

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**DÜZ KAS HÜCRELERİNİN YÖNLENDİRİLMİŞ
YÜZEYLERDE DOKU MÜHENDİSLİĞİ AMAÇLI
DİNAMİK KÜLTÜRÜ**

Mert ŞAHİNLER

Danışman: Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir
2021

Mert ŞAHİNLER tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Düz kas hücrelerinin yönlendirilmiş yüzeylerde doku mühendisliği amaçlı dinamik kültürü” 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 03.03.2021 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR

Raportör Üye : Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Üye : Doç. Dr. Aylin ZİYLAN

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Düz kas hücrelerinin yönlendirilmiş yüzeylerde doku mühendisliği amaçlı dinamik kültürü” 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 davranışımın 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.

03 / 03 / 2021

İmzası

Mert ŞAHİNLER

ÖZET**DÜZ KAS HÜCRELERİNİN YÖNLENDİRİLMİŞ YÜZEYLERDE
DOKU MÜHENDİSLİĞİ AMAÇLI DİNAMİK KÜLTÜRÜ**

ŞAHİNLER, Mert

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR

Şubat 2021, 137 sayfa

Doku mühendisliği yaklaşımlarının popülerliği ve gerekliliği günümüz sağlık alanında gittikçe artmaktadır. Bu yaklaşımlar, geleneksel tedavi yöntemlerinin yetersiz kaldığı veya hiç bulunmadığı pek çok farklı doku ve organlarla ilgili ortaya çıkabilecek hastalık veya fonksiyon bozukluklarında kullanılabilir. Bu tez çalışmasında ise standart cerrahi müdahalelerin pek çok komplikasyona sebep olabileceği bilinen ve atrezi veya kostik yaralanmalar sonucu gerekebilecek özofagus replasmanına yönelik bir doku mühendisliği ürünü ortaya çıkarmak hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında bu hedefe ulaşmak için doğal özofagus yapısını taklit etme amacıyla *Bombyx mori* kozalarından izole edilen ipek fibroin, elektroğirme yöntemi ile dağınık ve yönlendirilmiş fiber yapıları üretmek için kullanılmıştır. Üretilen bu doku iskeleleri üzerinde, doğal özofagus yapısında da bulunan düz kas hücrelerinin kültürü gerçekleştirilmiş ve bu farklı yüzeylere karşı verdikleri tepkiler incelenmiştir. Elde edilen bulgular sonucu, düz kas hücrelerinin bu çalışmada üretilen doku iskelesi üzerinde 15 gün boyunca canlı kalabildikleri ve kontraktil özelliğe sahip olduklarını belirten proteinleri ifade ettikleri ve yönlendirilmiş yüzeyler üzerinde fiber doğrultusunda yönlendikleri belirlenmiştir. Ayrıca, çekme biyoreaktörü kullanılarak uygulanan farklı germe miktarlarının hücrelerdeki kontraktil özellik ile ilişkili protein olan α -SMA ifadesinde farklılığa sebep olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, düz kas hücrelerinin kültürünün gerçekleştirildiği rastgele ve yönlendirilmiş fiber yapıları ipek fibroin doku iskelelerinin ve dinamik kültür koşullarının ileride özofagusa yönelik geliştirilebilecek doku mühendisliği yaklaşımlarına yön ve destek vermesi bakımından oldukça önemlidir.

Anahtar sözcükler: Elektroğirme, Yönlendirilmiş yüzey, Çekme biyoreaktörü, İpek fibroin.

