolar DİZİNİ..... | (xxiii) |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | (xxv) |
| 1.GİRİŞ..... | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1 Deri ve Yapısı..... | 3 |
| 2.1.2 Deri hasarları | 8 |
| 2.1.3 Yara iyileşmesi ve yara iyileşmesinin biyokimyasal süreci | 9 |
| 2.1.4 Yara bakım ürünleri..... | 11 |
| 2.1.5 Dünya piyasasındaki yara bakım ürünlerinin durumu..... | 14 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 2.1.6 Deri ikamelerin kullanım kısıtları ve gelecek perspektifi..... | 16 |
| 2.2 Bakteriyel Selüloz..... | 17 |
| 2.2.1 BS'nin biyomedikal kullanım alanları..... | 20 |
| 2.2.2 Yara iyileştirici ve deri ikamesi olarak BS..... | 21 |
| 2.2.3 BS'nin diğer kullanım alanları..... | 23 |
| 2.3 Polilaktik asit (PLA)..... | 24 |
| 2.4 3D Printing (3B Yazıcı)..... | 25 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 27 |
| 3.1 3-Boyutlu (3B) Yazıcıda PLA Kalıbın Oluşturulması..... | 27 |
| 3.2 Mikroorganizma Aktivasyonu ve <i>in situ</i> BS Üretimi..... | 28 |
| 3.3 Mikroorganizmaların Stoklanması..... | 30 |
| 3.4 <i>In situ</i> BS/PLA Biyokompozitin Üretimi..... | 30 |
| 3.5 Bakteriyel Selüloz Hasadı..... | 31 |
| 3.6 Karakterizasyon Testleri..... | 33 |
| 3.6.1 SEM analizi..... | 33 |
| 3.6.2 ATR-FTIR analizi..... | 34 |
| 3.6.3 Işık mikroskobu analizi..... | 35 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 3.6.4 Micro-CT analizi | 36 |
| 3.6.5 <i>In vitro</i> hayvan hücre kültürü denemeleri..... | 37 |
| 4. BULGULAR..... | 43 |
| 4.1 3B PLA Kalıbın Çizimi ve Basımı | 43 |
| 4.2 BS Üretimi Açısından Mikroorganizma Suşlarının Karşılaştırılması | 43 |
| 4.3 <i>In Situ</i> BS/PLA Biyokompozit Üretimin Optimizasyonu | 43 |
| 4.4 PLA Kalıbın BS Membrandan Uzaklaştırılması | 46 |
| 4.5 Karakterizasyon İşlemlerinin Sonuçları | 49 |
| 4.5.1 SEM analizi | 49 |
| 4.5.2. ATR-FTIR spektrumu | 52 |
| 4.5.3 Işık mikroskobu analizi..... | 56 |
| 4.5.4 Micro-CT analizi | 57 |
| 4.5.5 <i>In vitro</i> hayvan hücre kültürü denemeleri..... | 58 |
| 5. TARTIŞMA..... | 59 |
| 6. SONUÇLAR..... | 64 |
| 7. ÖNERİLER..... | 65 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|-----------------------|--------------|
| KAYNAKLAR DİZİNİ..... | 67 |
| TEŞEKKÜR..... | 81 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 83 |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 2.1: Derinin yapısının şematik gösterimi..... | 4 |
| 2.2: Dermal damarların şematik gösterimi | 7 |
| 2.3: Yara iyileşme fazlarının bir şematik gösterimi | 10 |
| 2.4. Normal yara iyileşmesinin aşamalarının bir zaman çizelgesi..... | 11 |
| 2.5: Yara bakım ürünü pazarının geleneksel yara bakımından aktif yara bakımına kadar evrimi | 15 |
| 2.6: Gelişmiş yara bakım piyasası: Lider ulusal pazarlarda geliri gösteren bir grafik (milyar \$), 2011 | 15 |
| 2.7: Selülozun moleküler yapısı (n = polimerizasyon derecesi)..... | 18 |
| 2.8: <i>G. xylinus</i> tarafından selüloz mikrofibrillerin birleştirilmesinin görüntüsü..... | 19 |
| 2.9: Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü'nin Medikal Biyoteknoloji Laboratuvarında üretilen BS'ye örnek. Solda üretim sırasında BS, sağda ise yıkanmış saf BS'nin görüntüleri | 19 |
| 2.10: BS bazlı kompozitlerin çeşitli biyomedikal ve farmasötik uygulamalarının şematik bir gösterimi..... | 20 |
| 2.11: Yara örtüsü olarak BS membran | 21 |
| 2.12: Polilaktik asitin izomerik formları a) PLLA, b) PDLA ve c) PDLLA | 25 |
| 3.1: a) SOLIDWORKS 2017 çizim programındaki 3B damar modeli ve b) 3B yazıcıyla PLA malzemesi kullanılarak oluşturulan damar modelindeki kalıp | 27 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 3.2: a) Bölümümüzdeki 3 boyutlu (3B) yazıcı b) 3B kalıbın basımı yapan nozzle ve tablanın görüntüsü | 27 |
| 3.3: İp sistemi ile oluşturulmuş 3B PLA kalıbı | 28 |
| 3.4: Aşı kültürünün hazırlanması | 29 |
| 3.5: 3B PLA kalıpların, inokulumu yapılan HS besin ortamına steril koşullarda yerleştirilmesinin görüntüsü | 30 |
| 3.6: a) BS membranın alt yüzeyindeki gevşek fiber yapı steril bir spatül ile temizlenmesi ve b)BS/PLA biyokompozitin HS besin ortamında steril koşullarda ters çevrildikten sonraki görüntüsü | 31 |
| 3.7: 1 cm ² kare boyutlarında BS'den alınan örnekler SEM analizi için SEM cihazına yerleştirilmesinin görüntüsü | 34 |
| 3.8: a) PLA ve diğer besin ortam bileşenlerinden arındırılmış saf BS membranı ve b) BS içerisinde oluşturulan ağsı gözeneklere demir tuzu aktarımı sonrası | 36 |
| 3.9: MicroCT analizi için a) 3B PLA'dan arındırılmış BS ve b) demir tozu solüsyonu içeren BS örneğin görüntüsü | 37 |
| 3.10: HUVEC hücrelerin flaskın yüzeyine tutunduktan sonra ışık mikroskopundaki görüntüsü | 39 |
| 4.1: <i>G. xylinus</i> ATCC 70078 (solda) ve <i>G. xylinus</i> NRRL B-759 (sağda) suşları tarafından aynı koşullar altında üretilen saf BS membranların görüntüsü | 43 |
| 4.2: <i>In situ</i> BS üretim ortamına yerleştirilen a) beyaz ve b) siyah renkli 3B PLA kalıbın üst yüzeyini BS membranı ile kaplanması görüntüleri | 44 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 4.3: <i>In situ</i> BS/PLA biyokompozitin üretim sürecinde BS/PLA biyokompozitin ters çevirme işlemin görüntüsü | 45 |
| 4.4: a) Üretim ortamına yerleştirilen iskele, b) İskele kullanılarak <i>in situ</i> BS membranın üretimi süreci..... | 45 |
| 4.5: Gevşek selüloz nanofiberler temizlenmeden yapılan üretim sonrası iki katmanlı üretimi..... | 46 |
| 4.6: a) BS membranın 0.5 M NaOH ile yıkanması sonrası PLA kalıp uzaklaştıktan sonraki parçalanmış görünümü b) 2 M derişimde NaOH ile yıkama sonrası küçülerek buruşan BS membranlar ile normal BS membranı..... | 47 |
| 4.7: a) PLA kalıbın asetonun içerisinde 0. dk ve b) 45. dk görüntüsü, c) PLA kalıbın kloroform içerisindeki 0. dk ve d) 25. dakikadaki görüntülerit... | 47 |
| 4.8: a) BS membranın kloroform içerisine konulmadan önceki ve b) BS membranın 45 dk kloroform içinde bekletildikten sonraki görüntüsü... | 48 |
| 4.9: Optimize edilen BS yıkama prosedüründen elde edilen damar ağsı yapısına sahip BS membranın görüntüsü | 48 |
| 4.10: a) BS/PLA biyokompozitin fazla nemin alınması için filtre kağıdı üzerinde ve b) Optimize edilen yıkama prosedüründen sonraki BS membranın görüntüsü..... | 49 |
| 4.11: a, b) BS membranında oluşan damar modelindeki gözeneklerin SEM görüntüleri, c,d) SEM analizi ile görüntülenen gözeneklerin boyutları e) BS membranın PLA alt ve yüzeyinde birleştiği yerde oluşturduğu katma | |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

- ve f) kloroform ile yıkama sonrası BS membranın 3B nanofibril morfolojisini gösteren SEM görüntüleri 50-51
- 4.12: ATR-FTIR sonuçları: a) BS ile PLA, b) BS ile BS/PLA, c) PLA ile BS/PLA, d) BS, PLA ile BS/PLA grafikleri..... 53-55
- 4.13: BS membranına demir tuzu ($FeCl_2$) yüklemesinden sonra ışık mikroskopunda 20 μm skalasındaki görüntüleri.....56
- 4.14: a) Micro-CT cihazında demir tozu içeren BS örneğinden alınan bir kesitin ve b) örneğinin 3B modelinin görüntüleri.....57
- 4.15: BS membranın damar ağsı yapılarındaki HUVEC hücrelerin floresan ışık mikrobundaki a) 10x-f, b) 10x-fix, c) 10x-I ve d) 10x-r görüntüleri.....58
- 5.1: Statik bir bakteriyel selüloz kültürünün kesiti61

TABLolar DİZİNİ

| <u>Tablo</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 2.1 Piyasadaki Yara Bakım Ürünleri..... | 13-14 |
| 2.2 BS üreticileri..... | 18 |
| 2.3 İdeal yara örtüsü malzemeleri ile BS'nin karşılaştırılması..... | 22 |
| 2.4 PLA'nın formlarının fiziksel ve kimyasal özellikleri | 24-25 |
| 3.1 HS besin ortamı | 29 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| <u>Simgeler</u> | <u>Açıklama</u> |
|--------------------|--|
| °C | Santigrat derece (sıcaklık birimi) |
| <i>nm</i> | Nanometre (uzunluk birimi) |
| <i>mm</i> | Milimetre (uzunluk birimi) |
| <i>cm</i> | Santimetre (uzunluk birimi) |
| μm | Mikrometre (uzunluk birimi) |
| <i>g</i> | Gram (kütle birimi) |
| <i>sa</i> | saat (zaman birimi) |
| <i>dk</i> | dakika (zaman birimi) |
| <i>rpm</i> | Revolutions per minute (dakikadaki devir sayı) |
| <i>L</i> | Litre (hacim birimi) |
| <i>ml</i> | Mililitre (hacim birimi) |
| <i>Ag</i> | Gümüş (element simgesi) |
| <u>Kısaltmalar</u> | |
| 2B | İki boyutlu |
| 3B | Üç boyutlu |
| ABD | Amerika Birleşik Devletleri |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

| <u>Simgeler</u> | <u>Açıklama</u> |
|-----------------|--|
| AWC | Advanced Wound Care (Geliştirilmiş/İleri Yara Bakımı) |
| BS | Bakteriyal selüloz |
| Ch | Kitosan |
| Col | Kollajen |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco'nun modifiye minimum esansiyel besi ortamı) |
| DNA | Deokribonükleik asit |
| ECM | Ekstraselüler matriks |
| FBS | Fetal Bovine Serum (Fetal sığır serumu) |
| FTIR | Fourier Transform Infrared Spektroskopy |
| EDTA | Etilendiamin Tetraasetik Asit |
| Ege-MATAL | Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi |
| GlcNAc | N-asetilglukozamin |
| HA | Hyaluronik asit |
| HS | Hestrin & Schramm sıvı besiyeri |
| HUVEC | Human Umbilical Vein Endothelial Cells (hücre hattı) |
| MicroCT | Micro Computer Transmission |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

| <u>Simgeler</u> | <u>Açıklama</u> |
|-----------------|---|
| PEG | Polietilen glikol |
| PHEMA | Polihidroksi etil metakrilat |
| PLA | Polilaktik asit |
| PLLA | Poli(-L-laktik asit) |
| PDLA | Poli(-D-laktik asit) |
| PDLLA | Poli(-D,-L-laktik asit) |
| SEM | Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy) |
| Vac | Vaccarin Ch |

1. GİRİŞ

Vücutun en büyük organı olan deri, fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlere karşı korunmanın yanı sıra, vücuttan aşırı su kaybının önlenmesi ve termoregülasyondaki rolü gibi birçok hayati işlevi yerine getirir (Kanitakis, 2002; Goodwin et al., 2011; Marks and Miller, 2018) Deride, yanık, diyabetik ülser veya yaralanmaların sonucunda meydana gelen hasarlar bazen yaşamı tehdit eden boyutlara ulaşmaktadır. Deride oluşan ciddi hasarlarda, deri kendini yenilemeyebilir ve bu nedenle çoğu durumda deri nakli veya yapay deri ikamesi gerekir. Otolog deri nakli için önemli kısıtların olması (Vig et al., 2017) ayrıca sentetik/yarı sentetik deri ikamelerinde üretim ve bakım maliyetleri ve neovaskülarizasyonun desteklenmemesi bu alandaki bilimsel araştırmaların doğal malzemeler üzerinde yoğunlaşmasını sağlamıştır (Paul and Sharma, 2015).

Son yıllarda biyouyumluluğu, toksik ve alerjen olmaması, istenen şekil, boyut ve kalınlıkta üretilebilmesi yüksek mekanik dayanımı, yüksek su tutma kapasitesi, elastikiyeti, metabolik olarak inert olması, saflığı ve modifikasyonlara uygunluğu nedeniyle bakteriyel selüloz medikal alanda kullanılan doğal bir biyomalzemedir. Özellikle doku kültürü iskelesi, yara örtüsü, ilaç taşıyıcı sistemleri, implantlar veya yapay deri gibi medikal uygulamalarda kullanılması için araştırmalar yürütülmektedir (Lin and Dufranse, 2014; Ullah et al., 2016; Picheth et al., 2017).

Piyasada bulunan yara bakım ürünleri olan deri greftleri, yara örtüleri ve deri ikameleri geçici çözüm önerileri sunsa da tam olarak etkili iyileşmeyi sağlayamamaktadır (Vig et al., 2017). Hastadan keratinosit hücreleri alınarak yarı sentetik olarak elde edilen epidermis tabakası halen yanık tedavilerinde en etkili ve yaygın yöntem olarak kullanılsa da günümüzde deri dokusunun yerini alabilen bir biyomalzeme henüz yoktur.

Deri ikamelerinde biyouyumluluk, sitotoksisite gibi temel niteliklerin yanında istenen en önemli parametre malzemenin damarlanmaya izin verecek yapıda olmasıdır. Biyouyumluluğu, toksik ve alerjen olmaması, istenen şekil, boyut ve kalınlıkta üretilebilmesi yüksek mekanik dayanımı, yüksek su tutma

kapasitesi, elastikiyeti, metabolik olarak inert olması, saflığı ve modifikasyonlara uygunluğu nedeniyle bakteriyel selüloz, deri ikamesi olarak ideal bir malzemedir (Klemm et al., 2001; Czaja et al., 2006). Ancak damarlanma ve hücre göçüne izin verecek şekilde nanofiber yapısının ayarlanması gerekmektedir.

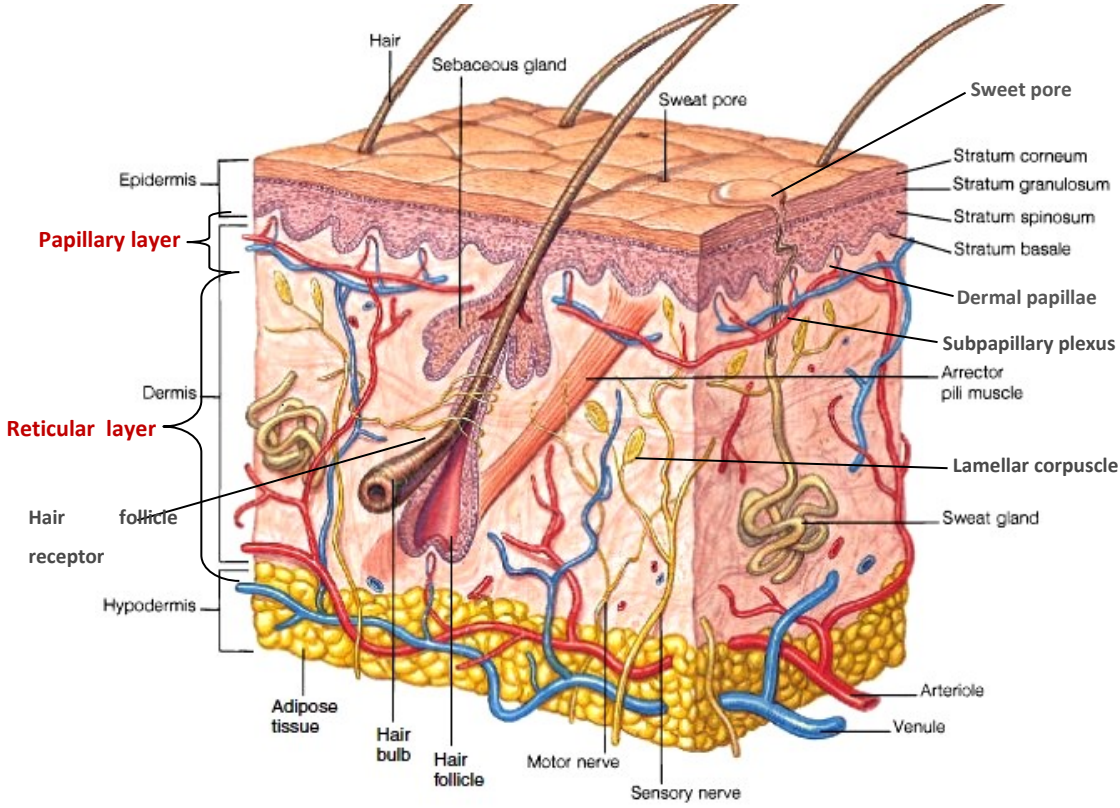
Bu tez çalışması ile daha önce tamamlanan BS/keratin nanokompozit üretimi kapsamında deri ikamesi olarak uygunluğu gösterilen bakteriyel selülozun (Keskin et al., 2017), 3-Boyutlu (3B) damar ağı yapı modelinde polilaktik asit (PLA) kalıp kullanılarak neovaskülarizasyon (damarlanma) ve hücre göçünü destekleyecek şekilde *in situ* modifiye edilmesi amaçlanmaktadır. BS üretimi sırasında ortama yerleştirilecek 3B PLA kalıbın üretim sonrası yapıyı bozmayacak şekilde uzaklaştırıldığında biyomalzemenin içerisinde 3B yapıda damar ağı kanallarının oluşması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri ve Yapısı

Deri, embriyonal yaşamda ektoderm ve mezoderm olmak üzere iki farklı germ tabakasından köken alır (Som et al., 2016; Uysal vd, 2016) ve derinin hücreleri ve diğer yapıları, gebeliğin 3-6 ayları arasında tamamen oluşur (Wiles et al., 2010). Deri, tüm vücudumuzu kaplayarak ağız, göz ile genital bölgelerin iç kısmında yerini mukozal yapıya bırakır. Ortalama 1.6-2 m² yüzey alanına sahip (yaklaşık 70 kg ağırlığa sahip) bir insanın vücut ağırlığının yaklaşık % 12-15'ini oluşturan ve yaklaşık 4-5 kg ağırlığıyla vücudun en büyük organı olan deri; fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlere (ör; mikroorganizmalar) karşı korumanın yanı sıra, aşırı su kaybının önlenmesi ve termoregülasyondaki rolü ile homeostaziye sağlayarak birçok hayati işlevi yerine getirir (Kanitakis, 2002; Goodwin et al., 2011; Som et al., 2016; Vig et al, 2017; Marks and Miller, 2018). Ayrıca deri suya karşı dayanıklı bir bariyer görevi görür, derinin en dışındaki tabakada bulunan hücreler için gerekli olan oksijeni emer, algılanma duyusunu sağlar, güneş kaynaklı ultraviyole (UV) radyasyonunun zararlı etkilerine karşı DNA'nın zarar görmesini engeller ve D vitamini sentezinde önemli bir rol oynar (Meer, 2010; Paul and Sharma, 2015; Marks and Miller 2018). Yukarıda derinin, bazı önemli özelliklerine değinilmiştir. Ancak deri, sayısız ve çeşitli spesifik işlevlere sahiptir (Montagna and Pharakhal, 1974).

Derinin ortalama kalınlığı 2-3 mm olmakla birlikte vücudun anatomik bölgelerine göre değişkenlik göstermektedir. Kıl folikülün bulunmadığı ellerin avuç içi ile ayak taban derileri 0.8-1.5 mm ile vücuttaki en kalın epidermis tabakasına sahipken, epidermisin en ince olduğu alan yaklaşık olarak 0.05 mm ile göz kapaklarımızdır. Dermisin kalınlığına dayanan en kalın deri ise 3 mm ile sırt bölgesinde yer alırken, göz kapaklarında ise 0.3 mm'ye kadar incelmektedir (Gawkrödger, 2002; Meer, 2010). Derinin kalınlığı cinsiyete, yaşa, genetik yapıya, iklim koşullarına ve havadaki sürtünmeye göre değişkenlik göstermektedir (Terfera and Jegtvig, 2012).



Şekil 2.1: Derinin yapısının şematik gösterimi (Stowall G., 2013)

2.1.1. Derinin katmanları

Kasları, kemikleri, bağları ve iç organları koruyan çok sayıda katmana sahip olan deri, esas olarak epidermis, dermis ve deri altı dokusunu oluşturan hipodermis (subkutis/yüzeysel faysa) olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır (Bkz. Şekil 2.1) (Kanitakis, 2002; Meer, 2010; Wiles et al., 2010; Terfera and Jegtvig, 2012).

2.1.1.1. Epidermis: En üst katmanda bulunan bağ dokudan oluşmayan ve damar yapısını içermeyen, kalınlığı 0.05-1 mm arasında değişen epidermis, beş ana tabakadan oluşmakta ve derinin en ince kısmını oluşturduğu için “ince deri” olarak da nitelendirilmektedir (Meer, S., 2010; Wiles et al., 2010; Terfera and Jegtvig, 2012; GovindShukla et al., 2018). Epidermis, stratum bazal tabakasında bulunan keratinositlerin yüzeysel proteinleri ve glikoproteinler ağı ile dermis tabakasına bağlanır. Dermal-epidermal sıkı bağlantı elemanlarından dolayı hiçbir damar epidermis tabakasına geçemediğinden dolayı epidermis kan damarları içermez. Bu katmandaki hücrelerin beslenmesi ve atıklarının uzaklaştırılması,

dermisen üst katmanlarında bulunan kılcal kan damarları aracılığıyla difüzyonla gerçekleşmektedir (McGrath et al., 2004; Meer, 2010; Marks and Miller, 2018).

Derinin en dış tabakası ve ana fiziksel bariyeri olan *stratum korneum* tabakası (keratinize ya da horny tabaka), organellerinin çoğunu kaybetmiş ve hücre içi dayanıklılığı arttırarak epidermise sertlik özelliğini kazandıran keratin proteininin üretiminden sorumlu olan keratinosit adı verilen 25-30 kat ölü ve olgun deri hücrelerinden oluşur (McGrath et al., 2004; Wiles et al., 2010; GovindShukla et al., 2018; Marks and Miller, 2018). Epidermis tabakasının % 95'lik kısmını oluşturan bu hücreler, derinin üst yüzeyinden sürekli olarak dökülerek yerini epidermisen alt katmanlarından gelen yeni hücreler alır. Normal bir insanda 28-30 günden oluşan bu sürece keratinizasyon döngüsü (turnover) denilmektedir (Meer, 2010; Wiles et al., 2010; Terfera and Jegtvig, 2012; GovindShukla et al., 2018)

Ölü ve yassılaştırmış hücrelerden oluşan *stratum lucidum* (hyalin tabaka) tabakası, el ayası ve ayak tabanı gibi kalın derilerde bulunur ve stratum korneum ile stratum granulozum tabakaları arasındaki sürtünmeyi azaltmaya yardımcı olur ve deriyi, suya karşı bir bariyer olarak korur (Montagna and Pharakhal, 1974; Meer, 2010; Wiles et al., 2010; Terfera and Jegtvig, 2012; Som et al., 2016).

Stratum granulosum tabakası (granüler tabaka)'nda bulunan hücreler, keratin proteinini oluşturmanın yanı sıra; derinin su geçirmesini ve derideki suyun buharlaşmasını önleyen malzemeler de üretir (Chu, 2008; Terfera and Jegtvig, 2012; Marks and Miller, 2018).

Stratum spinosum (malpighian veya prickle tabaka), keratinizasyon sürecinin başladığı yer olup çoklu katmanlar halinde düzenlenmiş olan bir kübik hücrelerden oluşur (Wiles et al., 2010; Marks and Miller, 2018). Ayrıca, alerji ve ekzamaların gelişiminden sorumlu ve kemik iliği kökenli immün sistem hücrelerinden biri olan Langerhans hücreleri de bulunmaktadır (McGrath et al., 2004; Marks and Miller, 2018).

Stratum germinativum tabakası (bazal tabaka), epidermis katmanının en alt ve kalın tabakası olan bu tabakada farklılaşmamış hücreler (boyutları 10–14 nm), tek sıra halinde silindirik olup mitotik faaliyet göstermektedir (McGrath et al., 2004; Goodwin, 2011; Yousef and Sharma, 2017; Marks and Miller, 2018).

Ayrıca bu katman, derinin renk pigmentini oluşturan dendritik hücreler olan melanosit ve derinin dokunma hissini dermisin papillar bölgesinde bulunan sinir uçlarına taşıyan merkel hücrelerini de içerir. (Montagna and Pharakhal, 1974; Meer, 2010; Terfera and Jegtvig, 2012).

2.1.1.2. Dermis: Deriye destek ve kuvvet veren kollajen filamentleri, elastik lifler ve ekstrasfibriller matris elemanları (ECM) gibi temel yapısal bileşenleri içeren amorf bir bağ dokusundan oluşan dermis, vücudu stres ve dış tepkilerden koruyan ve deriyi besleyen vasküler bir yapı içeren deri katmanıdır. Dermis, ekstrasellüler matriks elemanlarını, kan ve lenfatik damarlarını, sinir ağlarını (ağrı, kaşıntı, basınç ve sıcaklık gibi çeşitli uyarıyı ileten serbest sinir uçları, pacinian, meissner's ve ruffini's cisimcikleri) ve epidermik olarak türetilmiş eklerini (kıl folikülleri, tırnak, yağ ve ter bezleri), fibroblast, makrofaj, histiyosit ve mast hücrelerini içermektedir. Dermiste, ayrıca bir düz kas çeşidi olan "arrector pilli kası" da bulunmaktadır (Şekil 2.1) (Wiles et al., 2010; Goodwin, 2011; Terfera and Jegtvig, 2012; GovindShukla et al., 2018; Marks and Miller, 2018).

Dermiste hücreler az, hücreler arası destek dokusu daha fazladır. Dermis, olağanüstü su tutma kapasitesine sahip polisakkaritlerin ve protein makromoleküllerin üretilmesi için bağlandığı destekleyici bir matris ve temel besleyici görevi görmektedir (Meer, 2010). Dermisin yapısında bulunan kollajen, elastin ve keratin gibi proteinler, dermis tabakasına fiziksel dayanım ve esneklik sağlamanın yanı sıra; hücrelerin birbirlerine tutunmasını, hücrelerin yer değiştirmesini ve hücreler arası ilişkiyi düzenlemektedir (Gawkrödger, 2002; James et al., 2006; Meer, 2010; Marks and Miller, 2018).

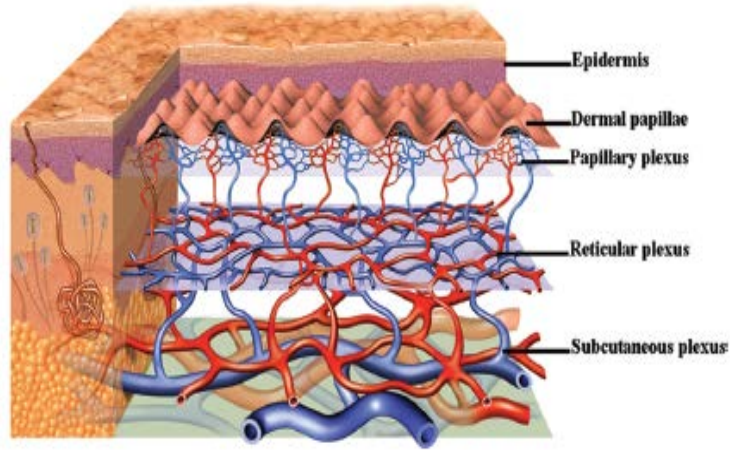
Dermis, fiziksel ve fonksiyonel olarak farklı, ancak belirgin bir sınırı olmayan iki yapısal katman olan papiller bölge ve retiküler bölgeden oluşmaktadır (Yousef and Sharma, 2017; GovindShukla et al., 2018).