ABSTRACT**DYNAMIC CULTURE OF SMOOTH MUSCLE CELLS ON
ALIGNED SURFACES FOR TISSUE ENGINEERING**

ŞAHİNLER, Mert

MSc in Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aylin ŞENDEMİR

Şubat 2021, 137 pages

The popularity and necessity of tissue engineering approaches is increasing in today's healthcare field. These approaches can be used in diseases or dysfunctions that may arise in many different tissues and organs where traditional treatment methods are inadequate or not available. In this thesis, it was aimed to create a tissue engineering product for esophageal replacement that is known to cause many complications with standard surgical interventions and may be required as a result of atresia or caustic injuries. In order to achieve this goal, silk fibroin isolated from *Bombyx mori* cocoons was used to produce random and aligned fiber structured tissue scaffolds by electrospinning in order to mimic the natural esophagus structure. Smooth muscle cells, which are also found in the natural esophagus structure, were cultured on these produced tissue scaffolds and their responses to these different surfaces were examined. As a result of the findings obtained, it was determined that smooth muscle cells could survive for 15 days on the tissue scaffold produced in this study, express proteins indicating that they have contractile properties and are oriented in the direction of the fiber on aligned surfaces. In addition, it was determined that different stretching magnitudes applied using a tensile bioreactor caused a difference in α -SMA expression related to the contractile property in cells. These results are considered to be very important in terms of providing direction and support for tissue engineering approaches to be developed for the esophagus in the future.

Keywords: Electrospinning, Alinged surfaces, Strech bioreactor, Silk fibroin.

ÖNSÖZ

Doku mühendisliği yaklaşımları ile ilgili yapılan araştırmaların pek çoğunun klinik anlamda uygulanabilir hale gelmesinin ve gerçekten uygulanmasının on yıllar aldığı bir gerçektir. Bu amaca doğru yapılan her çalışmanın bu süreci biraz daha kolaylaştırıp kısaltacağını ve sonunda insanların hayatını kolaylaştırabileceğini hatta kurtarabileceğini düşünmekteyim. Bu hedef doğrultusunda özverili bir şekilde çalışan dünyanın her yerinden, farklı ırka, yönelime veya düşünce yapısına sahip araştırmacılara ufak bir destek vermiş olmanın bilincinde olmak beni bu çalışma boyunca mutlu ve motive etmiştir.

İZMİR

03/03/2021

MERT şAHİNLER

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Doku Mühendisliği	3
2.1.1 Hücreler	4
2.1.2 Malzemeler	5
2.1.3 Sinyaller	17
2.1.3.1 Biyokimyasal sinyaller	18
2.1.3.2 Fiziksel sinyaller	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1 Deney Tasarımı	23
3.2 Gereç	24
3.3 Yöntem	25
3.3.1 Doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu	25
3.3.1.1 İpek fibroin Eldesi	25
3.3.1.2 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analizi	27
3.3.1.3 Elektroçirime ile ipek fibroin rastgele nano-lifli doku iskelelerinin üretimi	27
3.3.1.4 Elektroçirime ile ipek fibroin yönlendirilmiş nano-lifli doku iskelelerinin üretimi	27

3.3.1.5 Mikroyapı analizi.....	28
3.3.1.6 Fiber yönlenme derecesi analizi	28
3.3.1.7 <i>In vitro</i> biyobozunurluk testi.....	29
3.3.1.8 Mekanik analiz.....	30
3.3.1.9 İpek fibroin iskelelerin sterilizasyonu ve hücre ekimine hazırlanması	31
3.3.2 Hücre kültürü çalışmaları.....	34
3.3.2.1 Düz kas hücrelerinin (DKH) Kültürü, Pasajlanması ve Stoklanması	34
3.3.2.2 DKH'lerin büyüme kinetiğinin çıkarılması	36
3.3.2.3 DKH'lerin ipek fibroin iskele üzerine tutunma kinetiğinin belirlenmesi	37
3.3.2.4 İpek fibroin iskelelerin sitotoksikite testi	38
3.3.2.5 DKH'lerin ipek fibroin iskele üzerinde canlılıklarının belirlenmesi ..	39
3.3.2.6 DKH'lerin ipek fibroin iskele üzerindeki morfolojilerinin incelenmesi	40
3.3.2.7 Dinamik kültür çalışmaları.....	41
3.3.2.8 İmmünofloresans (IF) boyamalar	43
3.3.2.9 Akış sitometrisi.....	44
3.3.3 İstatistiksel Analizler	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. İpek fibroin eldesi ve FTIR Analizi.....	46
4.2 Elektroğirme ile ipek fibroin rastgele nano-lifli doku iskelelerinin üretiminin optimizasyonu	48
4.3 Elektroğirme ile ipek fibroin yönlendirilmiş nano-lifli doku iskelelerinin üretiminin optimizasyonu	51
4.4 Üretilen ipek fibroin iskelelerin mikroyapı analizleri.....	55
4.5 Üretilen iskelelerin <i>in vitro</i> biyobozunurluğu	60
4.6 İpek fibroin iskelelerinin mekanik özellikleri	62