Papiller bölge: Gevşek bağlı bağ dokusu olan "parmak izleri" olarak da bilinen papilla, epidermise doğru uzanan ve kılcak kan damarlarının uç ağlarını, sinir liflerini ve fibroblastları içermektedir. Papiller katman, üzerindeki epidermisin bazal katmanında bulunan keratinosit hücreleri için besin maddeleri sağlamaktadır (Gawkrödger, 2002; GovindShukla et al., 2018).

Retiküler bölge: Yoğun, düzensiz bağ dokusundan oluşan ve dermisin alt kısmını oluşturan ve hypodermise geçiş alanı olan bu bölge, daha yoğun ve kalın bir lif ağı (kollajen, elastik ve retiküler elyaf)'na sahipken daha az sinir lifleri ve kılcal kan damarını içermektedir (Yousef and Sharma, 2017; GovindShukla et al., 2018;).

Dermal Damar Yapıları ve Kutanöz Mikrosirkülasyon

Kutanöz mikrosirkülasyon (derideki kan dolaşımı), derinin yüzeyinden 1-1,5 mm altında bulunan *subpapillary plexus (superficial plexus)* ile dermis-subkutis arayüzeyinde bulunan *retiküller plexus (lower plexus)* olmak üzere iki önemli horizontal ağ yapısı ile organize edilmektedir (Şekil 2.2). Dermisteki bu damarlanma yapıları birbiriyle bağlantılıdır. Dermal papilla, kılcal damarlar, son arteriyoller ve yüzeysel pleksusun venülleri tarafından beslenir. Dermisin retiküller bölgesinin pleksuslar ise daha büyük kan damarlarından oluşur ve derinin ek yapılarını çevreleyerek daha karmaşık bir yapıya sahiptir (Braverman, 2000; Goodwin et al., 2011; Schachner and Hansen, 2011; Marks and Miller, 2018).



Şekil 2.2: Dermal damarların şematik gösterimi (Som et al., 2016).

Vasküler yapıları oluşturan arter, venler ve kılcalların ana hücreleri endotel hücreleridir. Yaklaşık 1-2 μm kalınlığa ve 10-20 μm çapa sahip olan endotel hücreleri, düz şekilli hücreler olup merkezi uzatılmış çekirdekleri vardır (Griendling and Alexander, 1996; Fadini and Avogaro, 2010).

Vücutun ısı düzenleyici kapasitesinin bir bölümünü oluştururken ayrıca hücreler için gerekli olan besin kaynağını ve oksijeni sağlar ve hücresel atık ürünlerin ve karbondioksitin uzaklaştırılmasına yardımcı olur (Meer, 2010; Marks and Miller, 2018). Bunların yanı sıra kan basıncını düzenlemeye ve yara iyileşmesine yardımcı olurken, birçok immunolojik olayda da görev alır (Schachner and Hansen, 2011). Ayrıca derinin epidermis katmanında spesifik damar ağları bulunmadığı için derinin üst katmanındaki hücrelerin besin kaynağı ve oksijeni papiller dermisteki damarlardan difüzyonla sağlanmaktadır. Dermisteki kan damarları, bağ dokusunun ve deri ek yapıların oluşmasına da yardımcı olmaktadır (Marks and Miller, 2018).

2.1.1.3. Hipodermis (Subkutis / Subkutan Doku): Deri altı gevşek bağ dokusu olarak adlandırılan hipodermis (subkutis), fibroblast, makrofaj ve adiposit gibi hücreler ile elastin içeren ve deriyi vücuda bağlayan derinin en kalın tabakasıdır (Paul and Sharma, 2015). Vücutun ihtiyaç duyduğu enerjiyi üretir, vücutun iç organlarını dış travmalara karşı korumada tampon (hava yastığı gibi) ile bazı hormonlar için depo görevi görür ve vücudumuzu soğuktan izole etmeye yardımcı olur (Farooqi and O'rahilly, 2008; Wiles et al., 2010; Terfera and Jegtvig 2012; Marks and Miller, 2018).

Bu tabaka, kollajen içeren yağ hücrelerini, yağ hücrelerini içeren gevşek keratinositleri, lenf ve sinir damarlarını ve deriyi besleyip hücrelerin oluşturduğu atık ürünleri uzaklaştıran arter ve venleri içermektedir (Som et al., 2016).

2.1.2. Deri hasarları

Deri hasarı (yara); ısı, soğuk, elektrik, radyasyon veya kimyasal ajanlara maruz kalarak deri ve/veya derialtı dokuların devamlılığının bozulması, tahrip olması veya kesintiye uğraması olarak tanımlanabilir (Altıntaş, 2001; Diler vd., 2012;). Vücutun homeostazını korumak için derinin bütünlüğü hayati önem taşımaktadır. Deri yarıkları veya yanıkları, ülserler, kemik kırılmaları, cerrahi bir prosedürün neden olduğu kas yırtıkları, travma (kontüzyon) veya herhangi bir bulaşıcı hastalık, deri bütünlüğüne hasar vererek büyük sakatlıklara yol açabilir veya yaşam kalitesini önemli ölçüde bozabilir (Somboonwong et al., 2012; Paul and Sharma, 2015; Kiya and Kubo, 2019).

2.1.3. Yara iyileşmesi ve yara iyileşmesinin biyokimyasal süreci

Dokuda oluşan hasarın, doku kaybının veya doku bütünlüğünün bozulmasının onarılması, organizmanın en önemli işlevlerinden birisidir. Bu onarıcı işlemin amacı, hasarlı organın fonksiyonunun ve doku bütünlüğünün sağlanmasıdır (Yüceyar, 2008). Yara iyileşmesi, doku bütünlüğünü ve homeostaziye yeniden sağlamak için birçok hücre tipinin ve hücre dışı matrisinde (ECM) bulunan bir dizi elemanın, belli bir sürede organize bir şekilde etkileşime girmesiyle meydana gelen bir dizi dinamik biyokimyasal ve sitolojik olaylar sürecidir (Singer and Clark, 1999; Altıntaş, 2001; Gurtner et al., 2008).

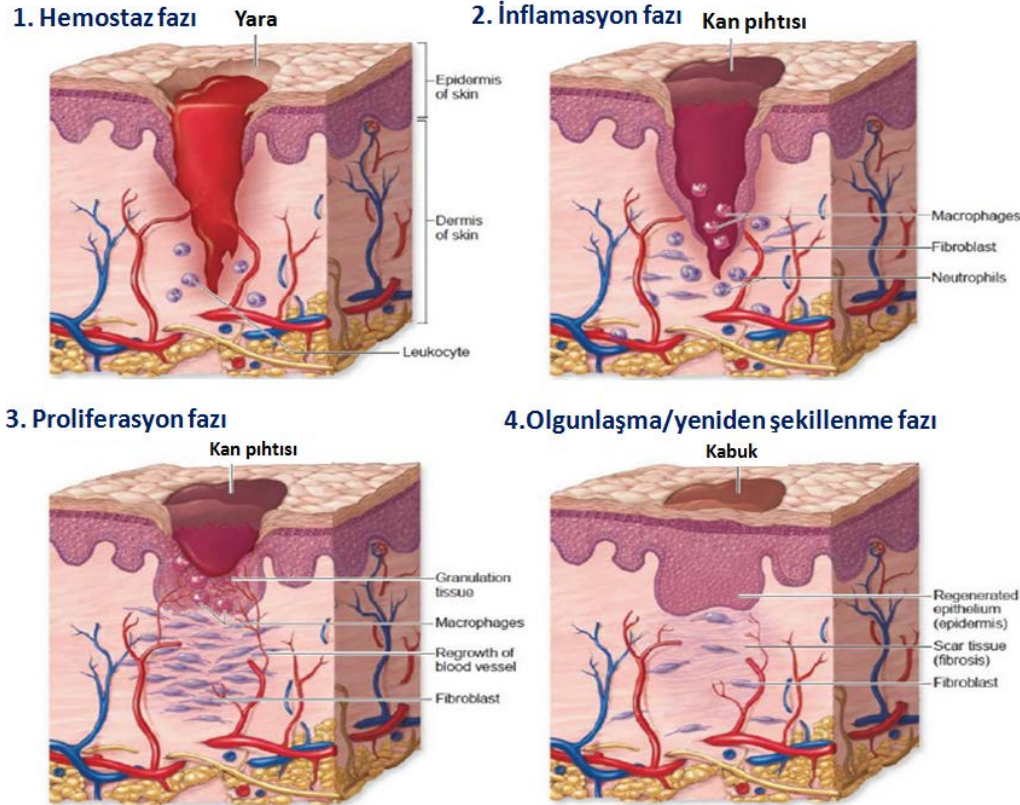
İyileşmenin ana ögesi hücre üremesidir. Üreyen hücreler ihtiyaç olan yerlere göç eder. Doku bütünlüğü ve devamlılığını sağlayan kollajenin sentezi, yara iyileşmesinin tüm aşamalarında kilit rol oynar. Sentezlenen kollajen lifleri, çapraz bağlarla bağlanır (Altıntaş, 2001).

Bazı evrelere ayrılarak anlaşılması sağlanabilen yara iyileşmesi, birbirini izleyen basamaklardan çok bir devamlılık içinde tamamlanan mekanizmalardır. Birbirini takip eden bu mekanizmalar; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve maturasyon veya remodelling olmak üzere 4 ana aşamadan (faz) meydana gelmektedir (Şekil 2.3) (Singer and Clark, 1999; Li et al, 2007; Kiya and Kubo, 2019).

2.1.3.1. Hemostaz fazı (Vasküler yanıt/Eksudasyon fazı): Doku hasarından birkaç saniye sonra kan, yara alanına girmesiyle fibrinojen, fibrin haline geçerek yaranın üzerini örtmek için pıhtılaşmayı sağlar (Altıntaş, 2001; Paul and Sharma, 2015; Bunman et al., 2017).

2.1.3.2. İnflamasyon fazı (Substrat/Hazırlık fazı): İnflamasyon; organizmayı kan kaybına karşı korumak, yabancı maddelerin vücuda girmesini önlemek ve yarayı iyileşmeye hazır hale getirmek üzere gelişen bir dizi reaksiyondur (Hanna and Giacopelli, 1997). Hemostaz sağlandıktan sonra, kan damarları, beyaz kan hücreleri, büyüme faktörleri, enzimler, besinler ve antikorlar gibi esansiyel hücrelerin yaralı bölgeye ulaşmasına ve böylece eksüda seviyelerinin yükselmesine neden olarak yara bölgesinde lokalize ödem, ağrı, kızarıklık, ısı artışı olmaktadır. Bu fazda inflamatuvar hücreler yara bölgesine göç

etmekte, apoptotik hücreleri ve bakterileri yok etmeye çalışmaktadır. İnflamasyonun başlarında nötrofiller görev alırken daha sonra yerini makrofajlar ve T lenfositlere bırakmaktadır. Bu faz 3-5 gün içinde sona ermektedir (Paul and Sharma, 2015; Bunman et al., 2017).

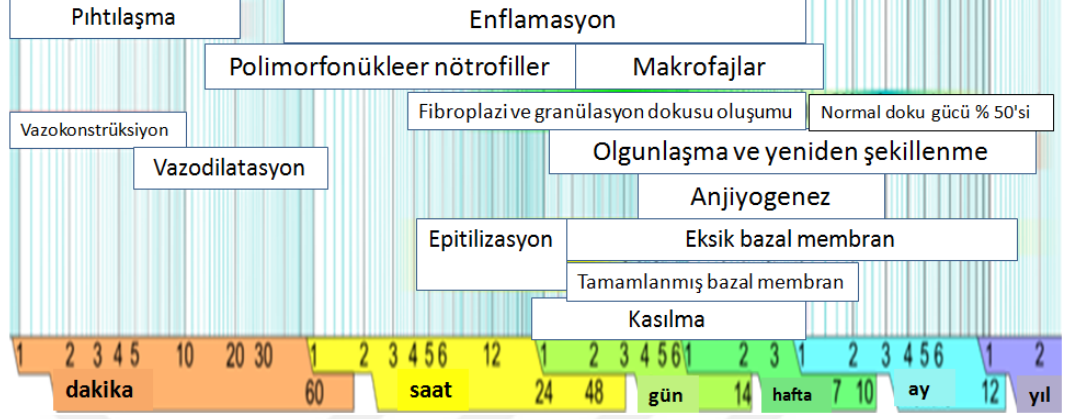


Şekil 2.3: Yara iyileşme fazlarının bir şematik gösterimi (Bunman et al., 2017).

2.1.3.3. Proliferasyon (Çoğalma – kollajen yapım) fazı: Yara iyileşmesinin onarım fazı olan proliferatif fazda anjiyogenez ile yeni damarların oluşumunu indüklenir. Yaranın neovaskülatürünü çevreleyen fibroblast hücreleri kollajen, elastin, fibronektin, glikozaminoglikanlar, proteoglikanları, hyaluronik asit (HA) ve proteazları üreterek yara iyileşmesinde önemli rol oynarlar. Yeniden epitelizasyon, periferik hücrelerin bölünmesi ile ince bir epitel hücre tabakası oluşturur ve bu süreç 48-72 saatte tamamlanır. Bu aşamada sürecin hızlanması için nemli bir ortam çok önemlidir. Proliferasyon fazı yaklaşık olarak 3 haftaya kadar sürebilmektedir (Altındaş, 2001; Paul and Sharma, 2015).

2.1.3.4. Olgunlaşma ve yeniden şekillenme fazı: Yara iyileşmesinin son aşaması olan bu faz, 3. haftadan itibaren başlar ve yaklaşık 6 ay kadar sürer; ancak

bazı durumlarda 2 yıla kadar devam edebilir (Şekil 2.4). Proliferasyon aşaması sırasında oluşan kollajen liflerinin yeniden biçimlendirilmesi sürecini kapsar (Paul and Sharma, 2015; Bunman et al., 2017).



Şekil 2.4: Normal yara iyileşmesinin aşamalarının bir zaman çizelgesi (Häggröm, 2014).

2.1.4. Yara bakım ürünleri

Yara bakımının amacı; canlı dokuları korumak, travmaya uğrayan bölgede daha fazla doku yıkımını ve enfeksiyon gelişimini önlemek, iyileşmeyi hızlandırmak, yaralanmış bölgenin fonksiyonlarını arttırarak deri bütünlüğünü ve diğer organ ile sistemlerde oluşabilecek komplikasyonları önlemektir. Enfeksiyon, doku kuruluğu, dokunun korumasız kalması, ısı kaybı, eritrosit, lökosit, protein gibi maddelerin kaybı ve lökositlerin derine göçü yaraların iyileşmesini bozan olumsuz faktörlerdir. Yara tedavisini doğru bir şekilde yapabilmesi için yara fizyopatolojisinin çok iyi anlaşılması gerekir (Akyüz, 2008; Bunman et al., 2017).

Yara bakımı; yaranın türü, genişliği ve özelliğine göre değişir. Primer iyileşen yaralarda insizyonun kuru steril bir pansumanla kapatılması ya da krem ve nemlendiricilerin kullanılması yeterli iken; daha derin yanıklarda cerrahi müdahaleler ve deri grefti nakli gerekebilir (Patel et al., 2008; Hussain, 2013; Paul and Sharma, 2015). Deri greftleri, yara örtüleri ve deri ikamelerinin kullanılması yara tedavisinde başvurulan alternatif yöntemlerdir.

2.1.4.1. Deri greftleri

Otogreft (kişinin kendisinden alınan), *izogreft* (ikizler arası), *allogreft* (aynı cins, fakat farklı kişiler arası) ve *xenogreft* (farklı cinsler arası), *flep* (vaskülarize

greft) olmak üzere farklı türden deri greftleri çeşitleri bulunmaktadır. Modern plastik cerrahinin temelini oluştururlar (Vig et al., 2017). Otolog dokuların naklinde donör bölge kısıtlıdır. Otolog olmayanlar ise doku eksikliği durumlarında kullanılabilir; ancak immunolojik reaksiyon nedeniyle vücut tarafından reddedilmektedir ve canlılıklarını sürdürebilmeleri için uzun süreli immünosupresyon gerekmektedir (Aydın, 2019).

2.1.4.2. Yara örtüleri

İdeal bir yara örtüsünün, sahip olması gereken bazı faktörler vardır ve bunların hepsini bir arada karşılanması oldukça zordur. Nemli bir ortam, ısı yalıtımı ve etkili bir şekilde oksijen sirkülasyonu sağlamalıdır. Islak veya nemli tedavi ortamı, kuru iyileşme ortamına kıyasla daha az yara izi oluşumu sağlayarak yara iyileşmesi için daha umut vericidir (Junker et al., 2013). Sıvı drenajını ve epitelyal göçünü sağlamalı, yara eksüdalarının emilime yardım etmeli ve bakteri enfeksiyonlarına karşı yarayı korumalıdır. Uygulanması ve çıkarması kolay ve ağrısız olmalıdır. Alerjik reaksiyonlara neden olmadan biyolojik olarak uyumlu olmalıdır (Watson and Hodgkin, 2005; Fonder et al., 2008). Ayrıca, yara muayenesinde yüksek elastikiyet, mekanik dayanım ve şeffaflık göstermelidir (Chawla et al., 2009). Enfeksiyon hastalıkları ve antibiyotik direncinin artmasıyla birlikte birçok çalışma, etkili yüzey dezenfeksiyonu için antimikrobiyal ve diğer biyoaktif özellikler taşıyan antimikrobiyal yara örtüsüne ilave edilen alternatif materyallerin geliştirilmesi üzerine odaklanmıştır (Alanis, 2005).

2.1.4.3. Deri ikameleri

Deri ikameleri yaraları kapatarak daha hızlı iyileşmeyi teşvik eder ve cerrahi deri greftlerini yerini alabilir. Ayrıca ağrıyı da ortadan kaldırmaya yardımcı olabilirler. Hücre içeren ve içermeyen çeşitleri bulunmaktadır (Paul and Sharma, 2015). İdeal deri ikameleri biyoyumlu olmalı, toksik olmamalı, immünojenik olmamalı, inert olmalı, mekanik olarak dayanıklı olmalı, rezorbsiyona ve deformasyona karşı dayanıklı olmalı, antimikrobiyal aktivite göstermeli ve ısıl direnç göstermelidir (Augustine et al., 2014). Biyomalzemeler, deri ikameleri için kullanıldığında, bu özelliklere ilave olarak, biyobozunur olması gerekmektedir. Biyomalzemelerin kolay kullanılabilirliği, uzun raf ömrüne sahip ve biyoyumlu

olması, deri ikameleri için ideal bir mühendislik alternatifidir (Vig et al., 2017). Günümüzde deri doku mühendisliği ve biyomühendislik teknikleri kullanılarak yapay deri ikameleri üretimi üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmektedir (Paul and Sharma, 2015; Vig et al., 2017).

Yapay deri ikamesi, dermal ve epidermal kısımlardan oluşan bir bilaminar membrandır. Dermal kısım, normal dermis modeline çok benzeyen 3B gözenekli lifli bir matris iken; ince bir elastik örtü ise geçici bir epiderm tabaka olarak işlev görür. Eksize edilmiş bir yaraya aşılandığı zaman, hastanın kendi fibroblastları yapay deri ikamesine göç eder. Yapay lifleri bir iskele olarak kullanarak, göç eden otolog fibroblastlar, yapay lifleri yavaşça biyolojik olarak parçalarken, normal dermisen kollajen lif düzeninde yeni bağ dokusunu sentezler (Paul and Sharma, 2015).

Deri doku mühendisliği, işlevini kaybeden insan dokularının rejeneratif tıp ile işlevlerini yeniden kazandıran, sürdüren, geliştiren ve klinik olarak başarıyla uygulanabilen deri ikamelerini yaratmayı amaçlayan ve özellikle rejeneratif tıp alanında çok hızlı gelişmekte olan bir araştırma alanıdır. Deri doku mühendisliği ile 3B gözenekli iskelelere hücre eklenmesi, proliferasyonu ve doku oluşumu spesifik uygulamalar için tasarlanabilir (Atiyeh et al., 2005; Paul and Sharma, 2015). Ciddi boyuttaki deri hasarının onarımı için başka bir alternatif yöntem ise biyomühendislik ürünü deri ikamelerinin kullanılmasıdır. Biyomühendislik deri ikameleri otolog, allojenik, ksenografik, sentetik veya bu malzemelerin bileşiminden türetilir (Paul and Sharma, 2015). Tablo 2.1’de piyasada bulunan yara bakım ürünlerine detaylı bir şekilde değinilmiştir.

Tablo 2.1: Piyasadaki yara bakım ürünleri (Han and Ceilley, 2017)

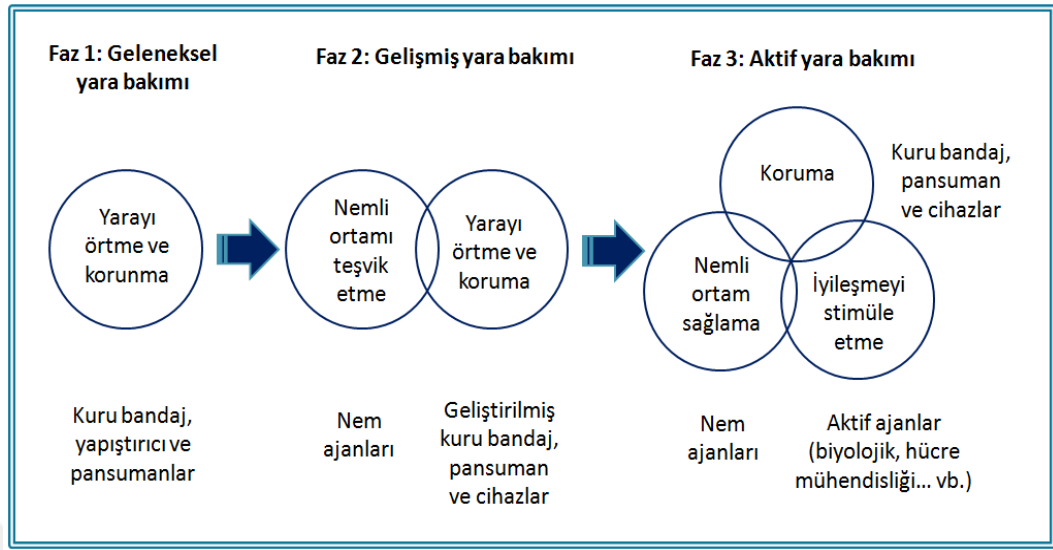
| Yara Bakım Ürünleri | Ticari Ürünler | Açıklama |
|---------------------|---|--|
| Gazlı Bez | Curity, Vaseline Gauze, Xeroform | Ucuz Kurumaya neden olma Değişim sırasında daha fazla yaralanmalara neden olabilir |
| Filmler | Bioclusive, Blisterfilm, Cutifilm, Flexigrid, OpSite, | Tıkayıcı Nemi tutar |

| | | |
|----------------------------------|--|--|
| | Tegaderm | Sadece eksüdatif olmayan yaralar için uygun |
| Hidrokolloidler | Aquacel, Comfeel, DuoDERM, Granuflex, Tegaserb | Değişirme arasındaki sürelerin uzun olması Sıvı tutucu Tıkayıcı Enfekte yaralar için uygun değil |
| Hidrojel | Carrasyn, Curagel, Nu-Gel, Purilon, Restore, SAF-gel, XCell | Kuru yaraları rehidrate eder Kolay çıkarma / değişirme Aşırı hidrasyona neden olabilir |
| Köpükler | 3M Adhesive Foam, Allevyn, Lyofoam, Tielle | Orta derecede emici Yalıtım (izolasyon) sağlar |
| Aljinatlar | Algisite, Kaltostat, Sorbsan, Tegagen | Yüksek emici Hemostatik |
| Hidrofiberler | Aquacel Hydrofiber | Yüksek emici |
| Doku mühendisliği deri ikameleri | Alloderm, Apligraf, Biobrane, Bioseed, Dermagraft, Epicel, EZ Derm, Hyalograft, Integra Omnigraf, Laserskin, Myskin, TransCyte | Yetersiz gelen büyüme faktörlerini ve sitokinleri hedef alma Pahalı Enfeksiyon riski Antijen özelliğine sahip |

2.1.5. Dünya piyasasındaki yara bakım ürünlerinin durumu

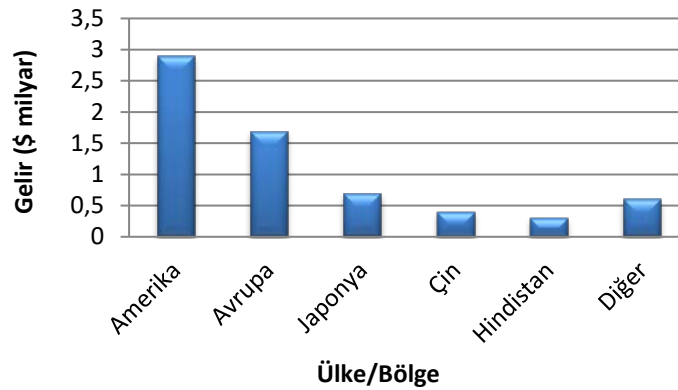
Deride oluşan yanık vakaları, dünya çapında yılda yaklaşık olarak 300.000 kişinin ölümüne neden olmaktadır (Bunman et al., 2015). Nemli yara bakımı ürünleri, deri ikameleri ve yara bakım cihazları yara bakım ürünleri piyasasının üç ana gelir kaynağıdır. Hidrokolloidler, köpük pansumanlar, aljinat pansumanlar ve hidrojel pansumanlar nemli yara iyileştirme pazarında lider sektörlerdir. Yapay deri replasman tedavileri, kollajen bazlı iskeleler, hücre tedavileri ve diğer biyolojik tedaviler, biyolojik ürün pazarının ana sektörlerdir. Jackson ve Stevens 2006'daki yayına göre, yara bakım ürünleri pazar analizinde Şekil 2.5'te gösterilen

aktif yara bakımı ürünleri, örtüşen üç aşamadan geliştiği öne sürülmüştür (Paul and Sharma, 2015).



Şekil 2.5: Yara bakım ürününü pazarının geleneksel yara bakımından aktif yara bakımına kadar evrimi (Paul and Sharma, 2015; Öhnstedt et al., 2019)

Visiongain 2011 yılının tahminlerine göre, dünyanın en büyük “Geliştirilmiş Yara Bakım (Advanced Wound Care - AWC)” pazarı küresel pazarın 2,9 milyar dolarlık satışla, % 45’ini temsil eden ABD olurken; 1,7 milyar dolarlık satışla, % 25,4’ünü temsil eden Avrupa ikinci en büyük AWC pazarı oldu. ABD, Avrupa ve Japonya, AWC piyasasına hakim olmakla birlikte bu pazarının % 80,6’sını temsil ederken; gelişmekte olan piyasaları ile Çin ve Hindistan’ın bu üç ülkeye karşı güçlü rakip olması beklenmektedir (Şekil 2.6). AWC pazarındaki artış esas olarak yaşlanan nüfus, diyabetik ve obez popülasyonun artması, gelişen ekonomi ve daha iyi sağlık tesisleri gibi etkenler belirlemektedir (Visiongain 2012).



Şekil 2.6: Gelişmiş yara bakım piyasası: Lider ulusal pazarlarda geliri gösteren bir grafik (milyar \$), 2011 (Visiongain 2012)

2.1.6. Deri ikamelerin kullanım kısıtları ve gelecek perspektifi

Ticari olarak temin edilebilen deri ikamelerinin neovaskülarizasyonu sağlama yetersizliği ve zayıf mekanik bütünlüğü, entegrasyon başarısızlığı ve bağışıklık reddi gibi bazı kısıtlamaları vardır. Piyasada bulunan çok az deri ikamesi neovaskülarizasyona imkan sağlamaktadır. Mevcut deri ikameleri, sadece fibroblast ve keratinosit hücrelerini esas aldığı için kıl folikülü ve ter bezleri gibi farklılaşmış yapıları oluşturma kabiliyetinden yoksundur. Deri ikameleri hücre büyümesi sorunlarının üstesinden gelmek için hücre ve doku kültürü protokollerinde teknik ilerlemeler gerekmektedir. Ayrıca klinik uygulamalarda deri ikamelerinin büyük talebini karşılamak için büyük ölçekli üretimi geliştirmek gerekir. Mevcut yara bakım ürünlerinin yüksek maliyeti ve bunların kullanılması için özel uzmanlık gerektirmesi, birçok ülkede ticari satışını kısıtlamaktadır (Paul and Sharma, 2015; Vig et al., 2017).

Yara iyileşmesi üzerine yapılan yeni araştırmalar, malzeme biliminden moleküler biyolojiye kadar farklı alanları kapsamaktadır. Bu çalışmalardan bazıları, nitrik oksit gibi yara iyileşmesinde görev alan yeni moleküller üzerine yoğunlaşmaktadır ve bu amaçla yenilikçi malzemelerin tasarımını içeren sayısız yaklaşım bulunmaktadır (Han and Ceilley, 2017).

Doku mühendisliği ürünü deri ikameleri gelecekte doku yenilenmesi ve yara iyileştirici terapötikler için umut vaat etmektedir. Deri ikamelerinin raf ömrünü uzatmak ve konak dokularla daha iyi entegrasyonunu sağlamak için vaskülarizasyonu sağlayacak şekilde geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Vaskülarizasyonu artırmanın bir yolu, olgun kan damarlarını geliştirmek ve gerekli mekanik stimülasyonu sağlamak için biyoreaktörleri kullanmayı gerektirmektedir. Deri ikamelerinin raf ömrünü uzatmak için depolama ve muhafaza standardizasyonu ile üretim sürecini standart hale getirmek ve üretim maliyetlerini azaltmak üzerinde durulması gereken başka bir çalışma konusudur (Vig et al., 2017).

Biyomühendislik ürünü deri ikamelerinin terapötik etki mekanizmasının detaylı olarak anlaşılmasıyla daha iyi ve verimli ürünler geliştirilebilir. Günümüzde, bu özellikleri taşıyan mevcut olan birkaç deri ikamesi vardır; ancak

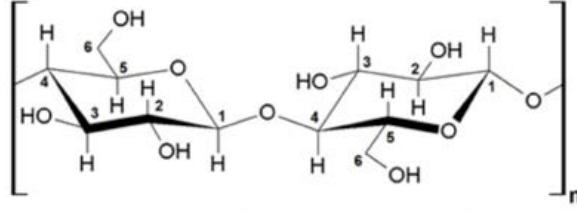
kök hücre ve biyomalzemelerin bir kombinasyonunun ürünü olan deri ikameleri gelecek için umut verici bir çözüm olmaya devam etmektedir (Vig et al., 2017).

2.2. Bakteriyel Selüloz

Son yıllarda biyoyumlu malzemeler ya da cihazlar olarak kullanılabilen kollajen, hiyalüronan, jelatin, kitosan ve selüloz gibi doğal biyopolimerler, medikal alanındaki yoğun araştırmaların ana odağı olmuştur (Silva et al., 2010). Biyomalzemelerin özellikleri, doğal dokuların özelliklerine benzerlik göstermesi, doğal dokuya özgü karmaşık ve hiyerarşik yapıları taklit eden yeni sistemler veya tıbbi cihazlar olarak kullanılan yara örtüleri, tıbbi implantlar, ilaç dağıtım sistemleri, vasküler greftler ve doku mühendisliği için iskele üretimi üzerine araştırmalar sürdürülmektedir (Reis et al., 2008; Rajwade et al., 2015).

Yeryüzünde en çok üretilen doğal polimer olan bitki selülozu (1,5 x 10¹² ton/yıl) tekstilden gıdaya kadar birçok alanda yaygın olarak kullanılabilmesine rağmen, hemiselüloz, lignin ve pektin maddelerini içerdiğinden dolayı tıbbi veya kozmetik amaçlı kullanılamamaktadır (Bilgi et al., 2016). Ancak bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyel selüloz (BS) veya mikrobiyal selüloz, biyoyumluluğu, nanofiber ağ yapısı, iyi mekanik (yüksek elastikiyet, esneklik ve dayanıklılık) özellikleri, yüksek su emme kapasitesi, nispeten daha kolay üretim süreci, bitki selülozu ile karşılaştırıldığında kimyasal saf yapı, metabolik olarak inert ve modifikasyonlara eğimli olması gibi benzersiz özelliklere sahiptir (Iguchi et al., 2000, Klemm et al., 2001).

Selüloz, glikopiranoz birimlerinin β -1,4 bağları ile bağlanması ile oluşan dallanmamış bir polimerdir (Şekil 2.7). BS üzerinde yapılan yoğun çalışmalar, BS'nin kimyasal açıdan bitkisel selülozla aynı olduğunu, ancak makromoleküler yapısı ve özellikleri bakımından farklılık taşıdığını göstermiştir (Vandamme et al., 1998). Tek bir selüloz şeridi, ortalama 1,6x5,8 nm boyutunda yaklaşık 46 mikro iplikçikten oluşmaktadır. Uzunluğu 1–9 μ m arasında değişen mikrobiyal selülozun ultra ince şeritleri hidrojen bağları ile sağlamlaştırılmış bir ağ yapısı oluşturmak üzere 2.000-18.000 glikoz birimi bir araya gelir (Ross et al. 1991).



Şekil 2.7: Selülozun moleküler yapısı (n = polimerizasyon derecesi) (Perotti et al., 2014).

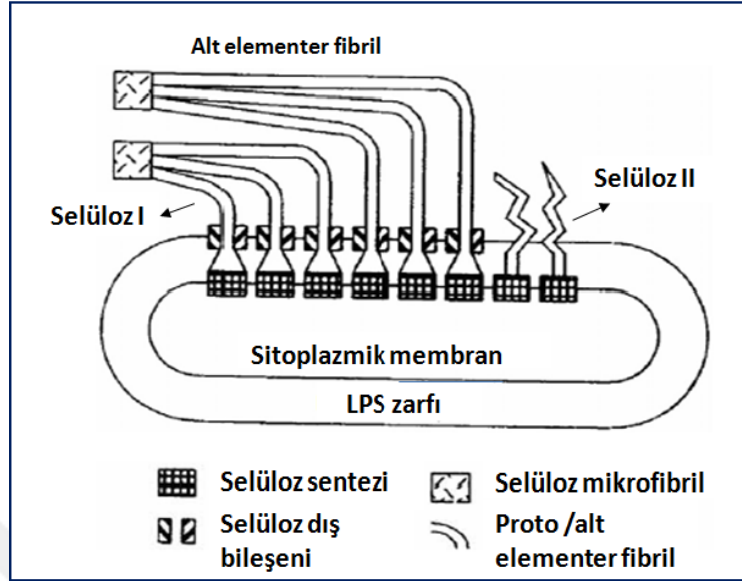
BS, algler (*Vallonia*) küfler, (*Saprolegnia*, *Dictyostelium discoideum*) ve bakteriler (*Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Zoogloea*) tarafından üretilmekle birlikte en fazla bilinen tür *Gluconacetobacter xylinus* (*Acetobacter xylinum*) suşudur (Klemm et al., 2001). BS üreticilerine genel bakış Tablo 2.2 'te sunulmuştur (Jonas and Farah,1998).

Tablo 2.2: BS üreticileri (Jonas and Farah,1998)

| Mikroorganizma cinsi | Selüloz Çeşidi |
|----------------------|--------------------------------------|
| Acetobacter | Hücre dışı film tabakası ya da şerit |
| Achromobacter | Şerit |
| Aerobacter | Fibril |
| Agrobacterium | Kısa fibril |
| Alcaligenes | Fibril |
| Pseudomonas | Belirsiz şekil |
| Rhizobium | Kısa fibril |
| Sarcina | Amorf |

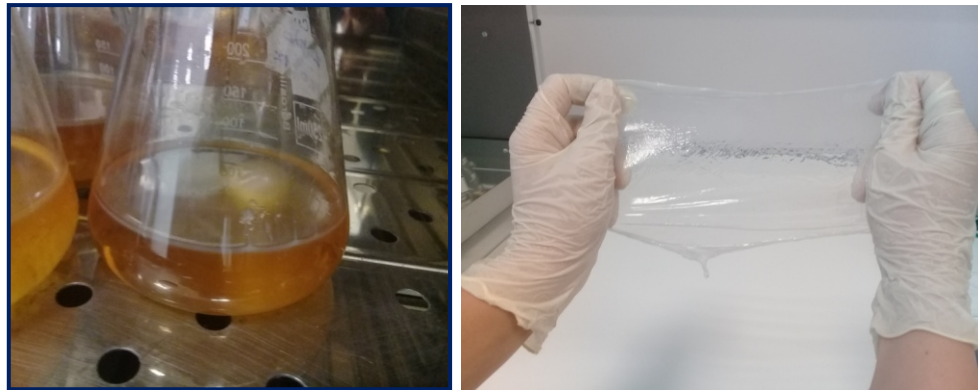
BS'nin makroskobik morfolojisi üretilme şartlarına bağlıdır. Statik koşullarda, bakteri, oksijen açısından zengin olan sıvı besiyerinin yüzeyinde selüloz ağını oluşturur. Selüloz alt iplikçikleri, bakteri hücrelerinin yüzeyindeki gözeneklerden doğrusal olarak hücre dışına salınır, mikro iplikçikleri oluşturmak üzere kristal yapı kazanır ve besiyerinin derinlerine doğru uzanır (Şekil 2.8). Çalkalamalı kültürlerde oluşan BS'ye göre statik kültürde oluşan BS, komşu iplikçikleri daha az dallanmış ve birbiriyle daha az bağlantılıdır. Çalkalamalı kültürde düzensiz tanecikli, yıldız şeklinde ve lifli iplikçikler besiyerine dağılmış halde bulunur. Ağsı iplikçikler ızgara benzeri bir yapı oluşturmak üzere birbirine

bağlanır ve hem düşey hem de paralel doğrultuda uzanır (Yamanaka et al., 1989; Yoshinaga et al., 1997; Iguchi et al., 2000).



Şekil 2.8: *G. xylinus* tarafından selüloz mikrofibrillerin birleştirilmesinin bir görüntüsü (Iguchi et al., 2000; Mohite and Patil, 2014)

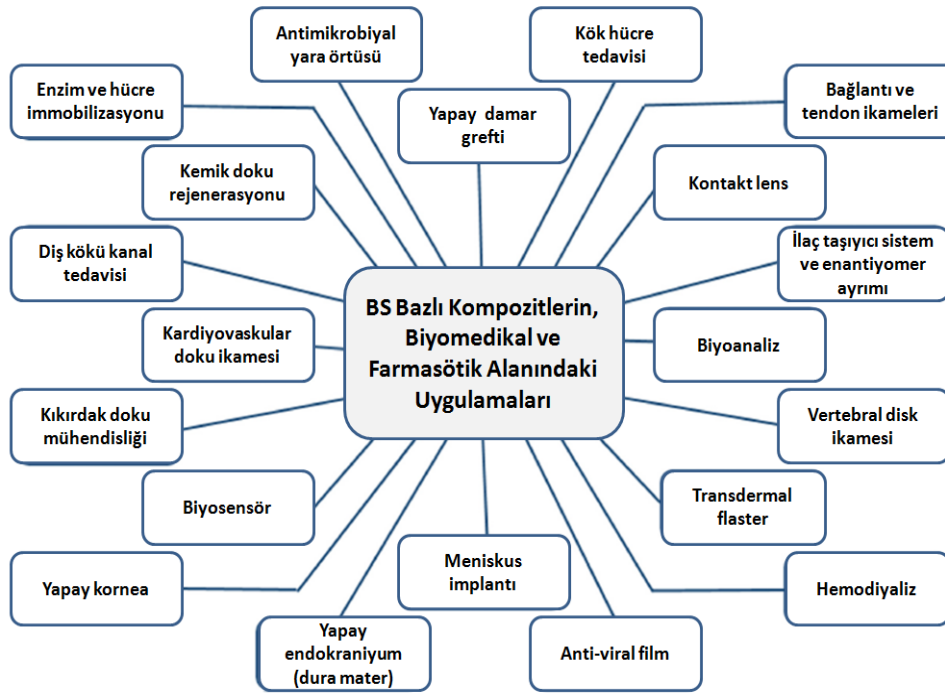
BS, genel olarak suda çözünmeyen, esnek, gerilme direnci yüksek, elastik bir polimerdir ve ağsı bir yapıya sahip olan polimerin kristalize özelliği yüksektir. BS yüksek düzeyde su içerir ve bu nedenle jelatimsi bir görünüme sahiptir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü'nin Medikal Biyoteknoloji Laboratuvarında üretilen BS'ye örnek. Solda üretim sırasında BS, sağda ise yıkanmış saf BS'nin görüntüleri

2.2.1. BS'nin biyomedikal kullanım alanları

Son yıllarda, biyomedikal alanındaki uygulamalar için çeşitli BS bazlı biyomalzemeler tasarlanmıştır (Şekil 2.10). 2000 yılından bu yana bilimsel yayın sayısında olağanüstü bir artış olduğu gibi, BS'nin biyomedikal alandaki yayımlanan bilimsel makalelere yapılan atıfların sayısında da ciddi bir artış olmuştur. Çok sayıda nitelikli bilimsel araştırma makalesi, BS'nin potansiyel uygulama alanlarını vurgulamıştır (Klemm et al., 2011; Fu et al., 2012; Jorfi and Foster, 2015; Rajwade et al., 2015; de Oliveira Barud et al., 2016).



Şekil 2.10: BS bazlı kompozitlerin çeşitli biyomedikal ve farmasötik uygulamalarının şematik bir gösterimi (Ullah et al., 2016).

Bakteriyel selüloz taşıdığı özellikleri sayesinde yapay deri, kan damarı, üretra cihazı, yara örtü malzemesi olarak kullanımı vb. gibi yapılan çalışmalarda biyomedikal alanda geniş bir yelpazede ideal bir biyomalzeme olarak uygulama alanı bulmuştur (Yamanaka et al., 1989; Iguchi et al., 2000; Klemm et al., 2001; Czaja et al., 2006; Keskin et al., 2017).

BS, sahip olduğu birçok eşsiz özelliklerinin yanı sıra nano boyutta gözenek çapı nedeniyle hücre göçünü kısıtlaması ve biyobozunur olmaması gibi

dezavantajları da bulunmaktadır. Ancak, BS'ye, selüloz (Hu and Catchmark, 2011) ve GlcNAc (N-asetilglukozamin) (Yadav et al., 2010) eklenerek biyobozunurluğunun ayarlanabildiği yara örtüleri için yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Ullah et al., 2016).

2.2.2. Yara iyileştirici ve deri ikamesi olarak BS

BS ağsı nanofiber ve gözenekli yapısı sayesinde mükemmel emicilik özelliği sağladığından, eksüdalara yara dokularından tamamen uzaklaştırma potansiyeline sahiptir. BS'nin antimikrobiyal aktiviteye sahip olmaması ve yara enfeksiyonunu önleyememesi nedeniyle, BS bazlı antimikrobiyal biyomalzemeler, genellikle antimikrobiyal ajanlar ve BS'nin nano ağsı yapısı üzerinde fiziksel veya kimyasal yaklaşımlar kullanılarak elde edilmiştir. Böylece antibiyotiklerin veya diğer ilaçları içeren BS, dış enfeksiyonlara karşı etkin bir bariyer oluşturan ideal bir yara örtüsünün özelliklerini sağlayabilen bir biyopolimer adaydır (Şekil 2.11) (Czaja et al., 2006; Muangman et al., 2011; Gayathry and Gopalaswamy, 2014).

BS, günümüzün yeniliklerinden olan nanoteknolojinin de ilgi odağı haline gelmiştir. Gümüş (Ag) nanoparçacıklarının antibakteriyel, antifungal ve antiviral özellikleri sayesinde Ag nanopartikülleri içeren BS, yara tedavisinde oldukça etkili olduğu yapılan birçok çalışma ile ispatlanmıştır Ag ile geliştirilen BS hibrit sistemler, özellikle normal ve kronik deri yaraları ve ülserleri için biyomedikal alanda geniş çaplı kullanım potansiyeline sahip olabilmektedir (Rai et al., 2009; de Oliveira Barud et al., 2011; Yang et al., 2012; Wu et al., 2014).



Şekil 2.11: Yara örtüsü olarak BS membran (Czaja et al., 2007).

Biyouyumlulukları ile hücre adezyonu ve proliferasyon kabiliyetleri sayesinde BS ve kompozitleri, yara örtüsünün yanı sıra deri dokusunun yenilenmesini de teşvik edebilen yapay deri ikamesi olarak kullanım potansiyeli de taşımaktadır (Keshk, 2014; Qiu and Netravali, 2014). Sıcak ve nemli bir ortam, hızlı ve etkili iyileşmeyi teşvik etmektedir. BS, yaranın iyileşmesi için yaralı bölgeye nemli bir ortam sağlamaktadır. BS'nin ideal bir yara örtüsü için sağladığı özellikler ile modifiye edilmesi gereken kriterleri, Tablo 2.3'de değerlendirilmiştir.

Tablo 2.3: İdeal yara örtüsü malzemeleri ile BS'nin karşılaştırılması (Sulaeva et al., 2015). (Özellikleri sağlayan (+), özellikleri sağlamayan (-) ile belirtildi)

| İdeal Yara Örtüsü Özellikleri | BS'nin Karakteristik Özellikleri |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| Nemli ortam | + |
| Eksüda fazlalığının emilmesi | - |
| Elverişli gaz alış-verişi | + |
| Isıl izolasyon | + |
| Enfeksiyona karşı koruma | + |
| Anti-bakteriyal aktivite gösterme | - |
| Biyouyumlu | + |
| Toksik olmayan | + |
| Mekanik kararlılık | + |
| Deriye düşük tutunma gösterme | - |
| Düşük maliyet | + |

Günümüzde, BS membranlarının ana ticari kullanımı, epitelizasyonu arttırmak için hücre dışı matrisi (ECM) taklit eden Bionext®, Membracell® ve Xcell® gibi çeşitli ticari yara örtüleri bulunmaktadır (Kwak et al., 2015). BS membranları ile yapılan yara tedavisi için geleneksel gazlı bez ile Tegaderm®, Cuprophan® veya Xeroform™ gibi sentetik malzemelere göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Lin and Dufresne, 2014). Ayrıca, BS membranlarının nekrotik

kalıntıların uzaklaştırılmasını kolaylaştırdığı da yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Czaja et al., 2006).

Biyolojik, fiziksel ve kimyasal özelliklerin benzersiz kombinasyonu ile aljinat, kitin ve türevleri, kitosan ve türevleri, hem endüstriyel hem de tıbbi alanlarda yaygın olarak kullanılmakla birlikte ticari uygulamaları, yara iyileşmesi için gelişmekte olan bir araştırma alanı olup son yıllarda oldukça yaygınlaşmıştır (Paul and Sharma, 2015). BS membranı, farklı malzemeler ile BS bazlı kompozitler hazırlayarak, deri dokusu onarımı için en uygun malzemeyi tasarlayacak şekilde modifikasyonlar yapılabilir (Ullah et al., 2016).

Histolojik incelemeler sonucunda BS-Ch (Ch: Kitosan) (Lin et al., 2013), BS-PHEMA (PHEMA: Polihidroksi etil metakrilat) (Figueiredo et al., 2013), BS-PEG (PEG: Polietilen glikol) (Zhijiang and Guang, 2011), BS-Col (Col: Kollajen) (Wanna et al., 2013) BS-Vac (Vac: Vaccarin) (Qiu et al., 2016), kompozitleri, saf BS membranına göre biyolojik olarak daha aktif, daha iyi hücre tutunmasını ve epitelizasyonunu sağlaması ve iyi mekanik özelliklere sahip olması sayesinde doku rejenerasyon için uygun kompozit adayları olduğu gösterilmiştir. Bu kompozitler, yara örtüsü malzemesi ile doku mühendisliği iskelesi gibi biyomedikal uygulamalarda iyi bir kullanım potansiyeline sahiptir (Ullah et al., 2016).

Hem *in situ* hem de post modifikasyon yaklaşımları ile başarılı bir şekilde üretilen BS-Keratin nanokompozitler, hücre kültürü çalışmaları ile dermal fibroblastların iyi bir hücre tutunma profili sağladığını ve keratinositlerin, BS/keratin nanokompozitlerinin yüzeyinde orijinal epitel morfolojisini koruduğunu göstermiştir. Bu çalışma ile yara iyileşmesinde ve ileri deri doku mühendisliğinde potansiyel uygulamalara sahip olduğu açıkça gösterilmiştir (Keskin et al., 2017).

2.2.3. BS'nin diğer kullanım alanları

BS, tekstil sanayinde suni deri ve diğer tekstil ürünlerinde adsorban olarak, kağıt sektöründe birinci kalite kağıt üretiminde, kozmetik sanayinde ise kremlerin, toniklerin, tırnak cilalarının emilimini kolaylaştırmada kullanılmaktadır. (de Oliveira Barud et al., 2016; Picheth et al., 2017; Fernandes et al., 2019). BS gıda sanayinde ise özellikle düşük kalorili tatlı, cips, çerez ve şekerlemelerin

üretiminde; dolgunluk verici olarak tatlı, dondurma ve salata soslarının bileşiminde, ayrıca sosis ve etlerin kaplanması için güvenilir ve geniş bir kullanım potansiyeline sahiptir (Kaya 2007; Akoğlu et al., 2009).

2.3. Polilaktik asit (PLA)

Doğrusal bir alifatik polyester olan polilaktik asit (PLA) veya polilaktit, şeker kamışı veya mısır nişastası gibi yenilenebilir kaynaklardan türetilen laktozun (veya süt şekeri) fermentasyonu sonucunda elde edilen laktik asit monomerlerinden oluşmaktadır. Bundan dolayı, PLA insan vücudunda kullanım için toksik olmayan çevre dostu bir üründür (Farah et al., 2016). PLA'nın ayrışması hidroliz, ardından bakteriler yoluyla biyolojik parçalanma ile gerçekleşir (Silverajah et al., 2012).

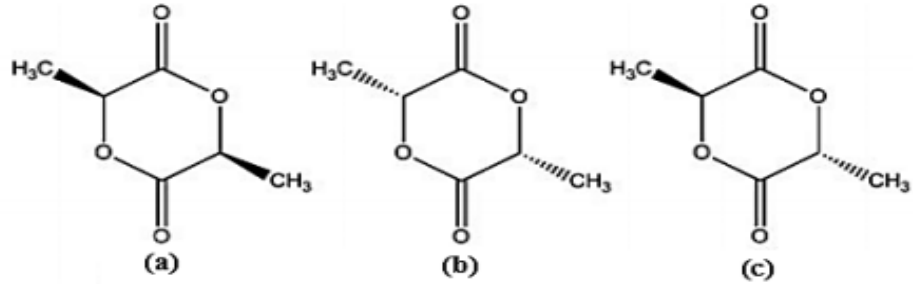
Diğer alifatik polyesterlerle karşılaştırıldığında PLA, kolay işlenebilirlik, yüksek mekanik mukavemet, biyoyumluluk, biyobozunurluk, düşük toksisite, şeffaflık ve 3B baskıda kullanabilme imkanı gibi mükemmel özelliklere sahiptir (Tablo 2.4) (Qi et al., 2017; Senatov et al., 2016). PLA kolayca işlenerek ortopedik uygulamalarda kullanılmak üzere vidalar, pinler ve plakalar üretilebilir (Wuisman et al., 2006).

Tablo 2.4: PLA'nın formlarının fiziksel ve kimyasal özellikleri (Xiao et al., 2012).

| Özellikler | PDLA | PLLA | PDLLA |
|--------------------------------------|--|--------------|----------|
| Çözünürlük | Hepsi benzen, kloroform, asetonitril, tetrahidrofur (THF), dioksan vb. içinde çözünürken; etanol, metanol ve alifatik hidrokarbonlarda çözünmez. | | |
| Kristal yapı | Kristal | Yarı-kristal | Amorf |
| Erime sıcaklığı (T_m) / °C | ≈180 | ≈180 | Değişken |
| Camsı geçiş sıcaklığı (T_g) / °C | 50-60 | 55-60 | Değişken |
| Isıl ayrışma sıcaklığı / °C | ≈200 | ≈200 | 185-200 |

| | | | |
|--|---------|---------|----------|
| Kopma uzaması (%) | 20-30 | 20-30 | Değişken |
| Kopma/kırılma mukavemeti / (g/d) | 4,0-5,0 | 4,0-5,0 | Değişken |
| 37°C'deki normal tuzlu çözeltideki yarı ömrü | 4-6 ay | 4-6 ay | 2-3 ay |

Doku mühendisliği için alternatif bir aday olan PLA; biyoyumluluk, biyobozunurluk ve termal plastisite nedeniyle kemik doku mühendisliğinde tercih edilmektedir (Venkatesan et al., 2014). Doku mühendisliğindeki üç boyutlu (3B) doku iskeleleri arasında en çok kullanılan biyobozunur sentetik polimerler, doymuş poli- α -hidroksi esterlerdir (Rezwan et al., 2006). Bu esterlerden biri olan polilaktik asit, poli(-D-laktik asit) (PDLA), poli(-L-laktik asit) (PLLA) ve poli(-D, L-laktik asit) (PDLA)'in rasemik karışımı olmak üzere üç formda bulunmaktadır (Şekil 2.12) (Ahmed and Varshney, 2011).



Şekil 2.12: Polilaktik asitin izomerik formları a) PLLA, b) PDLA ve c) PDLA (Ahmed and Varshney, 2011).

2.4. 3D Printing (3B Yazıcı)

Üç boyutlu (3B) yazıcı, üç boyutlu bir nesneyi üretmek için plastik, metal, seramik, toz, sıvı veya canlı hücreleri içeren malzemelerin tabakalar halinde kaynaştırılması veya biriktirilmesi yoluyla yapılan bir üretim tekniğidir (Ventola, 2014; Schubert et al., 2014). Bu süreç aynı zamanda, katkı maddesi üretimi (AM), hızlı prototipleme (RP) veya katı serbest form teknolojisi (SFF) olarak da adlandırılır (Gross et al., 2014). Charles Hull'un icat ettiği ve stereolitografi (STL) olarak tanımladığı cihaz, tarihteki ilk 3B yazıcı olarak kabul görmektedir (Ventola, 2014; Schubert et al., 2014).

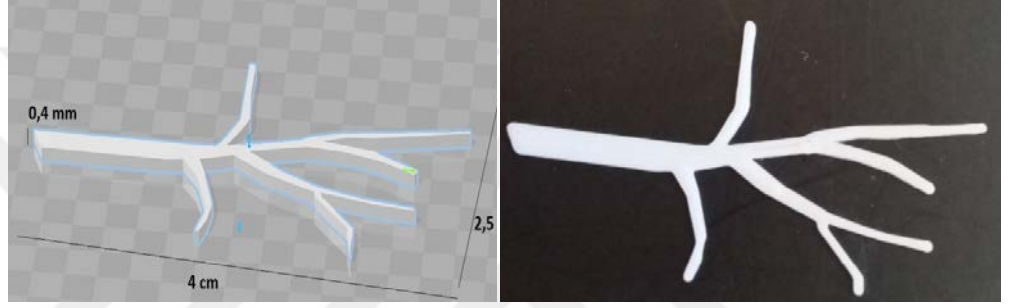
İlk başlarda 3B yazıcı, öncelikle mühendislikte prototipleri oluşturmak için kullanılmıştır. Ancak son zamanlarda, bazı araştırma makalelerine göre 3B yazıcının kullanım alanı olarak tıbbi uygulamalar önemli bir ivme kazanmıştır ve sağlık hizmetlerinde devrim yaratması öngörülmektedir. 3B yazıcı ile tıbbi kullanımları, hücre kültürü çalışmaları, kök hücre çalışmaları, doku ve organ üretimi, kişiye özel protez, implant ve anatomik modellerin oluşturulması ve ilaç dozaj formları, teslimi ve keşfi ile ilgili farmasötik araştırmalar da dahil olmak üzere geniş bir yelpazede araştırmalar yürütülmektedir (Ventola, 2014; Schubert et al., 2014).