4.7 DKH Kültürü.....	63
4.8 DKH'lerin büyüme kinetiği.....	63
4.9 DKH'lerin iskele üzerine tutunma kinetiğinin belirlenmesi.....	64
4.11 DKH'lerin iskele üzerindeki canlılıkları.....	66
4.12 DKH'lerin iskele üzerindeki morfolojileri.....	69
4.13 DKH ekilmiş iskelelerin mekanik analizi.....	72
4.14 İmmünofloresans boyamalar	74
4.15 Akış sitometrisi analizleri.....	77
5. TARTIŞMA	80
5.1 İpek fibroin ve eldesi.....	80
5.2 Rastgele ve yönlendirilmiş ipek fibroin fiber yapılı iskele üretimi	82
5.3 Hücre kültürü çalışmaları	87
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	93
KAYNAKLAR DİZİNİ	94
TEŞEKKÜR	115
ÖZGEÇMİŞ.....	116

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Doku mühendisliği yaklaşımının üç temel elemanı.....	4
Şekil 2. Farklı por çaplarına sahip yüzeye tutunmuş MG63 hücreleri. (Por çapları A'dan F'ye sırasıyla 0.2, 0.4, 1, 3, 5 ve 8 mm dir) (S. J. Lee et al., 2004).....	10
Şekil 3. Standart bir elektroğirme düzeneği.....	12
Şekil 4. Döner toplayıcı düzeneği (Turuncu oklar tambura doğru çekilen fiberleri göstermektedir.).....	14
Şekil 5. Paralel toplayıcı düzeneği.....	15
Şekil 6. Farklı dokuların doğal ECM'lerinin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri. (Aortik Kapakçık ve ince bağırsak izotropik, Tendon ise anizotropik özellik göstermektedir.) (Jun et al., 2018).....	16
Şekil 7. Doğal Özofagus doku kesitinin Hematoksilen ve Eozin boyama fotoğrafı. (M harfi mukozayı, SM harfi submukozayı, Dikdörtgen içindeki alan uzunlamasına yönlenmiş, Üçgen içindeki alan ise dairesel yönlenmiş düz kas hücrelerini belirtmektedir.) (Hou et al., 2016).....	17
Şekil 8. Tek eksenli çekme biyoreaktör sistemi fotoğrafı.....	21
Şekil 9. Bu tez çalışmasının genel deney plan şeması.....	23
Şekil 10. Kozaların serisinden arındırılma işleminin fotoğrafları.....	25
Şekil 11. Her iki çözücü sisteminde de tamamen çözülmüş ipek filamentlerinin fotoğrafı.....	26
Şekil 12. Yüklenmiş ve diyalize hazır selüloz membranların fotoğrafı.....	26
Şekil 13. Işık mikroskobu ile elde edilmiş fotoğraf üzerinden yönlenme derecesi analizi.....	29
Şekil 14. Proteaz XIV içine bırakılmak üzere kesilmiş doku iskeleler.....	29
Şekil 15. Mekanik Analiz cihazı çenelerine yerleştirilmiş elektroğrilmüş ipek fibroin iskelesini fotoğrafı.....	30
Şekil 16. İpek Fibroin İskelelerin CellCrown'lara yerleştirilmesi. A) alüminyum folyo üzerine eğrilmüş ipek fibroin iskele, B) üzerinden iskele	

alınmış boş alüminyum folyo, C) boş CellCrown çerçeve, D) iskele yerleştirilmiş CellCrown çerçeve ve E) %70 etanol ile muamele edilmiş iskele takılmış CellCrown.32