Bu tez çalışmasında, piyasadaki deri ikamelerin dezavantajlarından biri olan neovaskülarizasyona (damar oluşturma) dikkat çekerek, BS'nin neovaskülarizasyona ve migrasyona olanak sağlayacak şekilde yeni bir yaklaşım ile 3B PLA kalıp kullanılarak ileri modifikasyonunun yapılması araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

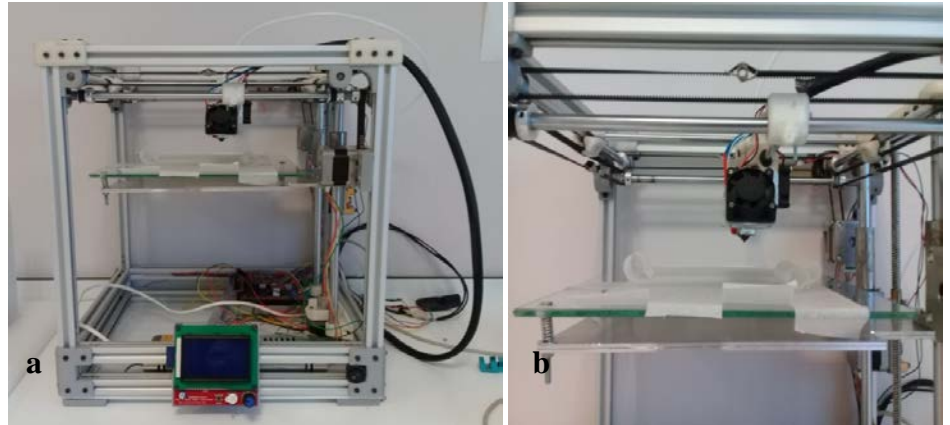
3.1. 3-Boyutlu (3B) Yazıcıda PLA Kalıbın Oluşturulması

SOLIDWORKS 2017 (DS-Dassault Systems) çizim programı ile ağsı yapıdaki damar modeli çizimi yapıldı (Şekil 3.1a) 3B PLA (1.75 mm PLA+ 3D Filament White, Melting Temperature: 205-220°C, Shenzhen Esun Industrial Co., Ltd.) damar ağsı yapısı boyutları 4 cm uzunluğunda, 2.5 cm genişliğinde ve 0.4 mm kalınlığında olacak şekilde basılmak üzere programlandı (Şekil 3.1a).



Şekil 3.1: a) SOLIDWORKS 2017 çizim programındaki 3B damar modeli ve b) 3B yazıcıyla PLA malzemesi kullanılarak oluşturulan damar modelindeki kalıp

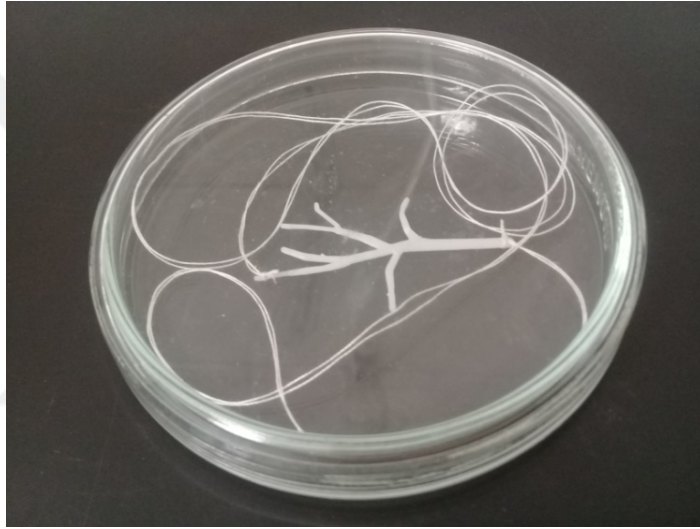
Çalışmada polilaktik asidin L enantiyomerini içeren PLA (PLLA) kullanıldı. Optikçe saf PLLA kristal yapıda, sert, kırılğan bir madde olup ortalama mol kütlesi ve kristalin boyutuna bağlı olarak 175-185°C sıcaklık aralığında eriyebilmektedir (Xiao et al., 2012).



Şekil 3.2: a) Bölümümüzdeki 3 boyutlu (3B) yazıcı b) 3B kalıbın basımı yapan nozzle ve tablanın görüntüsü

Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü'nün Biyomalzemeler ve 3B Biyoarayüzler laboratuvarında bulunan 3B yazıcının (Şekil 3.2) sıcaklığı 215°C'ye çıkartılarak PLA'nın erimesi sağlanarak basıma hazır hale getirildi. PLA malzemesinden damar modelinde 3B kalıp oluşturuldu (Şekil 3.1b).

3B PLA kalıpları, iki ucuna dikiş ipi bağlanarak cam bir petriye konuldu (Şekil 3.3) ve 121°C'de 15 dk boyunca otoklav (Hirayama, Japonya) ile steril edildikten sonra çalışmanın sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere oda sıcaklığında muhafaza edildi.



Şekil 3.3: İp sistemi ile oluşturulmuş 3B PLA kalıbı

3.2. Mikroorganizma Aktivasyonu ve *In Situ* BS Üretimi

HS besin ortamını oluşturan gerekli malzemeler, glukoz (Merck KGaA, Fransa), bakteriyal pepton (Lab M, MC024, UK), maya özütü - yeast ekstrakt (Merck KGaA, Almanya), sitrik asit - $C_6H_8O_7$ (Merck KGaA, Almanya) ve disodyum hidrojen fosfat - Na_2HPO_4 (Merck KGaA, Almanya) temin edildi ve Tablo 3.1'deki gösterilen miktarlarda olacak şekilde hazırlandı. HS besin ortamının pH'ı 5-5,5 olacak şekilde tampon çözeltiler (0,1 M HCl – 0,1 M NaOH) kullanılarak pH metre cihazı (HANNA Instruments HI-2211 pH/ORP Meter, Romanya) ile ayarlandı.

Tablo 3.1: HS besin ortamı (Hestrin ve Schramm, 1954)

| Bileşen | Miktar |
|--|---------|
| Glukoz | 20 gr |
| Yeast extract (Maya özütü) | 5 gr |
| Bakteriyolojik pepton | 5 gr |
| Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄) | 2,7 gr |
| Sitrik asit (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O) | 1,15 gr |
| Destile su | 1000 ml |

Mikroorganizma aktivasyonu için 121°C’de ve 15 dk otoklavda steril edilmiş gerekli malzemeler sonra % 70’lik etil alkol (BIOTEKNO, Türkiye) ile yüzeyleri steril edildi ve Class II laminar hava akışlı kabine (NUAIRE NU-425-400E Biological Safety Cabinet) alındıktan sonra 15 dk boyunca UV ile steril edildi.

**Şekil 3.4:** Aşı kültürünün hazırlanması

250 ml’lik erlenlere (ISOLAB, Almanya) 50 ml (5:1 oranı) HS besin ortamı hazırlandı. Stoktan (-20°C) çıkartılan *G. xylinus* suşları, aktifleştirme için HS besin ortamına 100 µl ekim yapıldı. Daha sonra çalkalamalı inkübatörde (ZHICHENG Incubator Shaker), 30°C’de ve 150 rpm çalkalama hızında 24-36 saat inkübe edilerek aşı kültürü hazırlandı (Şekil 3.4).

3.3. Mikroorganizmaların Stoklanması

Aktifleştirilen mikroorganizma kültüründen alınan pelletler % 50 gliserol olacak şekilde steril kriyo tüplere (Greiner bio-one) alındı. Kriyo tüpler sonraki çalışmalar için -20°C’de muhafaza edildi.

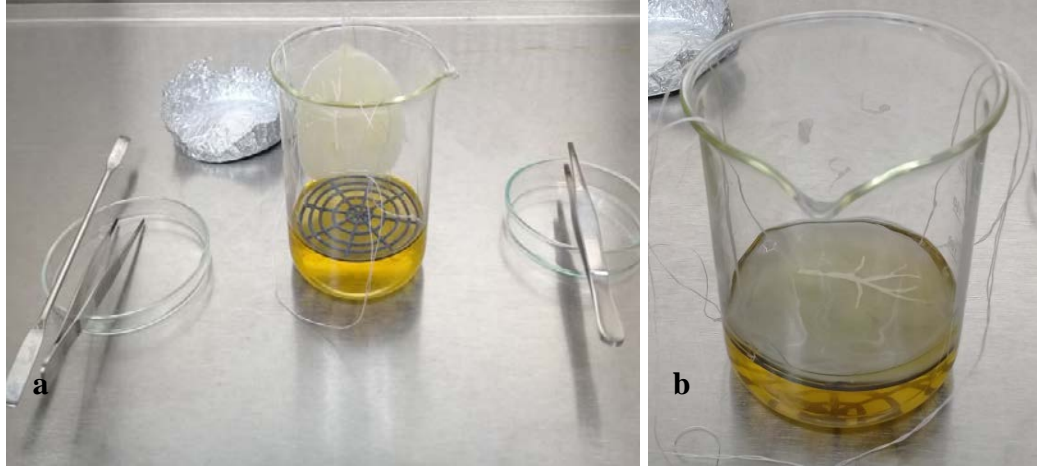
3.4. *In Situ* BS/PLA Biyokompozitin Üretimi

Aşı kültürü steril HS ortamına inoküle edildi ve ardından önceden steril edilen PLA kalıplar, Class II laminar hava akışlı kabinde *in situ* BS üretim ortamına aseptik koşullarda yerleştirildi (Şekil 3.5). 30°C’de statik kültürde 3-4 gün, 3B PLA’nın üst yüzeyinde BS üretimi gerçekleştirildi.



Şekil 3.5: 3B PLA kalıpların, inokulumu yapılan HS besin ortamına steril koşullarda yerleştirilmesinin görüntüsü

3-4. günün sonunda BS membranı aseptik koşullarda laminar kabinde ters çevirilerek 3B PLA kalıbın diğer yüzeyinde BS membranının oluşması için 3-4 gün tekrar statik kültür koşullarında etüvde (Memmert Incubator IN450) inkübe edildi. Ancak bu işlem sırasında BS membranının alt yüzeyindeki gevşek fiber yapı (anaerobik selüloz) steril bir spatül ile temizlendikten sonra ters çevirme işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: a) BS membranın alt yüzeyindeki gevşek fiber yapı steril bir spatül ile temizlenmesi ve
b) BS/PLA biyokompozitin HS besin ortamında steril koşullarda ters çevrildikten sonraki görüntüsü

3.5. Bakteriyel Selüloz Hasadı

Bakteriyel selülozun besin ortamı atıklarından ve mikrobiyal hücre kalıntılarında uzaklaştırılması için temizlenmesi gerekmektedir. Hasat sırasında BS içerdiği safsızlıklar nedeniyle sarımsı bir renktedir. BS için yaygın olarak kullanılan saflaştırma yöntemi 0,1 M sodyum hidroksit (NaOH) alkali çözeltisi ile 60-90 C arasında 20 dk – 4 saatte kadar kaynatma, % 5'lik asetik asit ile nötralizasyon için 30 sn kadar daldırma ve destile su ile kaynatarak durulama prensibine dayanmaktadır (Keskin et al., 2017).

PLLA, benzen, kloroform, aseton, dioksan gibi çözücüler içerisinde çözünür ve bir hidroliz yokluğunda bile ester bağının basit hidrolizi ile bozunur (Xiao et al., 2012).

Çalışmada 3B PLA'dan yapılmış kalıbın, BS'den uzaklaştırılması için uygun bir çözgen seçimi yapılarak yıkama işlemi için bazı optimizasyon çalışmaları yapıldı.

PLA/BS biyokompozitin yıkama optimizasyonu için:

0,1 M, 0,5 M, 1 M, 1,5 M ve 2 M NaOH (Merck KGaA),

Kloroform (Sigma-Aldrich),

Aseton (VWR BDH® Chemicals)

ile ayrı ayrı denemeler yapıldı. Uygun olan çözügen seçimi belirlendikten sonra, PLA'nın BS membranından tamamen uzaklaştırılması için optimizasyon çalışmaları yapıldı.

BS membranın NaOH ile yıkama sonucunda elde edilen olumsuz sonuçlarından dolayı, yıkama işlemi için aseton ve kloroform gibi çözügenlerin (Bkz. Tablo 2.4) kullanılması için denemeler yapıldı. Bunun için PLA kalıbın aseton ve kloroform içerisindeki çözünme durumlarını test etmek için bu iki çözügen ile deneme setleri kuruldu. Kloroform ve asetonun BS membranın 3B nanofibril yapıları üzerindeki zararlı etkileri bilinmediği için saf BS membrandan alınan 5x5 cm² boyutlardaki kare parçalar sırasıyla aseton ve kloroform içerisinde 30-45 dk bekletildi ve mekanik dayanımları elle test edildi. Kloroform ve aseton ile yapılan denemelerin sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda kloroform ile yıkama prosedürünün kullanılmasına karar verildi.

Üretilen PLA/BS membran örneklerinin fazla nemi filtre kağıdı ile alınarak bir gece boyunca çeker ocak içerisinde ağzı kapalı bir kaptaki kloroform içerisinde bekletildi. Böylece BS membranındaki PLA kalıbı yumuşatarak selüloz nanofiber yapıları bozmadan uzaklaşması için hazırlandı. Daha sonra manyetik karıştırıcıya (DAIHAN Scientific, Kore) alınarak 30-45°C'de PLA kalıbın tamamen kaybolmasına kadar kloroform ile işleme tabi tutuldu. Ardından BS membranlar kloroform içerisinden alındı ve bir filtre kağıdı ile fazla kloroform uzaklaştırılarak destile su ile durulandı. Bu işlemden sonra yukarıda belirtilen BS yıkama işlemi uygulandı. İki kere 0,1 M NaOH ile 45 dk ile yıkama ardından % 5'lik asetik asit ile birkaç saniye bekletip ardından destile su ile BS membranları nötralize olana kadar kaynatma ve duruluma işlemi uygulandı.

Yıkama işlemi ile selüloz fibrilleri tamamen hücresel artıklarından ve içerdiği PLA kalıptan arındırılması gerçekleştirildi. BS'nin saflaştırma işleminden sonra pH'ı ölçüldü ve pH 7-7,4'i gösterdiği değerde destile su ile yıkama işlemi durduruldu ve 121°C'de 15 dk boyunca otoklavandı. Steril edilen damar yapısı içeren BS örnekleri bir sonraki çalışmalar için +4°C'de muhafaza edildi.

3.6. Karakterizasyon Testleri

PLA kullanılarak modifiye edilmiş BS örneklerin incelenmesi için Taramalı Elektron Mikroskopisi (Scanning Electron Microscopy – SEM), Zayıflatılmış Toplam Yansıma – Fourier Dönüşümlü Kıızıl Ötesi Spektrometresi (Fourier Transform Infrared Spektroskopy – ATR-FTIR), Bilgisayarlı Mikro Tomografi (Micro-Computed Tomography – Micro-CT), ışık mikroskobu ve *in vitro* hayvan hücre kültürü denemeleri yapıldı.

3.6.1. SEM analizi

Taramalı elektron mikroskobunun çalışma prensibi, alan emisyonlu (FEG) tabancadan ortaya çıkan elektron demetinin incelenen örneğin yüzeyi ile yaptığı fiziksel etkileşimlerin sonucunda ortaya çıkan sinyallerin toplanması ve incelenmesi temeline dayanmaktadır. Elektron demeti ile numunenin yüzeyi taranarak numunenin görüntülerin üretmesi sağlanmaktadır.

BS örneğinin morfolojik ve damar yapısının görüntülenmesi için SEM analizi, Ege Üniversitesi Merkezi Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (Ege-MATAL)'de bulunan görüntüleme laboratuvarında bulunan ETD (SE), T1 (In-Column BSE) - T2 (In-Column SE), geri çağrılabilen BSE, EBIC, STEM, LVD, EDS dedektörlerine, Schottky FEG tabancasına ve 340 mm numune odası iç çapına sahip ve yüksek ve düşük vakum altında çalışabilen SEM (Thermo Scientific Apreo S) cihazı ile gerçekleştirildi.

BS örneklerin SEM analizi için hazırlanması:

Daha önceden steril edilmiş +4°C'de muhafaza edilen BS örneklerinden bazıları Class II laminar akışlı kabininde aseptik koşullarda disposal petrilere yerleştirildi.

Üzerine bir miktar steril destile su ilave edildikten sonra bir gece boyunca -20°C'ye kaldırıldı.

-20°C'den alınan petri içindeki BS örnekleri, çözünme gerçekleşmeden liyofilizatöre konulmadan önce petrinin üzeri alüminyum folyo ile tamamen kaplandı ve bir enjeksiyon ucu ile alüminyum folyoda delikler oluşturuldu.

Daha sonra örnekler liyofilizatör (dry-freeze; LABCONCO, USA) cihazına yerleştirildi

Liyofilizatör cihazında örnekler -50°C 'de 0,042 mbar vakum altında 16-18 saat boyunca tutuldu.

Ardından SEM analizinin yapılacağı zamana kadar BS örnekleri nem almaması için desikatöre alındı.



Şekil 3.7: 1 cm² kare boyutlarında BS'den alınan örnekler SEM analizi için SEM cihazına yerleştirilmesinin görüntüsü

SEM analizinden önce hazırlanan BS örnekleri kare geometrisine sahip 1 cm² boyutlarında kesilerek 12 nm altın ile yüksek vakum cihazında yarım saat bekletildi. Bu işlemden sonrada SEM cihazı ile 10.0 mm (WD: çalışma mesafesi), 7.50 kV (HV: hava hattı), 100-100.000x büyütmelerde 5, 10, 20, 100, 200 ve 500 μm ile 1 mm ölçekte BS örnekleri incelendi ve fotoğraflandı.

3.6.2. ATR-FITR analizi

Fourier Dönüşümlü Kıızıl Ötesi Spektrometresi (FTIR) cihazı, Elmas kristal-ATR (Zayıflatılmış Toplam Yansıma) modülü sayesinde katı, sıvı ve toz halindeki çeşitli malzemelerin kimyasal yapıların belirlenmesinde kullanılmaktadır. ATR-FTIR cihazı moleküllerdeki bağların titreşim frekanslarını ölçerek ilgili fonksiyonel grupların tanınmasını sağlayarak numelerinin benzerlik ve farklılıklarının karşılaştırılmasında kullanılmaktadır.

ATR-FTIR analizi yapmak için Ege-MATAL'daki, DTGS dedektörü ve lazer diyota sahip, Spectrum 10 yazılımına göre çalışan ve 4000-600 cm^{-1} spektrum aralığında çalışma prensibine sahip ATR-FTIR (Perkin Elmer Spectrum Two) cihazı kullanıldı.

Örneklerin ATR-FTIR analizi için hazırlanması:

Saf olarak üretilen BS ve 3B PLA kalıp içeren üretimden elde edilen BS örnekleri olmak üzere iki farklı örnek hazırlandı.

Daha önceden $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırılan BS örnekleri laminar akışlı kabinde petrilere konuldu ve üzerine bir miktar steril destile su ilave edildi.

Petriler kapakları kapatılarak bir gece boyunca donması için -20°C 'ye kaldırıldı.

-20°C 'den alınan bu örnekler çözünme gerçekleşmeden liyafilizatör (dry-freeze) cihazına yerleştirilmek üzere hazırlandı.

Liyafilizatör cihazında örnekler -50°C 'de 0,042 mbar vakum altında 16-18 saat kadar tutuldu.

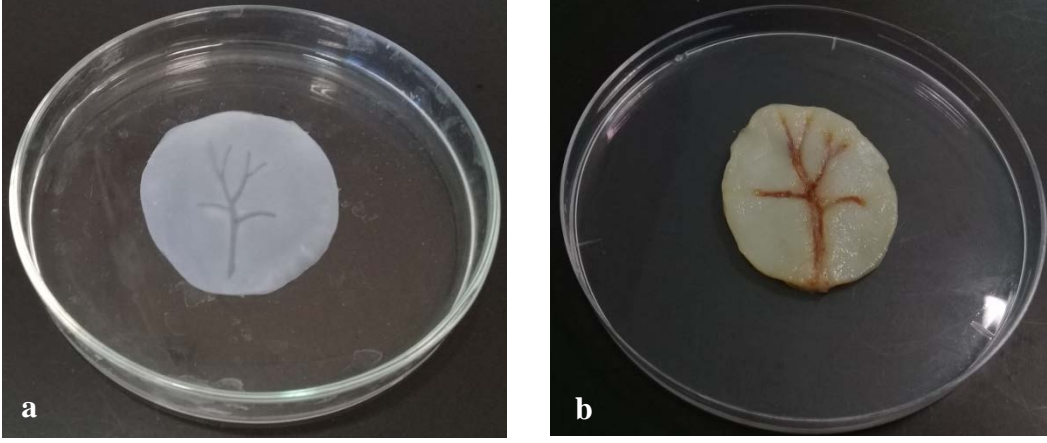
Saf PLA, saf BS ve 3B PLA'dan arındırılmış BS örneklerinden alından kesitler, ATR-FTIR cihazına sırasıyla yerleştirildi ve 4000-600 cm^{-1} spektrumda okumalar alınarak PerkinElmer Spectrum Version 10.5.4 programı ile grafikler elde edildi.

3.6.3. Işık mikroskobu analizi

Bu yöntemin amacı, BS membranlar içerisinde oluşan ağsı damar yapısının hazırlanan demir tuzu içeren agarlı solüsyon ile doldurulduktan sonra ışık mikroskobu altında görülebilir hale getirmektir.

2 gr demir klorür (FeCl_2), 1,5-2 gr (solüsyonun % 15-20) agar (Fluka, 05039, İspanya) ve 10 ml destile su ile bir solüsyon hazırlandı.

Hazırlanan solüsyon mikroenjeksiyon (Set Medikal, Almanya) yardımıyla $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiş BS membranın içerisindeki ağsı damar gözeneklerine aktarıldı (Şekil 3.8)



Şekil 3.8: a) PLA ve diğer besin ortam bileşenlerinden arındırılmış saf BS membranı ve b) BS içerisinde oluşturulan ağsı gözeneklere demir tuzu aktarımı sonrası

Hazırlanan preparat ışık mikroskobuna (OLYMPUS) yerleştirilerek gözlem yapıldı ve fotoğraflandı.

3.6.4. Mikro-CT analizi

Micro-CT analizi, malzemenin 3B yapısına zarar vermeden, X-ışınları kullanılarak malzemenin kesitlerinden aldığı görüntülerle 3B model oluşturma prensibine dayanmaktadır. Kompozit, polimer, biyolojik materyal vb. gibi malzemelerin içerisindeki boşluklu yapının incelenmesi ve bir materyalin içerisindeki 4 farklı maddeye kadar mikron düzeyindeki görüntüleme işlemleri *in vitro* koşullarda sağlanabilmektedir.

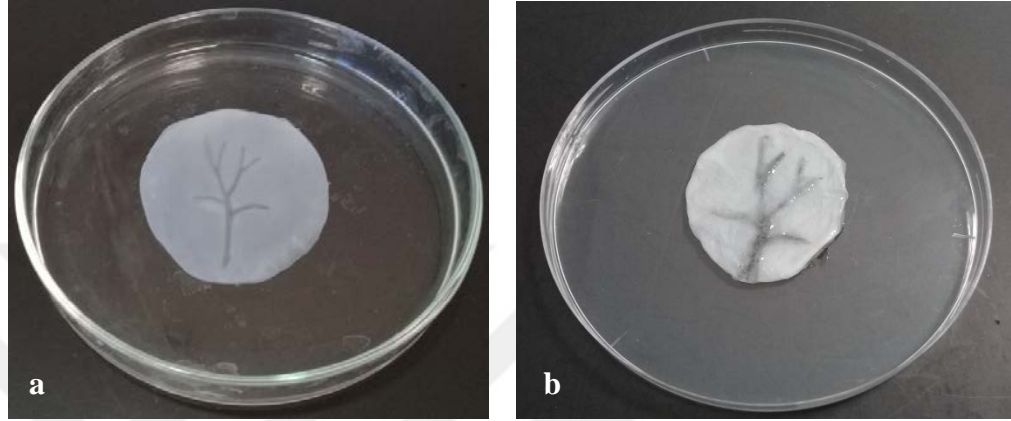
BS örneğinin morfolojik ve damar yapısının görüntülenmesi için Micro-CT analizi, Ege Üniversitesi'nin Merkezi Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (Ege-MATAL)'de bulunan görüntüleme laboratuvarında 500 nm/<2 µm (Nom./10% MTF) çözünürlükte görüntü alan, Micro-CT (SCANCO MEDICAL µCT 50) cihazı ile gerçekleştirildi.

BS membranının Micro-CT analizi için hazırlanması:

≤300 µm boyutlardaki demir tozu (Ege NanoteK, Türkiye) ve solüsyonun % 15-20'i agar (05039, Fluka, İspanya) içerecek şekilde bir solüsyon hazırlandı.

Optimizasyonu yapılan yıkama işlemi ile 3B PLA kalıptan ve diğer ortam atıklarından arındırılmış steril destile su içerisinde tutulan +4°C'deki BS örneğin damar ağsı yapısı oluşan gözenekli alanlara (Şekil 3.8a), hazırlanan agarlı demir tozu solüsyonu mikroenjeksiyonla (Set Medikal, Almanya) yükleme yapıldı (Şekil 3.8b).

Hazırlanan örnek, Micro-CT analizine kadar +4°C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.9: MicroCT analizi için a) 3B PLA'dan arındırılmış BS ve b) demir tozu solüsyonu içeren BS örneğin görüntüsü

3.6.5. *In vitro* hayvan hücre kültürü denemeleri

Ağsı damar yapısı içerecek şekilde *in situ* üretimi yapılan BS örneklerinin *in vitro* hayvan hücre kültürü denemeleri Ege Üniversitesi'nin Biyomühendislik Bölümü'nün Biyomalzemeler ve 3B Biyoarayüzler Laboratuvarında yapıldı. *In vitro* hayvan hücre kültürü denemeleri için HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell- İnsan göbek kordonu veni endotel hücresi) hücre hattı ile hayvan hücre kültürü tekniklerine uygun bir şekilde gerçekleştirildi.

3.6.5.1. Stoklanmış HUVEC hücrelerin çözündürülmesi

Besi ortamı olarak DMEM-High Glucose (Serox, Almanya), %10 Fötal sığır serumu (FBS) (Cefgrogen Biotech, Almanya), % 1 L-Glutamin (Biochrom, Almanya), % 0,1 gentamisin (Biochrom, Almanya) hazırlandı.

-196°C'daki sıvı azot tankının (Termo Scientific Locator JR Plus) içerisinde stoklanmış olan kriyo tüpteki dondurma vasatının (% 90 FBS - % 10

DMSO) içerisinde bulunan HUVEC hücreleri, 37°C'ye ayarlanan su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürüldü.

Kriyo tüp içerisindeki HUVEC hücreleri hazırlanan besi ortamıyla birlikte santrifüj tüpüne alınarak +4°C'deki soğutmalı santrifüjde (Eppendorf Centrifuge 5810 R) 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi.

Santrifüjden sonra, laminar akışlı kabinde santrifüj tüpündeki üstte kalan sıvı kısım uzaklaştırıldı. Santrifüj tüpün dibine hafif birkaç vuruş yapılarak dipte kalan hücre pelleti yüzeyden kaldırıldı ve üzerine besi ortamı eklenerek süspanse edildi.

Süspanse hücre ortamı, T-75 flaska (Greiner bio-one) alınarak 37°C'deki % 5'lik CO₂ içeren inkübatörde (Termo Scientific, Forma STERI-CYCLE) inkübasyona bırakıldı.

3.6.5.2. HUVEC hücrelerin pasajlanması

HUVEC hücrelerin kültür ortamında yaşayabilmeleri, çoğalabilmeleri ve işlevlerini koruyabilmeleri için pasajlanmaya ihtiyaçları vardır. Bundan dolayı inkübasyona bırakılan HUVEC hücreleri 2-3 gün sonra pasajlanma işlemi gerçekleştirilir.

+4°C'den çıkarılan Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen PBS (8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.41 g Na₂HPO₄, 1000 ml destile su), sıcaklığı 37°C'de olana kadar 37°C'deki su banyosunda bırakıldı ve daha sonra PBS ve diğer malzemelerin yüzeyi % 70'lik alkol ile steril edilip laminar akışlı kabine alındı.

İnkübasyondan alınan HUVEC hücreleri, Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen PBS ile yıkandı.

PBS ile yıkamadan sonra hücrelerin üzerine % 0,05'lik tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich) eklenerek 37°C'deki % 5'lik CO₂ içeren inkübatörde 3-4 dk bekletildi.

Hücreler inkübatörden çıkarıldıktan sonra ışık mikroskobu altında hücrelerin tüm yüzeyden kalktığı gözlendikten sonra laminar akışlı kabine alındı.