Şekil 17. Silindirik iskeleye hücre ekimi fotoğrafı. Kriyo tüp içerisinde yerleştirilmiş iskele (solda) ve içine hücre süspansiyonu verilmiş iskele (sağda).33

Şekil 18. Dinamik kültürde kullanılan çekme biyoreaktörü sistemi. A harfi motor sistemini, B harfi güç kaynağını, C harfi ise reaktör haznesini ifade etmektedir.41

Şekil 19. Axo Cell Stimulator yazılımı kullanılarak oluşturulan 3 günlük çekme protokolü örneği42

Şekil 20. Üretilen silindirik iskelelerin reaktör haznesine cerrahi suture kullanılarak sabitlenmesi.42

Şekil 21. Liyofilize edilmiş, saflaştırılmış ipek fibroin fotoğrafı46

Şekil 22. LiBr çözücü sisteminden elde edilmiş ipek fibroin FTIR spektroskopisi. Kırmızı, yeşil ve mavi daireler sırası ile karakteristik 1644 cm^{-1} C-O gerilmesi, 1516 cm^{-1} N-H deformasyonları ve 1235 cm^{-1} C-N gerilmesi ile N-H bükülmesini göstermektedir.47

Şekil 23. Üçlü çözücü sisteminden elde edilmiş ipek fibroin FTIR spektroskopisi. Kırmızı, yeşil ve mavi daireler sırası ile karakteristik 1641 cm^{-1} C-O gerilmesi, 1518 cm^{-1} N-H deformasyonları ve 1237 cm^{-1} C-N gerilmesi ile N-H bükülmesini göstermektedir.47

Şekil 24. %15 (w/v) Üçlü çözücü sistemi ile elde edilmiş ipek fibroin solüsyonunun elektroegirme işlemi sonucu alüminyum folyo üzerindeki oluşmuş damlacık yapıları. Düzgün fiber oluşumu gözlenememiştir.48

Şekil 25. Seçilen parametreler sonucu eğrilmiş %15 (w/v) ipek fibroin fiberlerinin görüntüleri. Resimler soldan sağa sırasıyla, alüminyum folyo üzerine toplanmış, ters faz mikroskopta 20x büyütme ve stereo mikroskop görüntüsüdür. Ölçek çizgisi $40 \mu\text{m}$ 'ye denk gelmektedir51

Şekil 26. Birbirinden ayrı iki toplayıcı plaka arasında yönlendirilmiş fiberlerin fotoğrafları52

- Şekil 27.** Farklı parametrelerde eğrilmiş yüzeylerin yönlenme oranlarının grafiği. Her üç grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür. (** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).....53
- Şekil 28.** Dönen tambur sistemi kullanılarak üretilen silindirik iskeleler55
- Şekil 29.** Farklı yönlendirme teknikleri ile eğrilmiş yüzeylerin yönlenme oranlarının grafiği. Paralel plaka ile tambur ve rastgele grubunu arasında ve tambur ile rastgele grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülmüştür. (** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$)55
- Şekil 30.** LiBr çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde elektroegirilmesi ile elde edilmiş nanolifli yapının 1000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 100 μm 'ye denk gelmektedir.....56
- Şekil 31.** LiBr çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde elektroegirilmesi ile elde edilmiş nanolifli yapının 50000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 2 μm 'ye denk gelmektedir.....56
- Şekil 32.** LiBr çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde elektroegirilmesi ile elde edilmiş nanolifli yapının %70 etanol ile muamele edildikten sonra 1000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 100 μm 'ye denk gelmektedir.....57
- Şekil 33.** LiBr çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde elektroegirilmesi ile elde edilmiş nanolifli yapının %70 etanol ile muamele edildikten sonra 50000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 2 μm 'ye denk gelmektedir.....57
- Şekil 34.** Üçlü çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde elektroegirilmesi ile elde edilmiş nanolifli yapının 5000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Yoğun damla oluşumu gözlenmiştir. Ölçek çizgisi 20 μm 'ye denk gelmektedir.58
- Şekil 35.** Üçlü çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde elektroegirilmesi ile elde edilmiş nanolifli yapının 50000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 2 μm 'ye denk gelmektedir.....59

- Şekil 36. LiBr çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde paralel plaka kullanılarak elektroğirilmesi ile yönlendirilmiş nanolifli yapının 1000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 100 µm'ye denk gelmektedir.....59**
- Şekil 37. LiBr çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde döner tambur sistemi kullanılarak elektroğirilmesi ile yönlendirilmiş nanolifli yapının 1000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 100 µm'ye denk gelmektedir.60**
- Şekil 38. İpek fibroin iskelesinin Gerilim/gerinim eğrisi.....62**
- Şekil 39. Pasaj 4 düz kas hücrelerindeki tepe ve vadi oluşumlarının 5x büyütmedeki ışık mikroskobu görüntüsü. A harfi tepe oluşumunu B harfi ise vadi oluşumun göstermektedir. Ölçek çizgisi 200 µm'ye denk gelmektedir. .63**
- Şekil 40. DKH'lerin kültür kabındaki büyüme kinetiği grafiği.....64**
- Şekil 41. DKH'lerin ipek fibroin üzerinde büyüme kinetiği grafiği.64**
- Şekil 42. DKH'lerin iskeleye tutunma kinetiği grafiği.....65**
- Şekil 43. DKH ile yapılan ipek fibroin sitotoksisite testi grafiği. (100%: 1/1 oranında ekstrakt içeren besi yerini, 50%: 1/2 oranında ekstrakt içeren besi yerini, 25%: 1/4 oranında ekstrakt içeren besi yerini, Hücre Kontrol; Hiçbir prosedür uygulanmamış taze besi yerini, Pozitif Kontrol ise; %10 (v/v) oranında DMSO içeren serumlu besi yerini ifade etmektedir.) (*p≤0.05, ***p≤0.001)66**
- Şekil 44. İpek fibroin iskele üzerindeki DKH'nin 1500x büyütmedeki SEM görüntüsü. Hücrelerin rastgele iskele üzerinde yayılan bir morfoloji gösterdiği görülmüştür. Ölçek çizgisi 50 µm'ye denk gelmektedir.69**
- Şekil 45. DKH'lerin cam yüzeydeki morfolojisinin SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 200 µm'ye denk gelmektedir.....71**
- Şekil 46. DKH'lerin ipek fibroin iskele üzerindeki morfolojisinin SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 100 µm'ye denk gelmektedir.72**
- Şekil 47. DKH ekilmiş ipek fibroin iskelesinin gerilim/gerinim eğrisi.73**