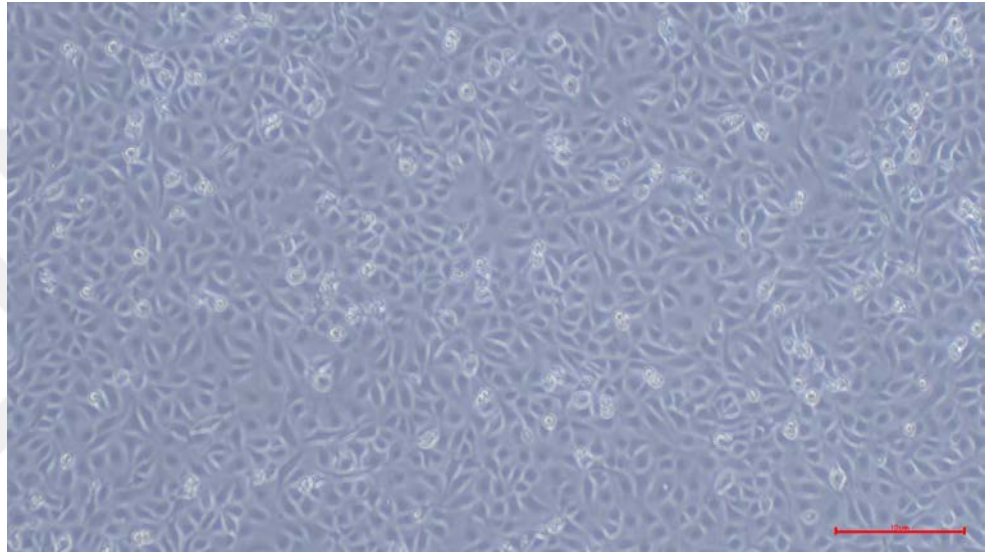
Hücrelerin üzerine 4-5 ml serumlu besi ortamına eklendi ve flasttaki serumlu besin ortamıyla birlikte hücreler santrifüj tüpüne alındı.

Hücreler, +4°C'deki soğutmalı santrifüj cihazında 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve üst sıvı kısmı uzaklaştırıldı.

Santrifüj tüpünün dibinde kalan hücre pelletine hafifçe vurularak yüzeyden kaldırıldı ve üzerine taze besi ortamı eklendi.

Hücre süspansiyonu 1:2 oranında olacak şekilde iki tane 175T flaska alınarak 37°C'deki % 5'lik CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Hücrelerin durumunu kontrol etmek için 1-2 gün sonra ışık mikroskobu altında gözlem yapıldı (Şekil 3.9).



Şekil 3.10: HUVEC hücrelerin flaskın yüzeyine tutunduktan sonra ışık mikroskobundaki görüntüsü

3.6.5.3. HUVEC hücrelerin dondurularak stoklanması

Mikroskopta hücre sayımı yapıp yeterli hücre miktarı elde edildiğine karar verildikten sonraki çalışmalar için hücreler dondurularak stoklanır.

Dondurma işlemi için gerekli besin ortamı ve diğer kimyasallar 37°C'deki su banyosunda bekletildi ve diğer gereçler % 70'lik etil alkol ile yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra UV ışığı altında laminar akışlı kabinde steril edilmeye bırakıldı.

HUVEC hücrelerini içeren flastaki besin ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler 37°C'deki su banyosundan alınan Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen fosfat tuz solüsyonu (PBS) ile yıkama işlemi gerçekleştirildi.

Bu işlemden sonra PBS uzaklaştırıldı ve flaskta bulunan bütün hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde % 0,05 tripsin-EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) solüsyonu eklendi ve 3-4 dakika 37°C'deki % 5'lik CO₂ içeren inkübatörde bekletildi.

İnkütabörden çıkarılan hücrelerin mikroskop altında yüzeyden kalktığı gözlemlendikten sonra, daha önceden hazırlanmış olan %10 FBS, % 1 L-glutamin ve % 0,1 gentamisin içeren DMEM-high glukoz besin ortamı hücrelerin ortamına eklendi ve hücreler besin ortamı ile birlikte santrifüj tüpüne alındı.

+4°C'deki soğutmalı santrifüj cihazında 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst kısımdaki sıvı uzaklaştırıldı ve hücreler daha önceden hazırlanmış olan % 90 FBS- % 10 DMSO ile süspanse hale getirildi.

Son olarak 1:3 seyreltme oranında 1 ml HUVEC hücresi içeren ortam kriyo tüp içerisinde -196°C'deki sıvı azot tankında stoklandı.

3.6.5.4. BS örnekleri ile *in vitro* hücre kültürü denemeleri

Daha önceden steril edilmiş, +4°C'de muhafaza edilen ve damar modelindeki ağsı gözenek yapısı modifikasyonu yapılmış BS örneklerinin HUVEC hücreleri ile *in vitro* hayvan hücre kültürü denemeleri gerçekleştirildi.

İzlenen protokol şu şekildedir:

BS membranları DMEM-high glukoz içeren şartlanma ortamına yerleştirilip 37°C'deki % 5'lik CO₂ içeren inkübatörde 2-3 saat bekletildi.

37°C'deki % 5'lik CO₂ içeren etüvde inkübe edilen HUVEC hücrelerini içeren flastaki besin ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler 37°C'deki su banyosundan alınan Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen fosfat tuz solüsyonu (PBS) ile yıkama işlemi gerçekleştirildi.

PBS ile yıkamadan sonra hücrelerin üzerine % 0,05'lik tripsin-EDTA eklenerek 37°C'deki % 5'lik CO₂ içeren inkübatörde 3-4 dk bekletildi.

Hücreler inkübatörden çıkarıldıktan sonra ışık mikroskobu altında hücrelerin tüm yüzeyden kalktığı gözlemlendikten sonra laminar akışlı kabine alındı.

Hücrelerin üzerine 4-5 ml serumlu besi ortamına eklendi ve flasktaki serumlu besin ortamıyla birlikte hücreler santrifüj tüpüne alındı.

Hücreler, +4°C'deki soğutmalı santrifüj cihazında 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve üst sıvı kısmı uzaklaştırıldı.

Santrifüj tüpünün dibinde kalan hücre pelleti hafifçe vurularak yüzeyden kaldırıldı ve üzerine taze besi ortamı eklendi.

2 ml ependorf tüpe 900 µl HUVEC hücresi besi ortamı ve üzerine 100 µl Tripan Blue boyası eklenerek pipet ile homojenize edildi.

Hemasitometri (IsoLab) sayım için lam ve lameli alkol ile temizlendi.

Eppendorfta hazırlanan hücre içeren tripan blue solüsyonundan 50 µl, hemasitometrenin lam ile lameli arasından yavaşça aktarıldı ve sayım için ışık mikroskobun tablasına yerleştirildi.

10X objektif kullanılarak hemasitometrenin 8 karesindeki canlı hücre sayımı yapıldı ve mililitredeki canlı hücre sayısını belirlemek için aşağıdaki formül kullanılarak hesaplama yapıldı.

$$\frac{\text{Sayılan hücre miktarı} \times \text{dilüsyon oranı} \times 10^4}{8} = \text{Canlı hücre yoğunluğu (hücre sayısı/ ml)}$$

Ortam şartlanmasına bırakılan BS membranları laminar kabine alındı ve BS membranın damar ağsı yapılarına 10^6 hücre/ml olacak şekilde mikro enjektörle HUVEC verildi.

BS membranının damar ağsı yapısında bulunan hücrelerin, floresan ışık mikroskobu altında ölü/canlı boyama kiti ile analizinin yapılması için 37°C'deki % 5'lik CO₂ içeren inkübatörde 2 gün inkübasyona bırakıldı.

Boya stok solüsyonların hazırlanması

-20°C'de ve karanlıkta tutulan boyama kitin bileşenleri (Calcein AM ve EthD-1) oda sıcaklığına getirildi ve santrifüj edildi.

4 µM'lik EthD-1 solüsyonu hazırlamak için 2 mM'lik EthD-1 stok solüsyonundan 20 µl, 10 ml PBS içine konuldu ve vortekslendi.

Hazırlanan bu solüsyona 4 mM'lik Calcein AM stok solüsyonundan 5µl konuldu ve karışım vortekslendi. Böylece 2 µM'lik Calcein AM içeren 4 µM'lik EthD-1 solüsyonu elde edildi.

BS örneklerine Live/Dead boyama protokolün uygulanması

37°C'deki %5'lik CO₂ içeren inkübatörde 2 gün inkübasyona bırakılan HUVEC hücreleri içeren BS membranın üzerindeki besin ortamı PBS ile uzaklaştırıldı.

Daha önceden hazırlanan L/D boya stok solüsyonu insülin iğnesi ile HUVEC hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde BS membranın damar ağı yapılarına enjekte edildi.

Hazırlanan örnek oda sıcaklığında 30-45 dk inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra BS membranların üzeri bir miktar PBS ile yıkandı.

BS membranın damar ağı yapılarındaki HUVEC hücrelerin ölü/canlı boyama kiti ile analizi için floresan ışık mikroskobu (Vert.A1 ZEISS AX10, Almanya) altında gözlem yapıldı.

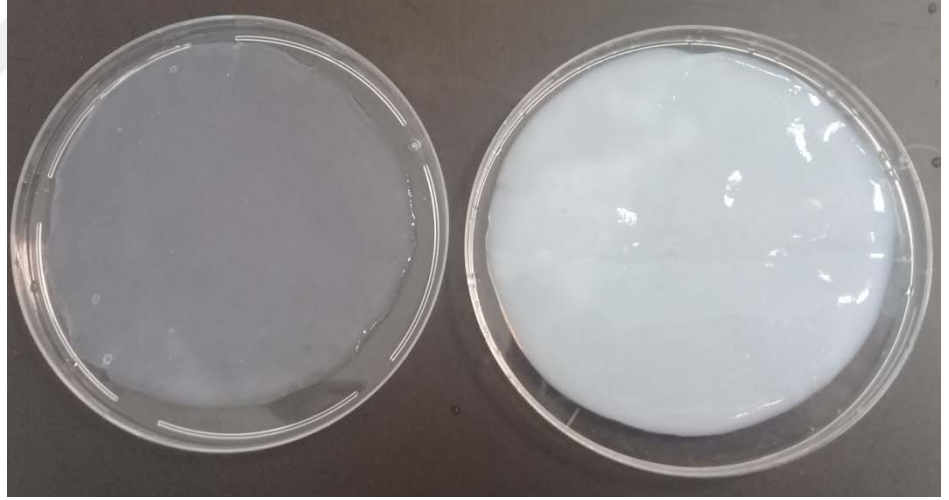
4. BULGULAR

4.1. 3B PLA Kalıbın Çizimi ve Basımı

SOLIDWORKS 2017 (DS-Dassault Systems) çizim programı kullanılarak çizilen belirlenen damar modelindeki yapı, 3B yazıcı ile 3B PLA kalıbı olarak başarılı şekilde basıldı.

4.2. BS Üretimi Açısından Mikroorganizma Suşlarının Karşılaştırılması

Bu tez çalışması kapsamında *G. xylinus* ATCC 70078 ile *G. xylinus* NRRL B-759 suşları kullanıldı. Aynı koşullar altında *G. xylinus* NRRL B-759 suşunun ürettiği BS membranı *G. xylinus* ATCC 70078 suşunun ürettiği BS membranından daha kalın olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1). İçine 3B PLA kalıbın BS buradan sonraki çalışmalarda *G. xylinus* NRRL B-759 suşunun kullanılmasına karar verildi.



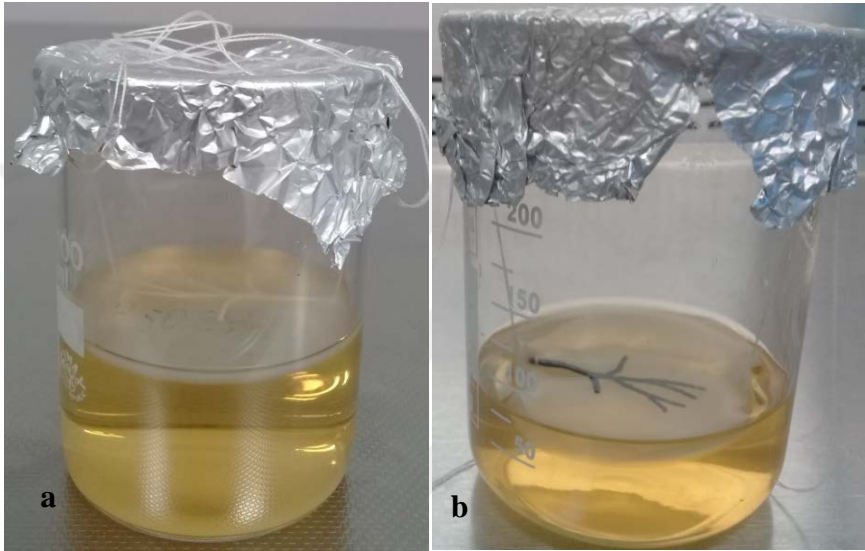
Şekil 4.1: *G. xylinus* ATCC 70078 (solda) ve *G. xylinus* NRRL B-759 (sağda) suşları tarafından aynı koşullar altında üretilen saf BS membranların görüntüsü

4.3. *In Situ* BS/PLA Biyokompozit Üretimin Optimizasyonu

G. xylinus aerobik bir bakteri olduğu için statik üretim koşullarında oksijenin daha çok olduğu besiyerinin sıvı-hava yüzeyine yakın bölgede bulunmakta ve üretilen selüloz nanofibrilleri de sıvı yüzeyin hava ile temas ettiği bölgede yer almaktadır (de Oliveira Barud et al., 2016). Bu nedenle PLA kalıbın

HS besin ortamının hava ile temas ettiği sıvı-hava arayüzey alanında kalacak şekilde yerleştirilmesi için denemeler yapıldı. PLA kalıp BS ortamına bırakıldığında dibe çöktüğü için kalıbın her iki ucu ipe bağlanarak üretim kabının dışından yüksekliğinin ayarlanabilmesi ve kalıbın dibe çökmesi engellendi.

In situ BS/PLA biyokompozit üretimi için PLA kalıp BS ortamına aseptik koşullarda yerleştirildikten 3-4 gün sonra BS membranının PLA kalıbın üst yüzeyini kaplayacak şekilde üretildiği gözlemlendi (Şekil 4.2a,b).



Şekil 4.2: *In situ* BS üretim ortamına yerleştirilen **a)** beyaz ve **b)** siyah renkli 3B PLA kalıbın üst yüzeyini BS membranı ile kaplanması görüntüleri

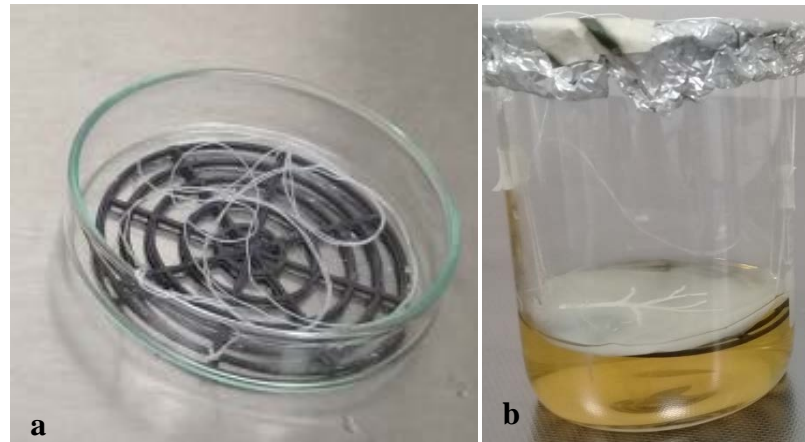
Üretilen BS membranının PLA kalıbın üzerini kapladığı 7-9 gün sonra inkübasyon sonlandırıldı. Üretim sonucunda BS membranının nanofibrillerinin, PLA kalıbın üst yüzeyini kaplamada yeterince etkin olmadığı gözlemlendi.

3B PLA kalıbın iki yüzeyinin selüloz nanofibril yapılarıyla tamamen kaplanması için *in situ* BS/PLA biyokompozitin üretiminin 3-4 günden sonra aseptik koşullarda BS/PLA biyokompozitin ters çevirme işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem sırasında PLA kalıbın bağlı olduğu ip sisteminin kesildiği ve kesilmediği deneme çalışmaları yapıldı. İp sisteminin kesildiği BS/PLA biyokompozitin dibe battığı gözlemlenirken ipin bağlı olduğu üretimlerde BS/PLA biyokompozitin yüzeyde konumunu koruduğu gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: *In situ* BS/PLA biyokompozitin üretim sürecinde BS/PLA biyokompozitin ters çevirme işlemin görüntüsü

BS/PLA biyokompozitin üretim sürecinde ters çevirme işleminden sonra üretime devam edilirken BS membranının sıvı-hava arayüzeyinde olması için yüksekliği ip sistemi ile ayarlanmasına rağmen üretilen BS çok esnek olduğundan tüm membranın sıvı-hava arayüzeyinde yerleşmesi düzgün bir şekilde gerçekleşmediğinden elde edilen son ürünün homojen olmadığı ve katmanlar içerdiği belirlendi. Bu aşamada üretilen BS membranı alttan destekleyecek ve üretim kabına (beher 250 ml) yerleştirilecek 6 cm çapında ve 1 mm kalınlığında 3B yazıcı ile oluşturulmuş bir iskele yerleştirildi. Bu şekilde yapılan üretimlerde iskelenin BS membranını düzgün bir şekilde sıvı-hava yüzeyinde tuttuğu üretilen BS membranının homojen ve kompakt bir yapısı olduğu yapılan denemeler sonucunda gözlemlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: a) Üretim ortamına yerleştirilen iskele, b) İskele kullanılarak *in situ* BS membranının üretim süreci

Üretim sırasında 3-4. günden sonra BS membranın aseptik koşullarda ters çevrilmesi işlemi aşamasında membranın sıvı yüzeye bakan kısmındaki gevşek selüloz nanofiberlerinin bir spatül yardımı ile temizlenmesi durumunda bu yüzeyde oluşan BS membranın PLA kalıbı tam olarak kaplanmadığı ve bu yüzeyde oluşan membranın üretim sonrası ayrıldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).

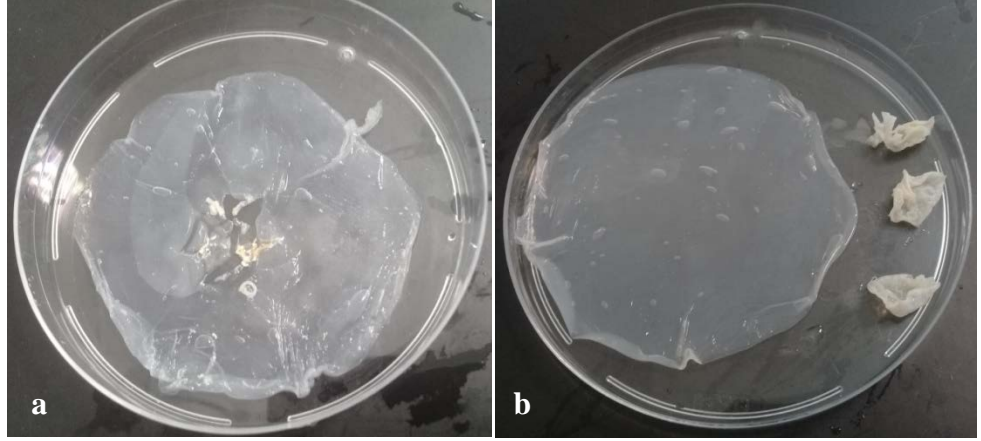


Şekil 4.5: Gevşek selüloz nanofiberler temizlenmeden yapılan üretim sonrası iki katmanlı üretim

4.4. PLA Kalıbın BS Membrandan Uzaklaştırılması

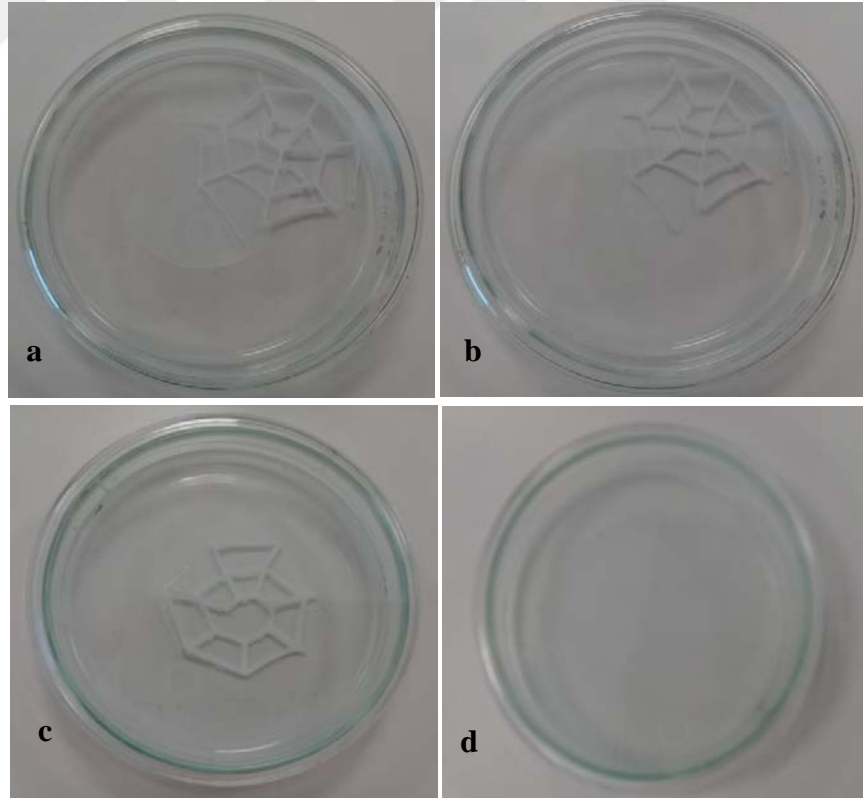
BS membranın üretim sonrası hücre ve besin artıklarından temizlenmesi için yıkama işlemi 0,1 M NaOH kaynatma ve ardından nötralize olana kadar destile su ile duruluma işlemine dayanmaktadır (Bilgi et al., 2016; Keskin et al., 2017). Ancak bu tez çalışması kapsamında *in situ* BS membranın ayrıca üretim sırasında içine yerleştirilen 3B PLA kalıptan da temizlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla NaOH'ın belli derişimleri, kloroform ve aseton içeren yıkama işlemleri gerçekleştirildi.

İlk aşamada literatürde de yer alan BS yıkama işleminde kullanılan NaOH farklı derişimleri (0,1, 0,5, 1, 1,5 ve 2 M) kullanıldı. Ancak bu denemlerde BS membranından PLA malzemesinin parçalanarak uzaklaştığı için oluşan damar modelindeki gözenekli yapıya zarar verdiği gözlemlendi. 2M derişimdeki NaOH ile yıkamada ise BS membranın nanofibril yapılarının bozulduğu membranın yıkama işlemi sonrası boyutunun oldukça küçüldüğü belirlendi (Şekil 4.6).



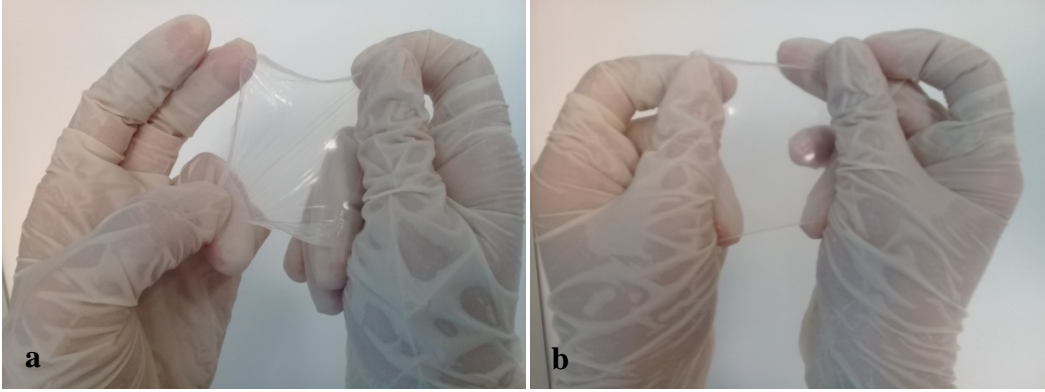
Şekil 4.6: a) BS membranın 0,5 M NaOH ile yıkanması sonrası PLA kalıp uzaklaştıktan sonraki parçalanmış görünümü b) 2 M derişimde NaOH ile yıkama sonrası küçülerek buruşan BS membranlar ile normal BS membranı

PLA kalıbın aseton ve kloroform içerisindeki çözünme durumlarını test etmek için bu iki çözgen ile yapılan denemelerde asetonun içindeki PLA kalıbı kloroform içine göre daha yavaş çözüldüğü gözlemlendi (Şekil 4.7)



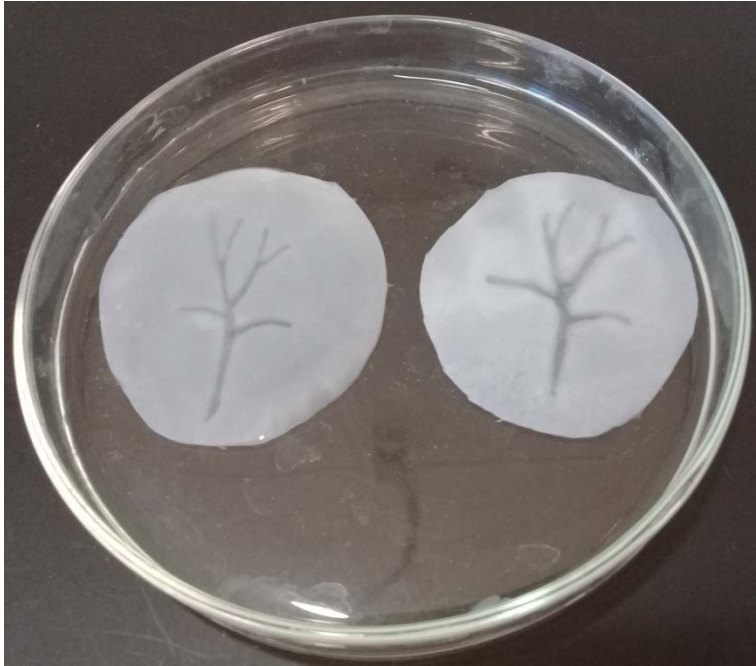
Şekil 4.7: a) PLA kalıbın asetonun içerisinde 0. dk ve b) 45. dk görüntüsü, c) PLA kalıbın kloroform içerisindeki 0. dk ve d) 25. dakikadaki görüntüleri

Kloroform ve aseton çözümlerinin içinde bekletilen BS membranların morfolojik yapısında ve mekanik dayanımında belirgin bir zarar oluşmadığı gözlemlendi (Şekil 4.8).



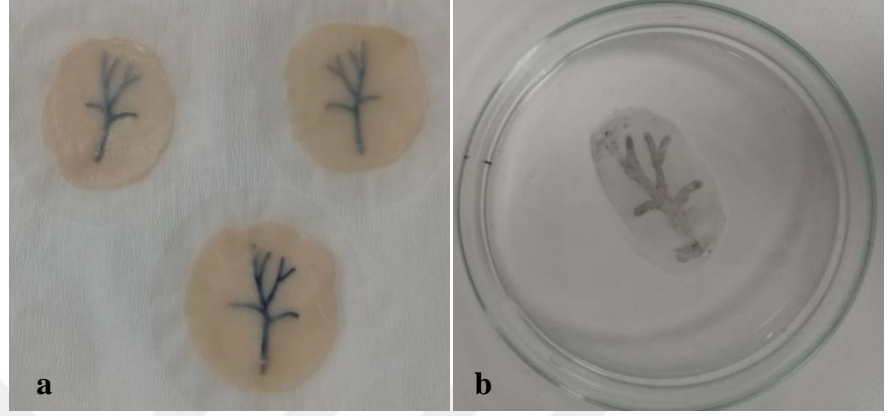
Şekil 4.8: a) BS membranın kloroform içerisine konulmadan önceki ve b) BS membranın 45 dk kloroform içinde bekletildikten sonraki görüntüsü

İlk aşamada kloroform ardından NaOH kullanılarak uygulanan yıkama prosedürü ile BS membranının makro yapısına ve görünümüne zarar vermeden hem hücrel ve besin artıklarının hem de PLA kalıbının uzaklaştırılması başarılı şekilde gerçekleştirildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Optimize edilen BS yıkama prosedüründen elde edilen damar ağı yapısına sahip BS membranının görüntüsü

Bu tez çalışması sürecinde damar ağsı modelinde beyaz ve siyah renge farklı iki ayrı 3B PLA kalıbı ile denemeler gerçekleştirildi. Siyah rengeindeki PLA malzemesinin yıkama sürecinde aynı şartlar altında etkili bir şekilde uzaklaştırılmadığı gözlemlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: a) Siyah PLA kalıbı kullanılarak BS/PLA biyokompozitin fazla nemin alınması için filtre kağıdı üzerinde ve b) Optimize edilen yıkama prosedüründen sonraki BS membran görüntüsü

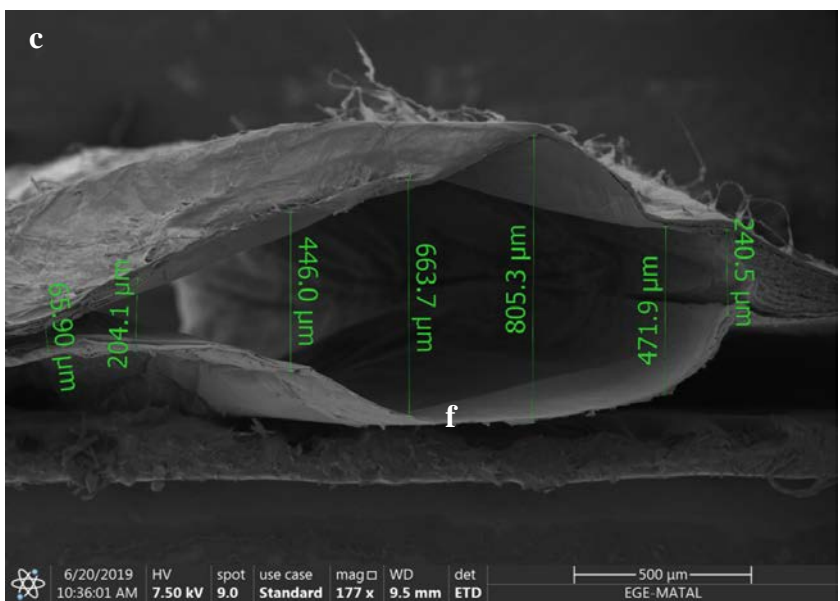
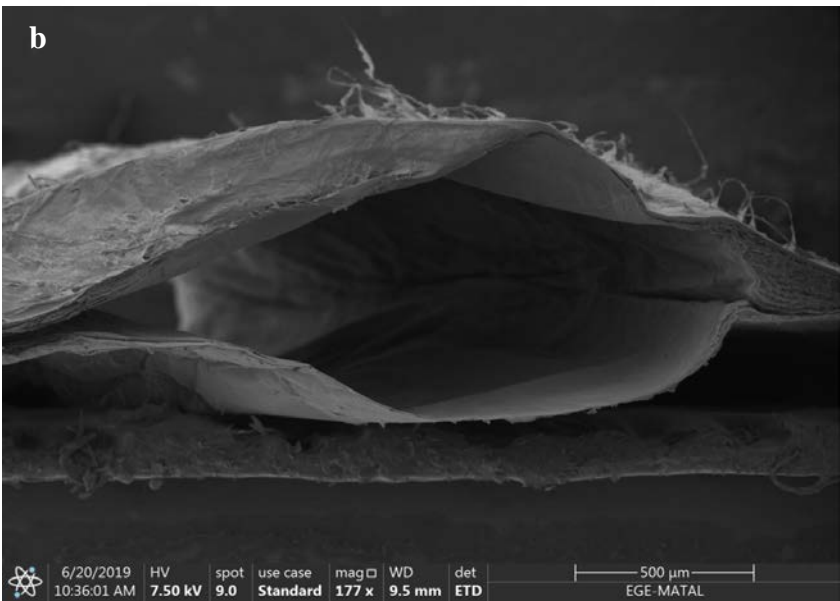
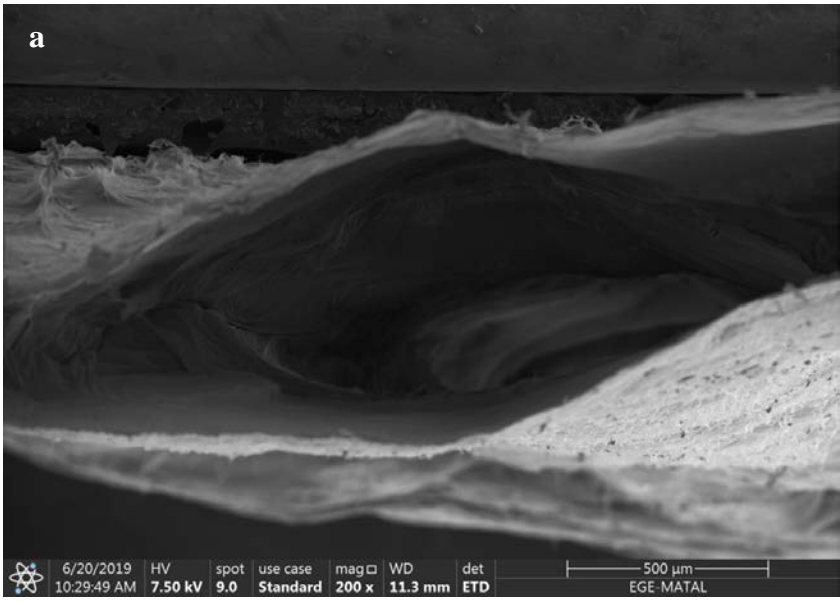
4.5. Karakterizasyon İşlemlerinin Sonuçları

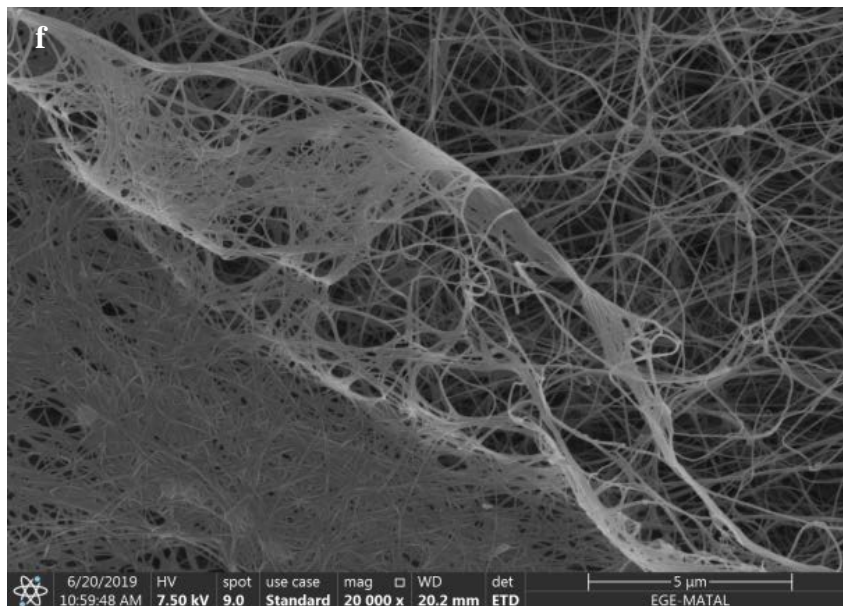
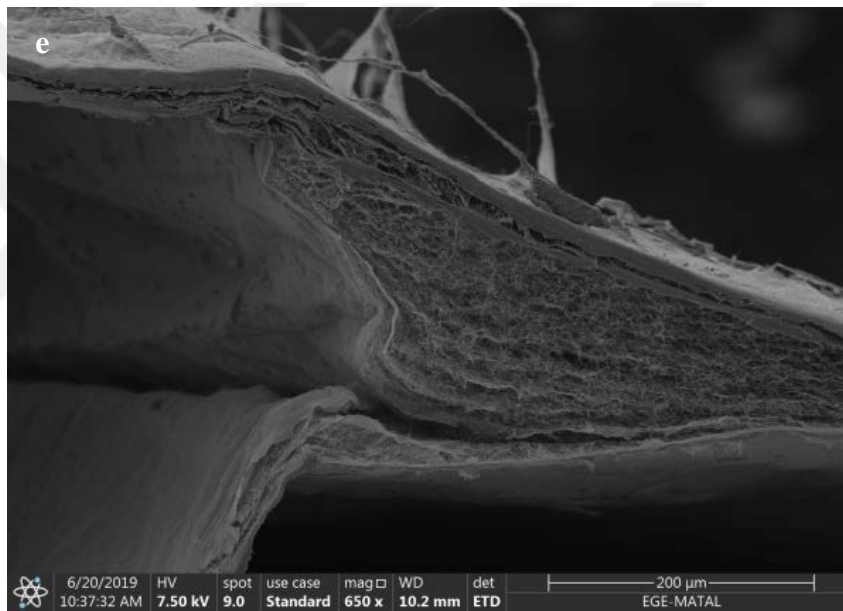
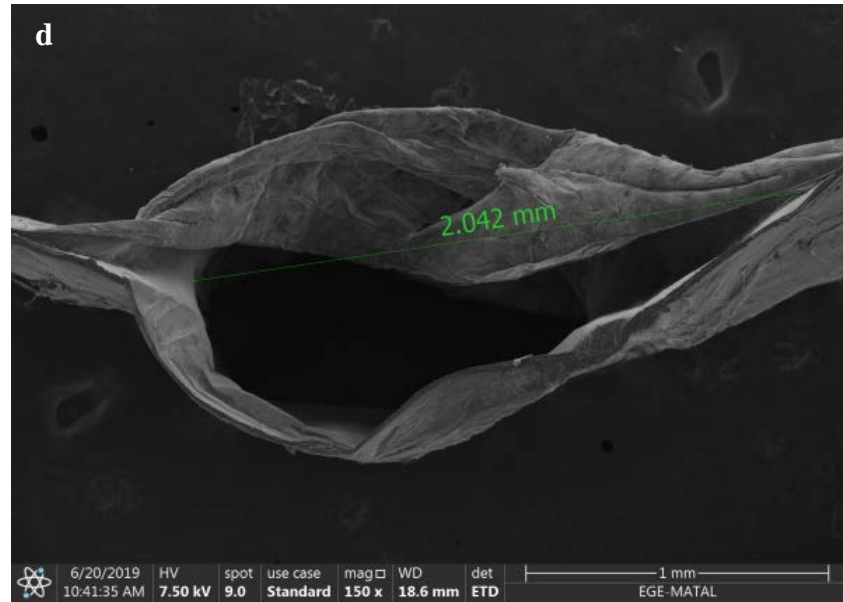
Bu tez kapsamında hedeflenen damar ağsı modelindeki gözenek modifikasyonu için optimize edilen *in situ* BS ve yıkama prosedürü sonucunda elde edilen BS membranların karakterizasyon testlerin bulguları elde edildi.

4.5.1. SEM analizi

PLA kalıbın BS membranından kloroform ve ardından NaOH ve destile kaynatma işlemine dayanan ön yıkama prosedüründen sonra BS membranında oluşan damar modelindeki kanalların boyutları 0.4-2 mm arasında değiştiği yapılan SEM analizi gösterildi (Şekil 4.11a,b,c ve d). BS membranın 3B PLA çıktıktan sonra alt ve üst yüzeyinin birleşimi SEM görüntüleri ile gösterilmiştir (Şekil 4.11e).

Ayrıca SEM analizi ile BS membranın 3B nanofibrilleri de incelendi. Kloroform ile BS membranın yıkama prosedürünün, BS'nin 3B nanofibrillerine zarar vermediği alınan görüntülerle gösterilmiştir (Şekil 4.11f).





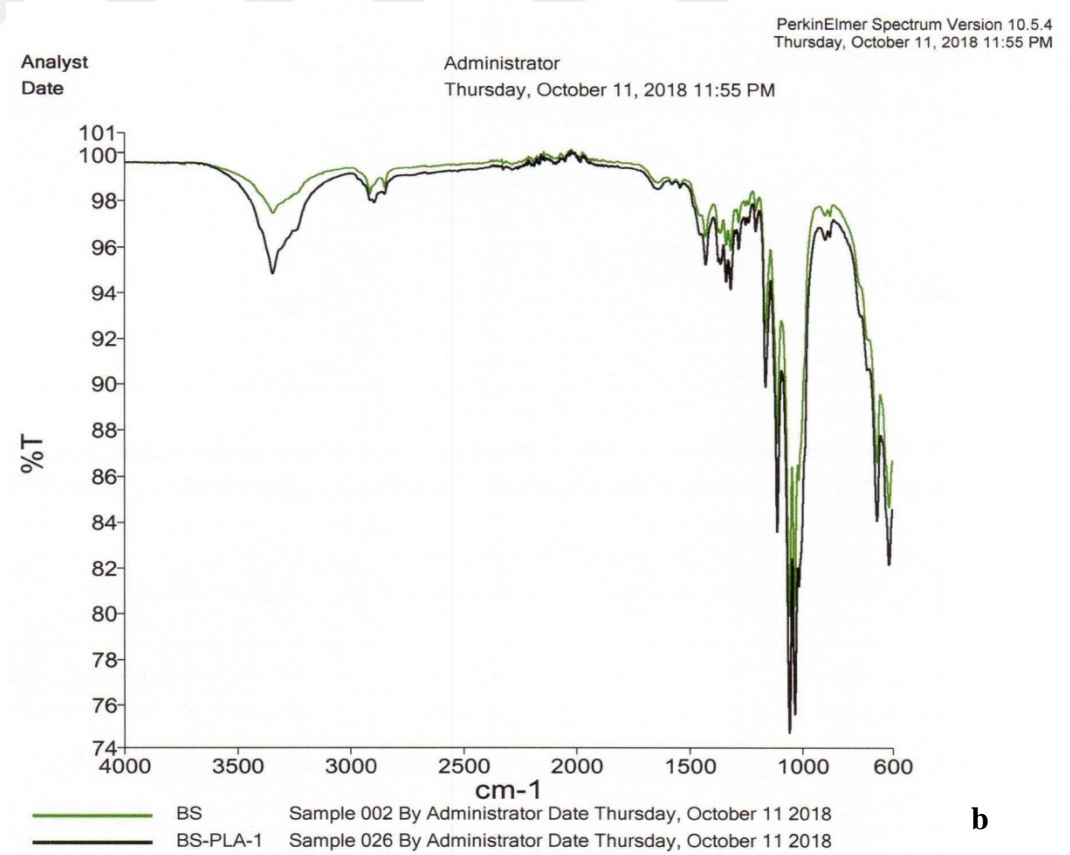
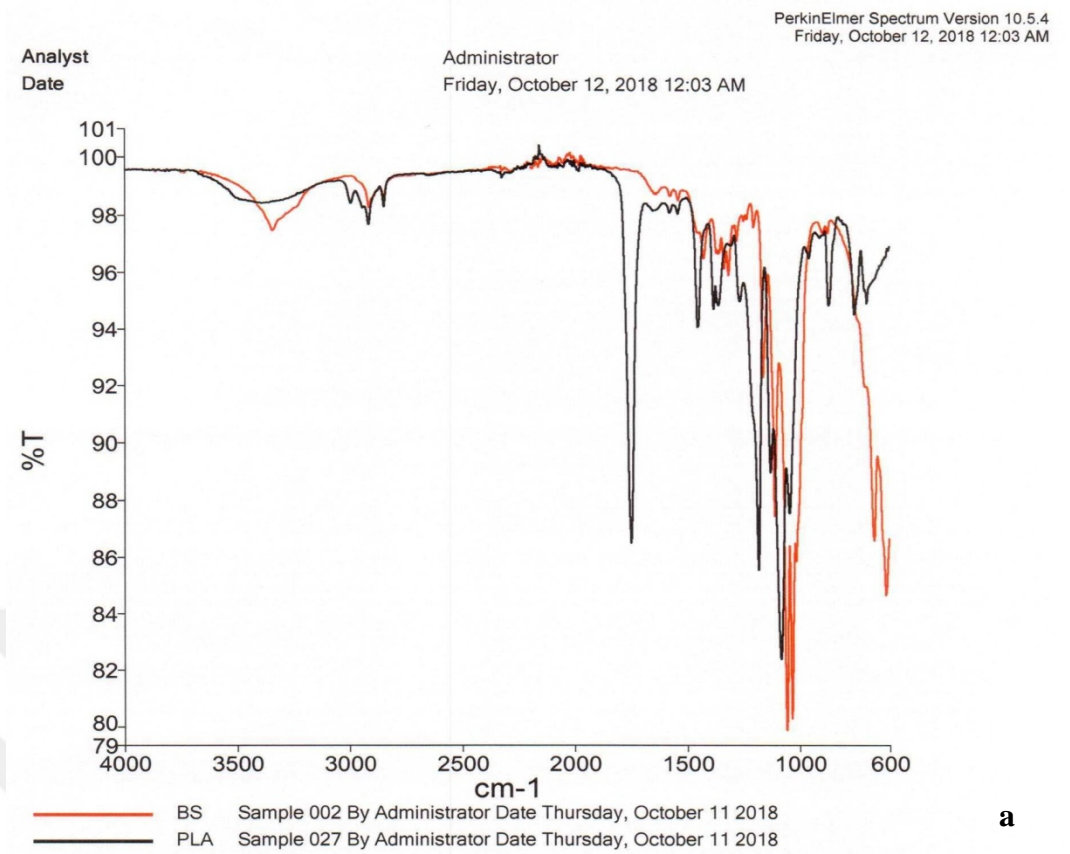
Şekil 4.11: a, b) BS membranında oluşan damar modelindeki gözeneklerin SEM görüntüleri, c,d) SEM analizi ile görüntülenen gözeneklerin boyutları, e) BS membranın PLA alt ve yüzeyinde birleştiği yerde oluşturduğu katman ve f) kloroform ile yıkama sonrası BS membranın 3B nanofibril morfolojisini gösteren SEM görüntüsü

4.5.2. ATR-FTIR spektrumu

Saf PLA malzemesinin $4000-600\text{ cm}^{-1}$ bölgesindeki ATR-FTIR spektrumu grafiğinde dalga sayısı pikleri: $\text{-C} = \text{O}$ eğilme (1748.38 cm^{-1}), -CH_3 bending (1453.62 cm^{-1}), $\text{-C} - \text{O} - \text{C}$ gerilme (1181.30 cm^{-1}), $\text{-C} - \text{O-}$ gerilme ($1081,63\text{ cm}^{-1}$), -OH eğilme (1043.71 cm^{-1}) ve amorf ve kristal fazlara atfedilen $\text{-C} -$ gerilme (sırasıyla 870.65 , 755.73 ve 700.13 cm^{-1}) olarak okunmuştur.

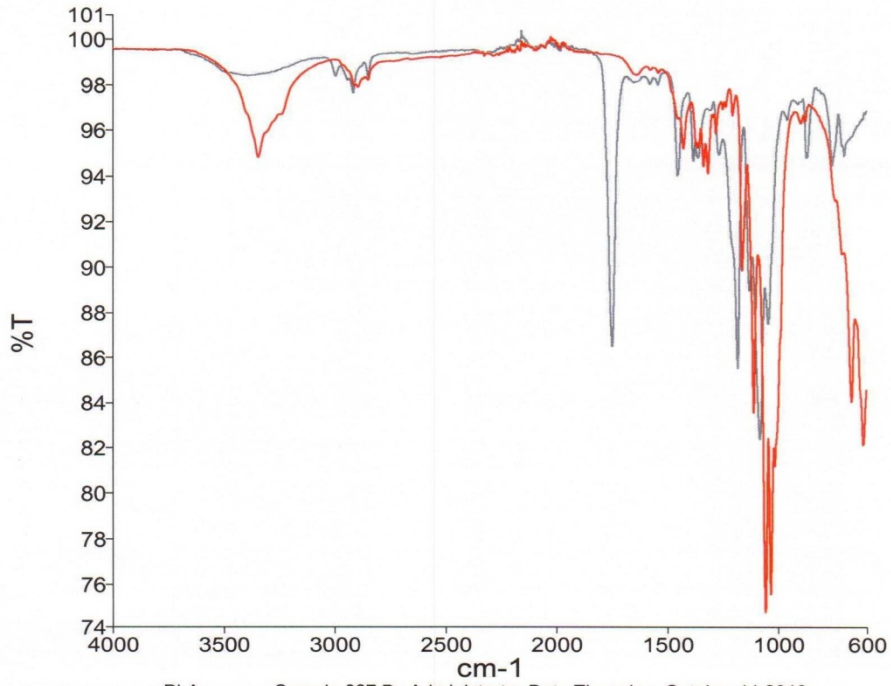
Saf BS membranı için ATR-FTIR spektrumu dalga sayısı pikleri -OH gerilme (3344.13 cm^{-1}), -C-C , C-OH halka (sırasıyla 1056.04 , 1033.81 cm^{-1}) ve 3B PLA kalıp kullanılarak modifiye edilen BS membranın ATR-FTIR spectrumu dalga sayısı pikleri ise -OH gerilme (3344.28 cm^{-1}), -C-C , C-OH halkaları (sırasıyla 1055.53 , 1031.83 cm^{-1}) şeklinde okunmuştur.

Yapılan ATR-FTIR analizi sonucunda saf BS membranı ile PLA arasındaki korellasyon $0,233936$ (Şekil 4.12a), PLA ile 3B PLA kalıp kullanılarak üretilen BS membranı arasındaki korellasyon $0,249728$ (Şekil 4.12b) ve saf BS membranı ile 3B PLA kalıp kullanılarak üretilen BS membranı arasındaki korellasyon $0,983566$ (Şekil 4.12c) olduğu görülmüştür. Ayrıca üç malzemenin kimyasal bağ yapıları bir arada eşleştiren ATR-FTIR spektrumu grafiği ile malzemelerin benzerlik oranlarını göstermektedir (Şekil 4.12d).



Analyst
Date

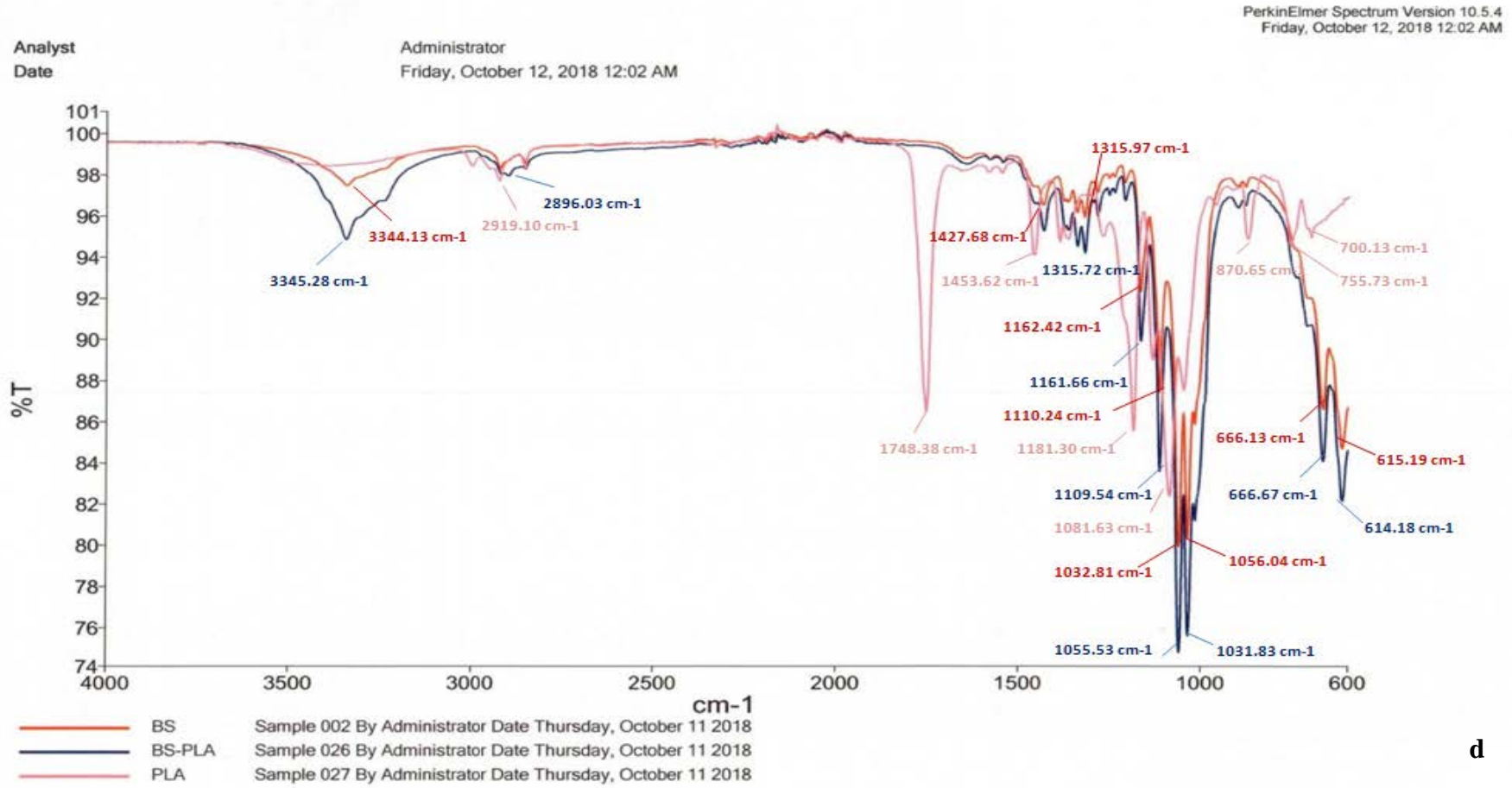
Administrator
Friday, October 12, 2018 12:00 AM



— PLA Sample 027 By Administrator Date Thursday, October 11 2018
— BS-PLA-1 Sample 026 By Administrator Date Thursday, October 11 2018

c



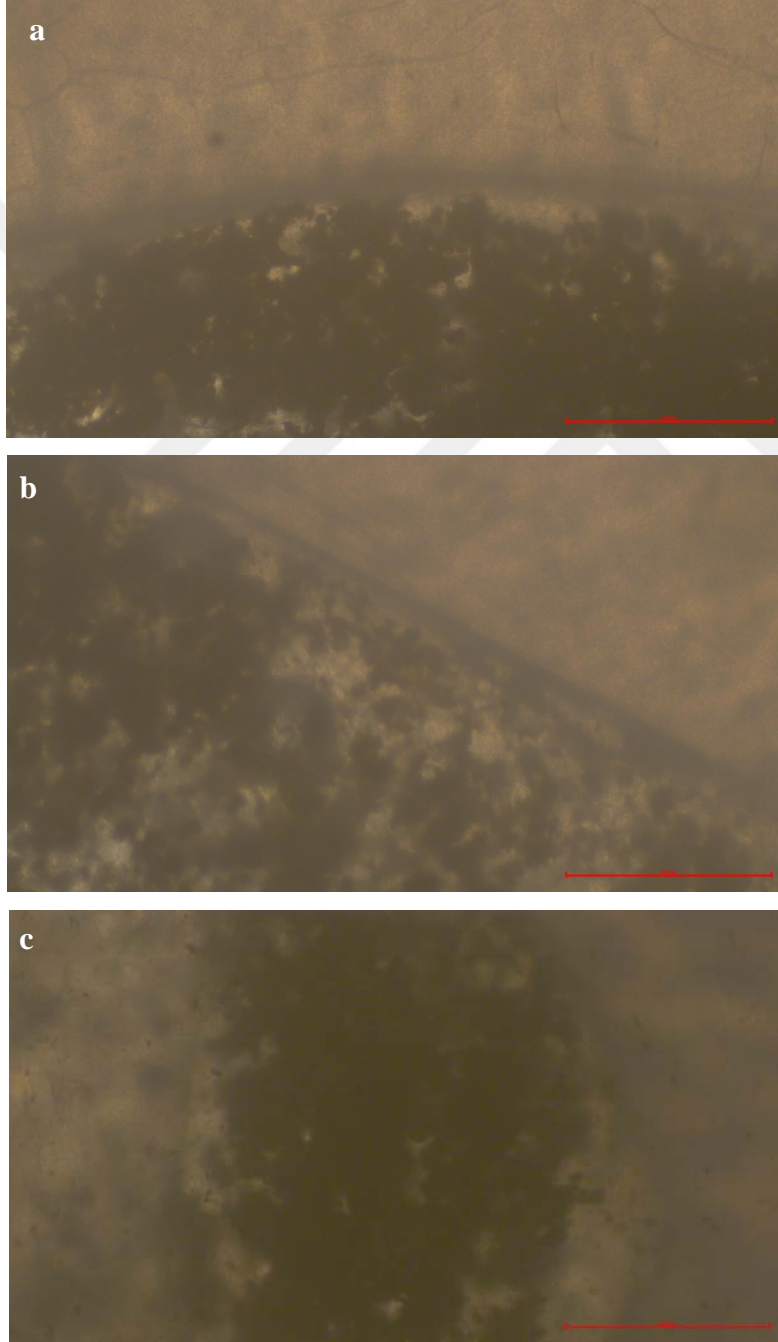


d

Şekil 4.12: ATR-FTIR sonuçları: a) BS ile PLA, b) BS ile BS/PLA, c) PLA ile BS/PLA, d) BS, PLA ile BS/PLA grafikleri

4.5.3. Işıık mikroskobu analizi

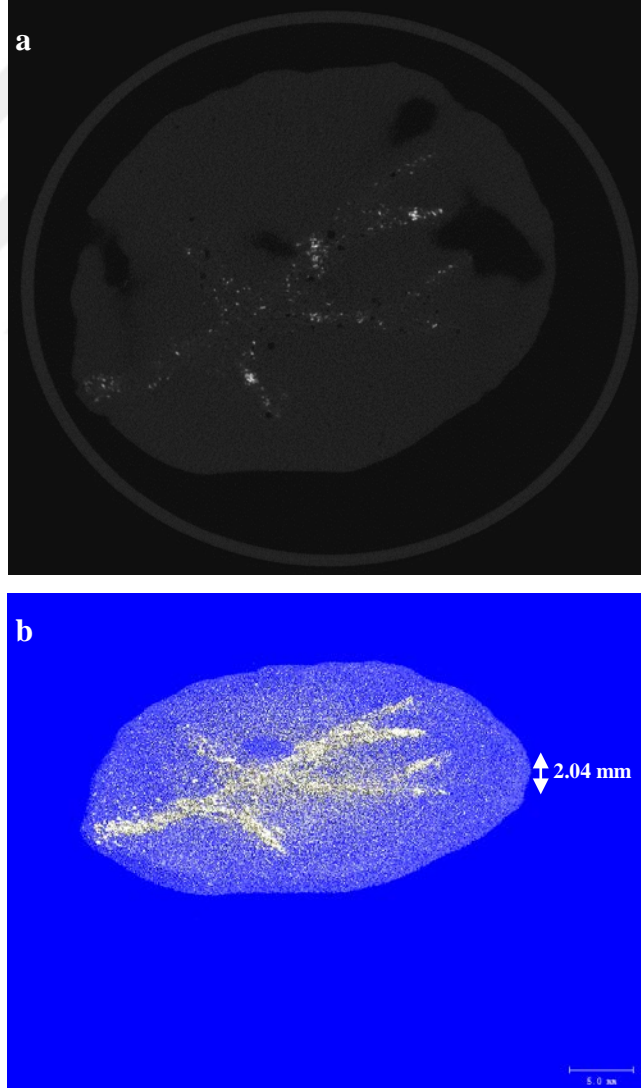
Demir tuzu (FeCl_2) ile hazırlanan çözeltili, oluşturulan damar modelinde kanallara aktarıldıktan sonra örnekler ışık mikroskobuna (OLYMPUS) yerleştirilerek 10X objektif ile gözlem yapıldı ve fotoğraflandı (Şekil 4.13). Demir tuzu BS içerisinde oluşan kanalların daha belirgin bir şekilde gözlenmesini sağladı.



Şekil 4.13: a,b ve c) BS membranına demir tuzu (FeCl_2) yüklemesinden sonra ışık mikroskobunda 20 μm skalasındaki görüntüleri

4.5.4. Micro-CT analizi

Bu analiz için 3B PLA kalıp kullanılarak damar ağısı yapı modifikasyonu yapılan BS membranında oluşan kanal yapılarına demir tozu ($<300\mu\text{m}$) yüklendi. Mikro-CT cihazına yerleştirilen ve demir tozu içeren BS membranın görüntülerini elde etmek için örneğin 360° lik rotasyonuyla X-Ray ışınlarına 14.3 dakikalık maruz kalma süresi ile gerçekleştirildi. Micro-CT analizi ile örnekten alınan 2B kesit görüntüleri (TIFF) (Şekil 4.14a) oluşturuldu. Elde edilen 2B kesit görüntüleri μCT Evaluation Programı (V6.5, Scanco Medical, İsviçre) ile işlenerek örneğin 3B analizleri gerçekleştirildi (Şekil 4.14b). Ayrıca, micro-CT analizi sonucunda hazırlanan BS örneğin kalınlığı 2.04 mm olarak ölçüldü.

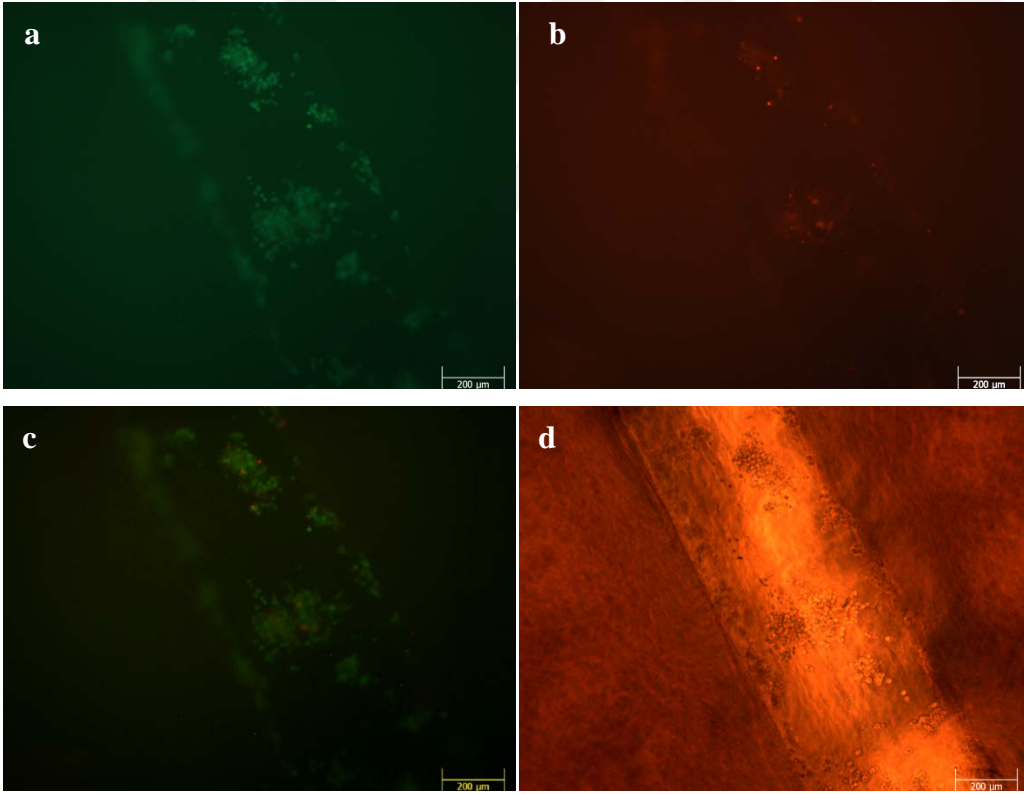


Şekil 4.14: a) Micro-CT cihazında demir tozu içeren BS örneğinden alınan bir kesitin ve b) örneğinin 3B modelinin görüntüleri

4.5.5. *In vitro* hayvan hücre kültürü denemeleri

Floresan ışık mikroskopunda 10X objektif ile incelenen BS membranının damar modelindeki kanallarında FITC ile işaretli (yeşil) HUVEC hücrelerin (canlı hücreler) oranı (Şekil 4-15a) EtBr ile işaretli ölü hücrelerin oranından (kırmızı) (Şekil 4-15b) çok daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4-15c).

Işık mikroskobu altında BS membranında oluşan damar modelindeki kanalların boyutları, HUVEC hücrelerin oluşan kanal yapılarına göçüne, tutunmasına ve çoğalmasına sağlayacak şekilde yeterince büyük olduğu gözlemlendi (Şekil 4-15d).



Şekil 4.15: BS membranının damar ağı yapılarındaki HUVEC hücrelerin floresan ışık mikrobundaki a) 10X-FITC (green), b) 10X-red, c) 10X-fix ve d) 10X-ışık mikroskobu görüntüleri

5. TARTIŞMA

Yara bakım ürünleri, dış enfeksiyonlara karşı bir bariyer oluşturarak yarayı korumalı, yara bölgesinde nemli ve sıcak bir ortam sağlamalı, eksüdayı emme kabiliyeti göstermeli ve yara iyileşmesinden sonra kolaylıkla uzaklaştırılabilme gibi özellikleri taşımalıdır. Geleneksel deri dokusu onarım malzemelerinin en önemli dezavantajları deriye sıkı şekilde yapışması ve değişim sırasında deride ciddi travmalara neden olmasıdır (Lin and Dufresne, 2014; Paul and Sharma, 2015). Piyasada bulunan mevcut aktif yara bakım ürünlerinin çoğu neovaskülarizasyonu sağlayamadıkları için yara iyileşmesinde çok etkin çözüm yaratamamaktadır. Ancak piyasada bulunan bazı aktif yara bakım ürünleri neovaskülarizasyonu sağlamakla birlikte maliyetlerinin çok yüksek olmasından dolayı kullanımları kısıtlanmaktadır (Paul and Sharma, 2015).

Bir dehidro-termal işleme çapraz bağlanmış liyofilize kollajen sünger tabakasından oluşan TeruDermis™ (Olympus Terumo Biomaterials Corp.) deri ikamesinin, yapılan *in vivo* çalışmalar ile anjiyogenezi geliştirmeye yönelik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak bu ürünün dezavantajı, raf ömrünün kısa olmasıdır (Soejima et al., 2006). Rekonstrüktif doku matrisinden oluşan Strattice™ (LifeCell Corp.) deri ikamesi ise hızlı revaskülarizasyon ve hücre çoğalmasını sağlaması gibi avantajlara sahip olmasına rağmen asellüler bir yapıda olması bu ürünün en büyük dezavantajlarından biridir (Paul and Sharma, 2015).

Önemli biyolojik özellikleri göz önüne alındığında, yara bakımı ürünleri için BS bazlı ürünlere olan ilgi giderek artmaktadır (Lin and Dufresne, 2014). BS bazlı yara örtüleri ve deri ikameleri, yapılan araştırmalarda *in vivo* ve histolojik incelemelerin sonucunda ticari deri ikamelerine göre daha hızlı yeni doku rejenerasyonunu ve yara bölgesinde belirgin kapiller oluşumunu desteklediği gösterilmiştir (Fu et al., 2012; Fu et al., 2013).

Bu tez çalışması ile literatürde yer alan bilgiler doğrultusunda piyasada bulunan deri ikamelerinin dezavantajlarından biri olan neovaskülarizasyona dikkat çekerek BS biyomalzemesinin yeni modifikasyon tekniğiyle hücre göçüne

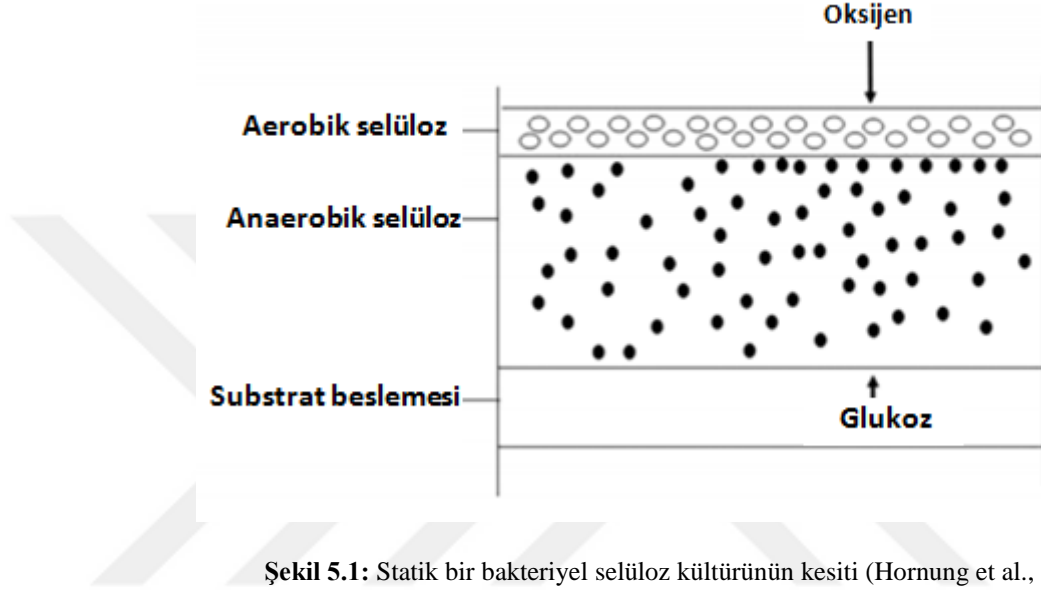
ve neovasülarizasyona imkan sağlayacak yeni deri ikamesi olma potansiyeli sağlayabilmesi hedeflendi.

Bu kapsamda 3B damar modelinde üretilen PLA kalıbı kullanılarak damar oluşumu için gerekli kanalları içeren *in situ* BS üretimi gerçekleştirilmiştir. Modifiye BS membran üretimi için farklı yöntem ve teknikler denenmiştir.

İlk aşamada PLA kalıbı oluşturulmuştur. Bunun için farklı PLA çeşitleri incelenmiş, istenilen kalınlık ve şekilde olabilecek şekilde birçok ön üretim denemesi yapılmıştır. Ardından iki farklı bakteri suşu (*G. xylinus* ATCC 70078 ve *G. xylinus* NRRL B-759) kullanılarak üretim yapılmış ve aynı şartlar altında bu mikroorganizmaların ürettiği BS membranların farklı olduğu yapılan denemeler sonucunda gözlemlenmiştir. *G. xylinus* NRRL B-759 suşunun ürettiği BS membranı daha kalın ve hızlı bir şekilde üretilmektedir. İçerisine PLA kalıbı yerleştirileceği için ilerleyen çalışmalara NRRL B-759 suşu ile devam edilmesine karar verilmiştir. Ancak bu tez kapsamında hedeflenen damar ağsı yapısına sahip BS membranın üretimi için iki mikroorganizma ile de olumlu sonuçlar alınmıştır.

3B yazıcı ile üretilen PLA damar modelinin, BS üretimi sırasında (*in situ*) membranın içerisine gömülmesi için yapılan ilk denemelerde PLA'nın alt yüzeye bakan kısmının BS ile kaplanmadığı gözlemlendi. Bunun üzerine iki aşamalı üretim yapılmasına karar verildi. BS membranı içerisine bir yüzeyden gömülen PLA kalıbının tamamen BS ile kaplanması için üretimin 3-4. gününden sonra aseptik koşullarda üretilen BS membran ters çevrildi. Bu şekilde mikroorganizmanın 3B nanofibril selüloz üretimini PLA'nın açıkta kalan yüzeyinde üretmeye devam ederek istenilen biyokompozit malzemenin elde edilmesi hedeflendi. Aerobik bir bakteri olan *G. xylinus* tarafından statik kültürde BS üretimi sıvı-hava arayüzeyinde gerçekleşmektedir (Hornung et al., 2006). Bu nedenle damar modelinde boşluklar içeren *in situ* BS membran üretiminde PLA kalıbın sıvı-hava arayüzeyinde kalması için ip ile kontrol işlemi yapılmış ve ip sisteminin tüm membranı sıvı yüzeyinde düzgün şekilde tutmada yeterli gelmediği gözlemlenmiştir. Bunun üzerine yine 3B yazıcı ile oluşturulan bir PLA iskele, üretimin ikinci aşamasında yani ters çevirme işlemi sırasında besiyeri ortamına aseptik koşullarda yerleştirilerek üretilen BS membranının tüm yüzeyi alt taraftan desteklenerek üretime devam edilmiştir.

Ancak nihai ürün iki katmanlı olmuş ve ters çevrilme sonrası sıvı yüzeye bakan kısımda üretilen BS katmanı daha önce üretilen katmanla kompakt bir yapı oluşturmamıştır. Elde edilen ürün kolaylıkla iki tabakaya ayrılmıştır. Bakteriye selüloz HS ortamın yüzeyinde sıkı 3B nanofibrillerin oluşturduğu aerobik selüloz ve ortamın içerisinde gevşek ve dağınık fibril yapısında bulunan anaerobik selülozu oluşturmaktadır (Şekil 5.1) (Hornung et al., 2006).



Şekil 5.1: Statik bir bakteriyel selüloz kültürünün kesiti (Hornung et al., 2006)

Bu sonuçlar üzerine ilk aşamada üretilen membranın sıvı yüzeye bakan kısmı hava yüzeyine çevrilmeden önce göreceli oksijence az bölgede üretilen gevşek yapıdaki BS nanofibrillerin temizlenmesi işlemi gerçekleştirilmiştir. Çünkü anaerobik selülozun varlığı istenilen BS/PLA biyokompozit malzemenin oluşumunu engellemekteydi. Bu soruna yönelik, ters çevirme aşamasında oluşan aerobik selülozdan, anaerobik selülozu ayırması işlemi gerçekleştirildi. Çünkü anaerobik selüloz, ikinci aşamada üretilen aerobik selüloz ile sıkı bağlanmamakta ve faz oluşturarak iki ayrı BS membran tabakasının oluşmasına neden olmaktadır. Klasik tek aşamalı BS membran üretimi sonrası membranın sıvı yüzeyinde yer alan bu gevşek selüloz fibrilleri içeren kısım yıkama işlemi ile uzaklaştırıldığında nihai ürün homojen olmaktadır. Ancak uyguladığımız bu yöntemde PLA kalıbın tamamen kaplanması amacıyla ters çevirme işlemi sonrası bahsi geçen gevşek nanofibrillerin yapıdan uzaklaştırılmaları gerekti. Bu nedenle gevşek fibril yapısındaki anaerobik selüloz tabakası temizlendikten sonra ters çevirme işlemi yapıldı ve 3B PLA kalıbın iki yüzeyi de başarılı bir şekilde BS membran ile

kaplandığı hem makro görünümde hem de SEM görüntüleriyle gözlemlendi. BS membran içerisine bir kalıp yerleştirilerek kanal yapısına sahip *in situ* modifikasyon işlemi ilk defa bu çalışma ile gerçekleştirildi. Bu amaç için 3B kalıp kullanılan, iki aşamalı, ters çevirme işlemi içeren bir yöntem de bu çalışma kapsamında geliştirildi.

In situ BS üretim sonrası oluşan BS/PLA biyokompozit malzemedeki 3B damar modelindeki PLA'nın uzaklaştırılması için NaOH (0.1, 0.5, 1, 1.5 ve 2. M derişimleri) kloroform ve aseton ile uygun çözügen seçimi denemeleri ve ardından yıkama optimizasyonunun gerçekleştirilmesi için denemeler yapıldı. Bu denemeler sonucunda PLA'nın BS membrandan uzaklaştırılmasında literature bilgisi dahilinde en uygun çözügen (Xiao et al., 2012) olarak kloroform seçildi.

Bu tez çalışmasında iki farklı renkte (beyaz ve siyah) PLA malzemesi ile denemeler yapıldı. Elde edilen veriler ışığında beyaz olan PLA malzemesi kloroform ile BS membranında etkili bir şekilde uzaklaşırken; siyah olan PLA malzemesi BS membranında siyah pigment kalıntıları oluşturduğu gözlemlendi. Ayrıca kloroform ile yıkama süresi de daha uzun tutulmaya çalışıldı. Sonuç olarak BS membranın morfolojik yapısına zarar verdiği de tespit edildi ve ilerleyen çalışmalarda beyaz PLA kullanıldı.

Kloroform kullanılarak BS yıkama işlemi ile 3B damar modelindeki PLA kalıbın, BS membranından başarılı bir şekilde uzaklaştığı ATR-FTIR spektrumu sonuçlarıyla gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada grafiği çıkarılan 4000-600 cm⁻¹ bölgesindeki PLA malzemesinin ATR-FTIR spektrumu ile Auta ve ark, (2017) ve BS membranın ATR-FTIR spektrumu Rocca-Smith ve ark, (2017)'de yaptığı çalışmalardaki ATR-FTIR spektrumu benzer titreşim bantlarını gösterdi.

Üretilen BS membranların içerisinde hücre göçüne izin veren ve hedeflenen boyutlarda damar kanallarının olduğu SEM görüntüleri ile kanıtlanmıştır. SEM görüntüleri sonucunda 0.4-2 mm boyutlarında kanal yapıları olduğu gözlemlendi. PLA kalıbın uzaklaşmasıyla elde edilen kanallar hücre göçüne ve neovaskülarizasyona izin verecek büyüklükte olduğu elde edilen mikro ve makro görüntüler ile gösterilmiştir.

Yayımlanan bilimsel araştımlarda Micro-CT analizi, daha çok dental kullanım alanlarında diş ve doku mühendisliği çalışmalarında ise kemik dokusunun 3B boyutlu modelini oluşturmak için tercih edilmektedir. Çünkü Micro-CT analizi ile sert doku malzemelerin poroziteleri incelenmektedir. Bu alışmada BS membranda oluşturulan kanal boşluklarına demir tozu aktarılarak BS membranında oluşturulan damar modalindeki ağsı yapının gösterilmesi hedeflendi. Bu işlem için demir tozunun seçilmesinin sebebi iki malzeme arasında rezlasyon farkından dolayı modifikasyonu yapılan BS membranında damar ağsı yapılarının 3B görüntüsünü en iyi şekilde göstermeye çalışmaktır. Bu amaç ile yapılan modifikasyonla BS membranında oluşan kanal yapılarına demir tozu yüklenerek Micro-CT analizi ile örnekten alınan 2B kesitler ve örneğin oluşturulan 3B modeli sonucunda BS membranındaki kanal yapılarındaki demir tozu başarılı bir şekilde gösterilmiştir.

In vitro hücre kültürü denemeleri ile BS membranında oluşan damar yapının, endotel hücrelerin g ve neovaskülarizasyona uygun boyutlarda olup olmadığı test edildi. *In vitro* hayvan hücre kültürü denemeleri için HUVEC hücrelerinin seçilmesinin nedeni çeşitli biyomalzemelerle etkileşimlerinde endotel hücre biyolojisi ve fizyolojisinin incelenmesi ve modellenmesi için en yaygın kullanılan endotel hücre hattıdır (Heng et al., 2011). Bu tez kapsamında yapılan *in vitro* hayvan hücre kültürü denemeleri sonucunda BS rneğin floresan ışık mikroskopunda analizi gerçekleştirildi ve BS membranında oluşan damar ağsı yapılarında bu hücrelerin göçüne, tutunmasına ve çoğalmasına olanak sağlayacak büyüklükte olduğu gözlemlendi. Live/Death boyama ile boyanan HUVEC hücrelerin canlılık oranının oldukça yüksek olduğu gözlemlendi ve bu da elde edilen malzemenin kloroform ve diğer BS'nin *in situ* ortam artıklarından iyi bir şekilde arındığını göstermektedir.

Bu tez çalışmasında üretilen BS membranın karakterizasyon testleri sonucunda BS membranında 3B damar modelinde kanal yapıları hücre göçüne ve neovaskülarizasyona olanak sağlayacak boyutlarda olduğu kanıtlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, BS membranın piyasadaki deri ikamelerinin dezavantajlarından biri olan neovaskülarizasyonu sağlayarak ticari bir deri ikamesi olma potansiyelini sağladığını göstermektedir.

6. SONUÇLAR

Bakteriyel selüloz nanofibril ağ yapısı ile eşsiz mekanik ve fiziksel özellikleri, yüksek biyouyumluluğu, saf olarak üretilmesi ve statik kültürde tabaka şeklinde, istenilen büyüklük ve kalınlıkta üretilebiliyor olmasının yanında, hidrojel özelliği ve yüksek çekme dayanımı ile deri ikamesinden beklenen hemen tüm özellikleri taşımaktadır (Czaja et al., 2006; Ullah et al., 2014).

Günümüzde yanık tedavilerinde kullanılan ticari sentetik ve yarı sentetik deri ikamelerinin çoğunun en büyük dezavantajlarından biri yara iyileşmesinin en önemli basamaklarından olan neovaskülarizasyonu desteklememesidir. Ayrıca, bu ürünler maliyet, patojen taşıma riski ve alerjik reaksiyon olasılıkları nedeniyle de çeşitli kısıtlar içermektedir (Paul and Sharma, 2015; Vig et al., 2017). Bu tez kapsamında sunulan deri ikamesi adayı olan ve uygun damar yapısı içerecek şekilde modifikasyonu yapılan BS membranının neovaskülarizasyona izin vermesi, biyouyumluluğu ve patojen taşıma riski içermemesi nedeniyle ticarileştirilme potansiyeli taşıyan bir ürün olması öngörülmektedir.

Bu tez çalışmasında yeni bir modifikasyon tekniği yaklaşımı ile 3B yazıcı ile basılan damar yapısı benzeşik PLA kalıp kullanılarak damar modelinde boşluklar içeren BS membranının *in situ* üretimi gerçekleştirildi.

In situ BS/PLA biyokompozit malzemeden 3B PLA kalıbın uzaklaştırılması için kloroform çözücü kullanılarak BS yıkama prosedürü için yeni yöntem geliştirildi.

Yapılan yeni modifikasyon tekniğiyle BS membranında oluşturulan damar ağı yapısının, hücre göçüne ve neovaskülarizasyona imkan sağlayabilecek boyutlarda olduğu ışık mikroskobu, SEM ve Micro-CT görüntüleri ile gösterilmiştir. Ayrıca ATR-FTIR sonuçları ile 3B PLA kalıbın, BS membranından etkili bir şekilde uzaklaştırıldığı da tespit edilmiştir.

Yapay deri ikamesi adayı olabilecek BS membranının ileri yara bakım çalışmaları için yapılan bilimsel araştırmalarda, neovaskülarizasyonu desteklemeyen mevcut deri ikamelerinin dezavantajının üstesinden gelinmesinde ümit verici sonuçlar olduğu düşünülmektedir.

7. ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan SOLIDWORKS 2017 (DS-Dassault Systems) çizim programı ve el yapımı 3B yazıcı ile 3B damar modelinde PLA kalıbın çizimi ve basımı gerçekleştirildi. Ancak daha ileri bir teknoloji ile dermal vasküler sistemin simülasyonu yapılarak daha karmaşık ağsı damar modelleri oluşturulabilir.

In situ modifiye BS membran üretiminde kullanılan iplerin PLA kalıba bağlandığı noktalar üretilen membranın içerisinde kaldığından çıkarılması membran bütünlüğüne en dış kenarlardan zarar vereceğinden çıkarılmadı. Göz ardı edilecek boyutlarda olmasına rağmen bu yöntemle elde edilen BS membranın deri ikamesi olarak kullanabileceği durumlarda herhangi bir komplikasyona yol açmaması için biyobozunur iplerin kullanılması tercih edilebilir. Ayrıca PLA kalıbın sıvı-hava arayüzeyinde doğru konumlanması *in situ* BS üretiminin kompakt bir yapıda olması için önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında kullanılan PLA malzemesinin kalitesi ve çeşidi optimizasyonu yapılan yıkama prosedürünü etkileyeceğinden, uygun PLA malzemesinin seçimi önemli bir parametreyi oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed, J. and Varshney, S.K., 2011**, Polylactides—chemistry, properties and green packaging technology: a review, *International journal of food properties*, 14(1), Canada, 37-58 p.
- Akoğlu, A., Karahan, A.G., Çakmakçı, M.L. and Çakır, İ., 2010**, Bakteriyele Selülozun Özellikleri ve Gıda Sanayisinde Kullanımı, *GIDA/The Journal of FOOD*, 35(2), Ankara, 127-134 p.
- Akyüz, N., 2008**, Yara iyileşmesi ve Bakımında Temel İlkeler, Yara Bakımı ve Tedavisi, İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi No:67, İstanbul, 7 s.
- Alanis, A.D., Calzada, F., Cervantes, J.A., Torres, J. and Ceballos, G.M., 2005**, Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders, *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), Mexico, 153-157 p.
- Altıntaş, M. 2001**, Yara-Açık Yara, Cilt Hastalıkları ve Yara Bakımı Sempozyumu, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, İstanbul, 81-88 s.
- Atiyeh, B.S., Hayek, S.N. and Gunn, S.W., 2005**. New technologies for burn wound closure and healing—review of the literature, *Burns*, 31(8), 944-956 p.
- Augustine, R., Kalarikkal, N. and Thomas, S., 2014**, Advancement of wound care from grafts to bioengineered smart skin substitutes, *Progress in biomaterials*, 3(2-4), India, 103-113 p.
- Auta, R., Adamus, G., Kwiecien, M., Radecka, I. and Hooley, P., 2017**, Production and characterization of bacterial cellulose before and after enzymatic hydrolysis, *African Journal of Biotechnology*, 16(10), UK, 470-482 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Aydın, Y., 2019, Doku transplantasyonu Temel Prensipleri, İ.Ü., Cerrahpaşa Tıp Fak., Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi ABD., http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/yagmur-aydin/Doku_Transplantasyonu_Temel_Prensipleri.pdf (Erişim tarihi: 15 Haziran 2019).

Bilgi, E., Bayir, E., Sendemir-Urkmez, A. and Hames, E.E., 2016, Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean, *International journal of biological macromolecules*, 90, 2-10 p.

Braverman, I.M., 2000, December. The cutaneous microcirculation, In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, Vol. 5, No. 1, 3-9 p.

Bunman, S., Aramwit, P., Larbcharoensub, N. and Towiwat, P., 2015. Application of proteoglycans from fish cartilage for the acceleration of burn wound healing, *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)*, 39(3).

Bunman, S., Dumavibhat, N., Chatthanawaree, W., Intalapaporn, S., Thuwachaosuan, T. and Thongchuan, C., 2017, Burn Wound Healing: Pathophysiology and Current Management of Burn Injury, *The Bangkok Medical Journal*, 13(2).

Chawla, P.R., Bajaj, I.B., Survase, S.A. and Singhal, R.S., 2009, Microbial cellulose: fermentative production and applications, *Food Technology & Biotechnology*, 47(2).

Chu, D.H. (2008), Overview of biology, development, and structure of skin. In K. Wolff, L.A. Goldsmith, S.I. Katz, B.A. Gilchrest, A.S. Paller, & D.J. Leffell (Eds.), *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*, (7th ed., 57–73 p), New York: McGraw-Hill.

Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S. and Brown Jr, R.M., 2006, Microbial cellulose—the natural power to heal wounds, *Biomaterials*, 27(2), 145-151 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Czaja, W.K., Young, D.J., Kawecki, M. and Brown, R.M., 2007**, The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications, *Biomacromolecules*, 8(1), 1-12 p.
- de Oliveira Barud, H.G., da Silva, R.R., da Silva Barud, H., Tercjak, A., Gutierrez, J., Lustri, W.R., de Oliveira Junior, O.B. and Ribeiro, S.J., 2016**, A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications, Bacterial cellulose, *Carbohydrate polymers*, 153, 406-420 p.
- Diler, B., Dalgıç, N., Karadag, Ç.A. and Dokucu, A.İ., 2012**. Bir Pediatrik Yanık Ünitesinde Epidemiyoloji ve Enfeksiyonlar: Üç Yıllık Deneyimiz / Epidemiology and Infections in a Pediatric Burn Unit: Experience of Three Years, *Journal of Pediatric Infection* 6(2), 40-5 p.
- Fadini, G.P. and Avogaro, A., 2010**, Cell-based methods for ex vivo evaluation of human endothelial biology, *Cardiovascular research*, 87(1), 12-21 p.
- Farah, S., Anderson, D.G. and Langer, R., 2016**, Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications—A comprehensive review. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 367-392 p.
- Farooqi, I.S. and O'rahilly, S., 2008**, Mutations in ligands and receptors of the leptin–melanocortin pathway that lead to obesity, *Nature Reviews Endocrinology*, 4(10), 569 p.
- Fernandes, M., Gama, M., Dourado, F. and Souto, A.P., 2019**, Development of novel bacterial cellulose composites for the textile and shoe industry, *Microbial Biotechnology*, Portugal, 12(4): 650–661 p.
- Figueiredo, A.G., Figueiredo, A.R., Alonso-Varona, A., Fernandes, S., Palomares, T., Rubio-Azpeitia, E., Barros-Timmons, A., Silvestre, A.J., Pascoal Neto, C. and Freire, C.S., 2013**, Biocompatible bacterial cellulose–poly (2-hydroxyethyl methacrylate) nanocomposite films, *BioMed research international*, 2013.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fonder, M.A., Lazarus, G.S., Cowan, D.A., Aronson-Cook, B., Kohli, A.R. and Mamelak, A.J., 2008**, Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58(2), 185-206 p.
- Fu, L., Zhang, Y., Li, C., Wu, Z., Zhuo, Q., Huang, X., Qiu, G., Zhou, P. and Yang, G., 2012**, Skin tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer fermentation method, *Journal of Materials Chemistry*, 22(24), 12349-12357 p.
- Fu, L., Zhou, P., Zhang, S. and Yang, G., 2013**. Evaluation of bacterial nanocellulose-based uniform wound dressing for large area skin transplantation, *Materials Science and Engineering: C*, 33(5), 2995-3000 p.
- Gawkrodger, D.J., 2002**, *Dermatology, An Illustrated Colour Text*, 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Gayathry, G. and Gopaldaswamy, G., 2014**, Production and characterisation of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum*,
- Goodwin, C., 2011**, Anatomy and Physiology of the Skin, *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203-213 p.
- GovindShukla, Palkamshetti, A., Srinidhi, K., Sampath Kumar, C.J., 2018**, Lactoskin Capsules: Nutritional Support for healthy Skin, *Journal of Pharmareations*, 5(4) 203-209 p.
- Griendling, K.K. and Alexander, R.W., 1996**, Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *The FASEB Journal*, 10(2), 283-292 p.
- Gross, B.C., Erkal, J.L., Lockwood, S.Y., Chen, C. and Spence, D.M., 2014**, Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences, *Anal Chem*, 86(7):3240–3253 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y. and Longaker, M.T., 2008**, Wound repair and regeneration, *Nature*, 453(7193), 314 p.
- Han, G. and Ceilley, R., 2017**, Chronic wound healing: a review of current management and treatments, *Advances in therapy*, 34(3), 599-610 p.
- Hanna, J.R. and Giacobelli, J.A., 1997**, A review of wound healing and wound dressing products, *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 36(1), 2-14 p.
- Heng, B.C., Xia, Y., Shang, X., Preiser, P.R., Law, S.A., Boey, F.Y.C. and Venkatraman, S.S., 2011**, Comparison of the adhesion and proliferation characteristics of HUVEC and two endothelial cell lines (CRL 2922 and CRL 2873) on various substrata, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(1), 127 p.
- Hestrin, S. and Schramm, M., 1954**, Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose, *Biochemical Journal*, 58(2), 345 p.
- Hägström, M., 2014**, *Wikiversity Journal of Medicine*, 1 (2) DOI:10.15347/wjm/2014.008, ISSN 2002-4436, Public Domain, Wikiversity, https://en.wikiversity.org/wiki/WikiJournal_of_Medicine/Medical_gallery_of_Mikael_H%C3%A4ggstr%C3%B6m_2014 (Erişim tarihi: 12 Haziran 2019)
- Hornung, M., Ludwig, M., Gerrard, A.M. and Schmauder, H.P., 2006**, Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: evaluation of substrate mass transfer influences on the bioreaction (Part 1), *Engineering in Life Sciences*, 6(6), 537-545 p.
- Hu, Y. and Catchmark, J.M., 2011**, *In vitro* biodegradability and mechanical properties of bioabsorbable bacterial cellulose incorporating cellulases, *Acta biomaterialia*, 7(7), 2835-2845 p.
- Hussain A, 2013**, Surgical treatment of acute burns, *Wounds UK*; 9(4): 54-9 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Iguchi, M., Yamanaka, S. and Budhiono, A., 2000. Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts, *Journal of materials science*, 35(2), 261-270 p.

Jackson, S., and Stevens, J., 2006, in *MX Business Strategies for Medical Technology Executives*, Canon Communications LLC., Los Angeles, LA, USA.

James, W.D., Berger, T.G., & Elston, D.M., 2006, *Andrews' diseases of the skin: Clinical dermatology* (10th ed.), Philadelphia: Elsevier Saunders.

Junker, J.P., Caterson, E.J. and Eriksson, E., 2013, The microenvironment of wound healing, *Journal of Craniofacial Surgery*, 24(1), 12-16 p.

Jonas, R. and Farah, L.F., 1998, Production and application of microbial cellulose, *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), 101-106 p.

Jorfi, M. and Foster, E.J., 2015, Recent advances in nanocellulose for biomedical applications, *Journal of Applied Polymer Science*, 132(14).

Kanitakis, J., 2002, Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin, *European Journal of Dermatology*, 12(4), 390–401 p.

Kaya, A., 2007, Acetobacter xylinum'un suşlarında selüloz üretimi ile yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi, A.Ü. Fen Bilimleri Enst., Gıda Müh. A.B.D, Yüksek Lisans Tezi, Ankara

Keshk, S.M., 2014, Bacterial cellulose production and its industrial applications, *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 4(2), 1 p.

Keskin, Z., Sendemir, A., and Hames, E.E., 2017, Novel keratin modified bacterial cellulose nanocomposite production and characterization for skin tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 75, 1144-1153 p.

Kiya, K. and Kubo, T., 2019, Neurovascular interactions in skin wound healing, *Neurochemistry international*, 125, 144-150 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U. and Marsch, S., 2001**, Bacterial synthesized cellulose—artificial blood vessels for microsurgery, *Progress in polymer science*, 26(9), 1561-1603 p.
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D. and Dorris, A., 2011**, Nanocelluloses: a new family of nature-based materials, *Angewandte Chemie International Edition*, 50(24), 5438-5466 p.
- Kwak, M.H., Kim, J.E., Go, J., Koh, E.K., Song, S.H., Son, H.J., Kim, H.S., Yun, Y.H., Jung, Y.J. and Hwang, D.Y., 2015**, Bacterial cellulose membrane produced by *Acetobacter* sp. A10 for burn wound dressing applications, *Carbohydrate polymers*, 122, 387-398 p.
- Li, J., Chen, J. and Kirsner, R., 2007**, Pathophysiology of acute wound healing, *Clinics in dermatology*, 25(1), 9-18 p.
- Lin, N. and Dufresne, A., 2014**, Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect, *European Polymer Journal*, 59, 302-325 p.
- Lin, W.C., Lien, C.C., Yeh, H.J., Yu, C.M. and Hsu, S.H., 2013**, Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications, *Carbohydrate polymers*, 94(1), 603-611 p.
- Marks, J.G. and Miller, J.J., 2018**, Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology E-Book, *Elsevier Health Sciences*.
- McGrath, J.A., Eady, R.A.J. and Pope, F.M., 2004**, Anatomy and organization of human skin, *Rook's textbook of dermatology*, 10, p.9781444317633.
- Meer, S., 2010**, Rook's textbook of dermatology, *Blackwell Publishing Ltd. of materials science*, 35(2), pp.261-270.
- Mohite, B.V. and Patil, S.V., 2014**, A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 61(2), 101-110 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Montagna, W., Parakkal, P. F., 1994,** The structure and function of skin, *Archives of Dermatology*, 110(4), 649-649 p.
- Muangman, P., Opananon, S., Suwanchot, S. and Thangthed, O., 2011,** Efficiency of microbial cellulose dressing in partial-thickness burn wounds, *The Journal of the American College of Certified Wound Specialists*, 3(1), 16-19 p.
- Öhnstedt, E., Lofton Tomenius, H., Vågesjö, E. and Phillipson, M., 2019,** The discovery and development of topical medicines for wound healing, *Expert opinion on drug discovery*, 14(5), 485-497 p.
- Patel, P.P., Vasquez, S.A., Granick, M.S. and Rhee, S.T., 2008,** Topical antimicrobials in pediatric burn wound management, *Journal of Craniofacial Surgery*, 19(4), 913-922 p.
- Paul, W., and Sharma, C.P., 2015,** *Advances in Wound Healing Materials*, *Smithers Rapra*.
- Perotti, G.F., Barud, H.S., Ribeiro, S.J. and Constantino, V.R., 2014,** Bacterial cellulose as a template for preparation of hydrotalcite-like compounds, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(9), 1647-1655 p.
- Picheth, G.F., Pirich, C.L., Sierakowski, M.R., Woehl, M.A., Sakakibara, C.N., de Souza, C.F., Martin, A.A., da Silva, R. and de Freitas, R.A., 2017,** Bacterial cellulose in biomedical applications: a review, *International journal of biological macromolecules*, 104, 97-106 p.
- Qi, X., Ren, Y. and Wang, X., 2017,** New advances in the biodegradation of Poly (lactic) acid, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 117, 215-223 p.
- Qiu, K. and Netravali, A.N., 2014,** A review of fabrication and applications of bacterial cellulose based nanocomposites, *Polymer Reviews*, 54(4), 598-626 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Qiu, Y., Qiu, L., Cui, J. and Wei, Q., 2016**, Bacterial cellulose and bacterial cellulose-vaccarin membranes for wound healing, *Materials Science and Engineering: C*, 59, 303-309 p.
- Rai, M., Yadav, A. and Gade, A., 2009**, Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnology advances*, 27(1), 76-83 p.
- Rajwade, J.M., Paknikar, K.M. and Kumbhar, J.V., 2015**, Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine, *Applied microbiology and biotechnology*, 99(6), 2491-2511 p.
- Reis, R.L., Neves, N.M., Mano, J.F., Gomes, M.E., Marques, A.P. and Azevedo, H.S., 2008**, *Natural-based polymers for biomedical applications*. Elsevier.
- Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J. and Boccaccini, A.R., 2006**. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 27(18), 3413-3431 p.
- Rocca-Smith, J.R., Lagorce-Tachon, A., Iaconelli, C., Bellat, J.P., Marcuzzo, E., Sensidoni, A., Piasente, F., Debeaufort, F. and Karbowski, T., 2017**, How high pressure CO₂ impacts PLA film properties, *eXPRESS Polymer Letters*, 11(4).
- Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M., 1991**, Cellulose biosynthesis and function in bacteria, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55(1), 35-58 p.
- Schachner, L.A. and Hansen, R.C., 2011**, *Pediatric Dermatology E-Book*, Elsevier Health Sciences.
- Senatov, F.S., Niaza, K.V., Zadorozhnyy, M.Y., Maksimkin, A.V., Kaloshkin, S.D. and Estrin, Y.Z., 2016**, Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 57, 139-148 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schubert, C., Van Langeveld, M.C. and Donoso, L.A., 2014**, Innovations in 3D printing: a 3D overview from optics to organs, *British Journal of Ophthalmology*, 98(2), 159-161 p.
- Silverajah, V.S., Ibrahim, N.A., Zainuddin, N., Yunus, W.M.Z.W. and Hassan, H.A., 2012**, Mechanical, thermal and morphological properties of poly (lactic acid)/epoxidized palm olein blend, *Molecules*, 17(10), 11729-11747 p.
- Singer, A.J. and Clark, R.A., 1999**, Cutaneous wound healing, *New England journal of medicine*, 341(10), 738-746 p.
- Som, P.M., Laitman, J.T. and Mak, K., 2016**, Embryology and Anatomy of the Skin, Its Appendages, and Physiologic Changes in the Head and Neck, *Neurographics*, 7(5), 390-415 p.
- Somboonwong, J., Kankaisre, M., Tantisira, B. and Tantisira, M.H., 2012**, Wound healing activities of different extracts of *Centella asiatica* in incision and burn wound models: an experimental animal study, *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 103 p.
- Stowall, G., 2013**, [Skin structure anatomy diagrams](https://pulpbits.net/7-skin-structure-anatomy-diagrams/structure-of-skin/), <https://pulpbits.net/7-skin-structure-anatomy-diagrams/structure-of-skin/> (Erişim tarihi: 20 Mayıs 2019)
- Sulaeva, I., Henniges, U., Rosenau, T. and Potthast, A., 2015**, Bacterial cellulose as a material for wound treatment: properties and modifications. A review, *Biotechnology advances*, 33(8), 1547-1571 p.
- Terfera, D. and Jegtvig, S., 2012**, Clinical Anatomy for Dummies, *John Wiley & Sons*.
- Ullah, M.W., Ul-Islam, M., Khan, S., Kim, Y. and Park, J.K., 2016**, Structural and physico-mechanical characterization of bio-cellulose produced by a cell-free system, *Carbohydrate polymers*, 136, 908-916 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Uysal, A., Oltulu, F., Çalık Kocatürk, D. ve Özdil, B., 2016,** Deri ve Derinin Eklerinin Embriyonik Gelişimi. *Güncel Dermatoloji Dergisi*, Cilt.1, Sayı.1, 1-10 s.
- Vandamme, E.J., De Baets, S., Vanbaelen, A., Joris, K. and De Wulf, P., 1998,** Improved production of bacterial cellulose and its application potential, *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), .93-99 p.
- Venkatesan, J. and Kim, S.K., 2014,** Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering—a review, *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(10), 3124-3140 p.
- Ventola, C.L., 2014,** Medical applications for 3D printing: current and projected uses, *Pharmacy and Therapeutics*, 39(10), 704 p.
- Vig, K., Chaudhari, A., Tripathi, S., Dixit, S., Sahu, R., Pillai, S., Dennis, V. and Singh, S., 2017,** Advances in skin regeneration using tissue engineering, *International journal of molecular sciences*, 18(4), 789 p.
- Visiongain, 2012,** Advanced wound care: world market prospects 2013-2023, <https://www.visiongain.com/> (Erişim tarihi 12 Haziran 2019)
- Wanna, D., Alam, C., Toivola, D.M. and Alam, P., 2013,** Bacterial cellulose–kaolin nanocomposites for application as biomedical wound healing materials, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(4), 045002 p.
- Watson, N.F. and Hodgkin, W., 2005,** Wound dressings, *Surgery (Oxford)*, 23(2), 52-55 p.
- Wiles, M., Williams, J. and Ahmad, K., 2010,** *Essentials of Dermatology for Chiropractors*, Jones & Bartlett Learning.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wu, J., Zheng, Y., Song, W., Luan, J., Wen, X., Wu, Z., Chen, X., Wang, Q. and Guo, S., 2014**, In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing, *Carbohydrate polymers*, 102, 762-771 p.
- Wuisman, P.I.J.M. and Smit, T.H., 2006**, Bioresorbable polymers: heading for a new generation of spinal cages, *European spine journal*, 15(2), 133-148 p.
- Xiao, L., Wang, B., Yang, G. and Gauthier, M., 2012**, Poly (lactic acid)-based biomaterials: synthesis, modification and applications, InTech.
- Yadav, V., Paniliatis, B.J., Shi, H., Lee, K., Cebe, P. and Kaplan, D.L., 2010**, Novel *in vivo*-degradable cellulose-chitin copolymer from metabolically engineered *Gluconacetobacter xylinus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(18), 6257-6265 p.
- Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsuhashi, S., Nishi, Y. and Uryu, M., 1989**, The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose, *Journal of Materials Science*, 24(9), 3141-3145 p.
- Yang, G., Xie, J., Hong, F., Cao, Z. and Yang, X., 2012**, Antimicrobial activity of silver nanoparticle impregnated bacterial cellulose membrane: effect of fermentation carbon sources of bacterial cellulose, *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 839-845 p.
- Yoshinaga, F., Tonouchi, N. and Watanabe, K., 1997**, Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(2), 219-224 p.
- Yousef, H., and Sharma, S., 2017**, Anatomy, Skin (Integument), Epidermis, NCBI Bookshelf, A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yüceyar, S., 2008, Cerrahi yaraların takip ve tedavisi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, *Yara Bakımı ve Tedavisi Sempozyum Dizisi*, No:67, 17-24 s.

Zhijiang, C. and Guang, Y., 2011, Bacterial cellulose/collagen composite: characterization and first evaluation of cytocompatibility, *Journal of Applied Polymer Science*, 120(5), 2938-2944 p



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince benden hiçbir zaman yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, tüm içtenliğiyle değerli bilgilerini ve deneyimlerini paylaşan, çalışma konumun belirlenmesinde ve bu tezin oluşmasında büyük emeği geçen, çalışma tarzı ve düzenliliği sayesinde tez çalışmamı yönlendirmemde ve yürütmemde tüm katkılarından dolayı değerli danışmanlarım Prof. Dr. E. Esin HAMEŞ TUNA'ya ve Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması süresince ön denemeler için gerekli olan 3B PLA kalıbın temin edilmesinde emeği geçen Alpcan ARIÇ ve Barış GÜLİÇLİ'ye ve hem tez çalışmamda kullandığım 3B PLA kalıbın basılması hem de *in vitro* hücre kültürü denemelerimde emeği geçen Özgün Selim GERMİYAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmalarımın başlangıcında bana destek olan ve laboratuvar teknikleri konusunda bilgi ve deneyiminden faydalandığım Zalıke KESKİN ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

Bu çalışma kapsamında örneklerin analizi için gerekli olan desteklerini sunan Ege-MATAL çalışanlarına ve özellikle Araş. Gör. Dr. Pınar SÖZER BAHADIR ve Araş. Gör. Dr. Ece BAYIR'a, ayrıca liyofilizasyon işlemi için Biyomühendislik Bölümü'ndeki diğer laboratuvar çalışanlarına destekleri için teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmamın tez dönemi, TÜBİTAK 2210/C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı tarafından desteklendiği için TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimimde Erasmus+ Traineeship Programı aracılığıyla Dublin City University'de yaptığım staj sürecinde bana emekleri geçen danışmanım Dr. Damien KING'e, ikinci danışmanlarım olan Albina NIRUPA JULIUS ve Thomas GLENNON'a ve laboratuvar arkadaşlarım George MIHAILESCU, Glen REILLY, Philip EARLY, Micheal MURRAY, Antoine ROLAND, Hélène COGNEAU ve Killian HEALY'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitim sürecimde bana desteklerini esirgemeyen ve laboratuvar çalışmalarım sürecinde her şeyi daha zevkli hale getiren değerli arkadaşlarım Hajir Badawi Mohammed AHMED, Nefise ÜNLÜER, Gizem ARGUNŞAH ve Ebru KAVRUK ile laboratuvar ekibimdeki diğer arkadaşlarıma verdiği katkılardan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem, babam ve kardeşlerim Murat, Ahmet ve Ayşegül SAFA'ya ve her zaman bir kardeştan daha yakın olan çok değerli arkadaşım Aylin ÖZLER KILIÇ'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ve eğitim hayatım boyunca bana emeği geçen başta bütün değerli öğretmenlerim ve hayatı her zaman daha güzel ve anlamlı kılan bütün değerli arkadaşlarıma sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

06 / 08 / 2019

Neriman SAFA

ÖZGEÇMİŞ

NERİMAN SAFA

Meslek: Biyomühendis

e-mail: neriman.safa@gmail.com

Eğitim Bilgileri

2016–Devam ediyor, Yüksek lisans; Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ABD.

2010–2016, Lisans; Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü (Mezuniyet Derecesi (M.D.): 3,12/4,0)

2005–2009, Lise; Iğdır Atatürk Lisesi (M.D.: 92,05/100)

1997–2005, İlköğretim; Halfeli 75. Yıl İMKB İ.Ö.O. (M.D.: 97/100)

İş Deneyimleri

Ortaokul ve lise düzeyindeki öğrencilere özel ders öğretmenliği (Matematik, Geometri, Fizik, Kimya, Biyoloji, İngilizce, Türkçe) (Kasım 2017 – Devam ediyor, Part-time iş)

Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Lisans 1. Sınıf Temel Laboratuvar Dersi, Öğrenci Asistanlığı (Şubat-Haziran/Bahar Dönemi 2016, 2017, 2018 ve 2019)

Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Lisans 3. Sınıf Biyomühendislik Lab-I Dersi, Öğrenci Asistanlığı (Eylül 2018 – Ocak 2019)

Ege Üniversitesi, Dış İlişkiler ve Avrupa Birliği Şube Müdürlüğü- Erasmus Ofisi, Stajyer Öğrenci (1 Kasım 2015 - 15 Haziran 2016, Part-time iş)

Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Bilgisayar Laboratuvarı, Stajyer Öğrenci (1 Kasım-15 Haziran 2013-2014 ve 2014-2015, Part-time iş)

Stajlar

Dublin City University, School of Physics Science, Microfluidics Platforms for Animal Cell Culture – Erasmus+ Traineeship Program – Dublin, Ireland (04 July - 30 September 2017)

Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Bitki Moleküler Genetik Laboratuvarı, İzmir (40 iş günü) – (Yaz dönemi 2015)

Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Organik Moleküllerin Ayırma ve Saflaştırılma Laboratuvarı, İzmir (40 iş günü) – (Eylül 2014 - Ocak 2015)

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Laboratuvarı, İzmir, Zorunlu Lisans Stajı – (8 Temmuz – 8 Ağustos 2014)

Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Biyoyakıt Proses Laboratuvarı, İzmir (40 iş günü) – (Ağustos - Kasım 2012)

Projeler ve Burslar

TÜBİTAK 2209A Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projesi (2018-2019) Proje konusu: *Aloe vera* Özü İçeren Bakteriyel Selüloz Esaslı Doğal Cilt Maskesi Üretimi, Proje yürütücüsü: Gizem AKTÜRK, Proje ortakları: Nur Deniz BİNGÜL, Neriman SAFA, Danışman: Prof. Dr. E. Esin HAMEŞ

TÜBİTAK 2210-C: Öncelikli Alanlar Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı (Mart 2018 – Şubat 2019)

Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

Aloe vera Özü İçeren Bakteriyel Selüloz Esaslı Doğal Cilt Maskesi Üretimi, Yazarlar: Gizem AKTÜRK, Nur Deniz BİNGÜL, Neriman SAFA, E. Esin HAMEŞ, 7. Biyomühendislik Kongresi, Ege Üniversitesi, İzmir/Türkiye (Poster birincilik ödülü); 16. Biyomühendislik Günleri, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir/Türkiye (Poster ikincilik ödülü) (03-04 Mayıs 2019; 15 Mayıs 2019)

In situ Bacterial Cellulose Production Suitable for Neovascularization Using 3-D Printed Polylactic Acid Template, Writers: Neriman SAFA, E. Esin HAMES, Aylin SENDEMİR, International Symposium on 3D Printing in Medicine, Ankara University, Ankara/Turkey, (16-17 November 2018)

In situ Bacterial Cellulose Production and Characterization for Cell Migration and Neovascularization, Yazarlar: Neriman SAFA, D. Deniz İLMENÖZ, E. Esin HAMEŞ, 5. Biyomalzeme Günleri Sempozyumu, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul/Türkiye, (22-23 Ekim 2018)

Seminerler – Sempozyumlar

7. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, (Poster sunumu), (04-05 Mayıs 2019)

International Symposium on 3D Printing in Medicine, Ankara/Turkey (Poster presented), (16-17 Kasım 2018)

5. Biyomalzeme Günleri Sempozyumu, İstanbul/Türkiye (Poster sunumu), (22-23 Ekim 2018)

Kanser Biyolojisi ve Genetiği Sempozyumu, İzmir/Türkiye (Mart 2013)

Ege Bilişim Zirvesi, İzmir/Türkiye (Aralık 2012)

Geleneksel 4. Kök Hücre Sempozyumu, İzmir/Türkiye (Nisan 2012)

Ulusal Calculus Çalıştayı, İzmir/Türkiye (Kasım 2011)

Doku Mühendisliği Sempozyumu, İzmir/Türkiye (11 Nisan 2011)

Kurs ve Sertifikalar

İngilizce Kursu, B1 Seviyesi Kuru, International House, İzmir/Türkiye (Mart, Mayıs 2019)

Akan Hücre Ölçer Eğitimi, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir/Türkiye (2019)

Lisansüstü Öğrencileri Oryantasyon Programı, E.Ü. EBİLTEM-TTO; E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü ve E.Ü. Mühendislik Fakültesi Dekanlığı, İzmir/Türkiye (Ekim 2016)

Resim Kursu (Karakalem Çalışması), Bornova Halk Eğitim Merkezi, İzmir (Kasım 2015 - Nisan 2016)

Ehliyet B Sınıfı Sürücü Belgesi, Mevlana Sürücü Kursu, İzmir (Ekim-Kasım 2013)

Ödüller

Poster birinciliği ve ikinciliği; Poster konusu: *Aloe vera* Özü İçeren Bakteriyel Selüloz Esaslı Doğal Cilt Maskesi Üretimi, Yazarlar: Gizem AKTÜRK, Nur Deniz BİNGÜL, Neriman SAFA, E. Esin HAMEŞ, (Mayıs 2019)

T.C. Kültür ve Turizm Bakanı Tarafından İl Genelinde Okullar Arasında En Çok Kitap Okuyan Öğrenciler Ödülü, Iğdır/Türkiye (Kasım 2009)

Dil Becerileri

Türkçe: C2 düzeyi

İngilizce: B2 düzeyi

Korece: A1 düzeyi

Bilgisayar Becerileri

Microsoft Office Word, Excel, Power Point (İyi decede)

Mat-Lab (Başlangıç seviyesi)

Organizasyon Becerileri

Ege Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Kulübü: Üye, İzmir/Türkiye (2010 yılından beri)

Eyüp Belediyesi Festivalinde Kısa Film Gösterimi, “Günebakan” Filminde İngilizce Çevirmen (Kısa Film), İstanbul, Eyüp/Türkiye (16 Eylül 2018)

Ege Üniversitesi, Avrupa Birliği ve Dış İlişkiler, Avrupa'dan Gelen Öğrencileri Karşılama Organizasyonu Üyesi, İzmir/Türkiye (04 Mart 2016)

Ege Üniversitesi, 15. Biyomühendislik Günleri, Organizasyon Komitesi Üyesi, İzmir/Türkiye (08 – 09 Mayıs 2015)

Kızılay için Kan Bağışı Çalışmasında Gönüllü Eleman, E.Ü. Biyomühendislik Bölümü, Topluma Hizmet Dersi Sosyal Sorumluluk Projesi, İzmir/Türkiye (Şubat – Haziran 2012)