- Şekil 48. Sekonder antikorun doğru çalıştığını gösteren IF boyamaların sonuçları. Ölçek çizgileri 25 µm'ye denk gelmektedir. Mavi renk DAPI ile işaretlenmiş çekirdeği, Yeşil renk ise α-SMA' yı ifade etmektedir.74**
- Şekil 49. Yönlendirilmiş yüzeylerde kültürü yapılan DKH'lerin α-SMA ifadelerinin fotoğrafları. Mavi renk DAPI ile işaretlenmiş çekirdeği, Yeşil renk ise α-SMA'yı ifade etmektedir. (Ölçek çizgileri 5x fotoğrafları için 200 µm'ye, 20x fotoğrafları için ise 50 µm'ye denk gelmektedir.)75**
- Şekil 50. Plastik kültür kabında kültürü yapılan DKH'lerin α-SMA ifadelerinin fotoğrafları. Mavi renk DAPI ile işaretlenmiş çekirdeği, Yeşil renk ise α-SMA' yı ifade etmektedir. Ölçek 100 µm'ye denk gelmektedir. ...76**
- Şekil 51. Kültür kabı ve yönlenmiş yüzeyde kültürü yapılan hücrelerin α-SMA ifadelerinin fotoğrafları. (Ölçek çizgileri soldaki fotoğraf için 100 sağdaki fotoğraf için 50 µm'yi ifade etmektedir.).....77**
- Şekil 52. Antikor ile işaretlenmemiş düz kas hücreleri ile yapılmış akış sitometri verisi.....78**
- Şekil 53. İskele üzerinde farklı çekme miktarlarına maruz kalmış hücrelerin α-SMA antikoruna ile işaretlenmiş akış sitometrisi verileri78**
- Şekil 54. Farklı çekme miktarları ile α-SMA ifadesi gösteren hücre popülasyon ilişkisi grafiği. %2 çekme grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılık görülmüştür. (**p≤0.01)79**

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Çeşitli malzemelerin mekanik özellikleri.....	9
Tablo 2. Doku mühendisliği iskele üretim yöntemleri.....	11
Tablo 3. Elektroğirme işlemindeki ana parametreler ve bu parametrelerin fiber morfolojisi üzerine olan genel etkileri.....	13
Tablo 4. Bazı temel büyüme faktörü aileleri.	18
Tablo 5. Bu tez çalışmasında kullanılan başlıca sarf malzemeleri listesi.....	24
Tablo 6. ISO 10993-12'ye göre ekstrakt hazırlama kriterleri. Tez çalışmasında kullanılan ipek fibroin iskeleler için kullanılan özellikler altı çizilerek belirtilmiştir.	38
Tablo 7. LiBr çözücü sistemi ile üretilen ipek fibroin elektroğirmesi için denenen parametreler.....	49
Tablo 8 LiBr çözücü sistemi ile üretilmiş ipek fibroinlerin farklı parametrelerde eğrilmesi sonucu oluşan fiber yapılar. Ölçek çizgileri 40 μm 'ye denk gelmektedir.	49
Tablo 9. Fiber yönlenmesi için denenen parametreler	52
Tablo 10. Yönlenme oranının hesaplanmasında kullanılan fotoğraflardan bazıları.....	53
Tablo 11. Farklı teknikler ile üretilen yönlenmiş yüzeyler	54
Tablo 12. 5U proteaz ve PBS içerisindeki doku iskelelerinin haftalık fotoğrafları.....	61
Tablo 13. DKH'lerin rastgele fiber yapılı iskele üzerindeki Live&Dead fotoğrafları. Ölçek çizgileri 200 μm 'ye denk gelmektedir.....	67
Tablo 14. DKH'lerin yönlenmiş fiber yapılı iskele üzerindeki Live&Dead fotoğrafları. Ölçek çizgileri 100 μm 'ye denk gelmektedir.....	68
Tablo 15. İpek fibroin iskele ve cam üzerindeki DKH'lerin SEM görüntüleri. Rastgele fiber yapıda ipek fibroin ve cam yüzeyler üzerinde kültive edilen hücrelerin morfolojileri arasında fark görülmemektedir.	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
ESD	Endoskopik submukozal diseksiyon
ECM	Ekstrasellüler matriks
kPa	Basınç Birimi (Kilopaskal)
ESB	Biyomalzeme Avrupa Birliği
PCL	Polikaprolakton
PLLA	Poli (L-laktik asit)
PLGA	poli (DL lactic acid-ko-glikolik asit)
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi
MPa	Basınç Birimi (Megapaskal)
GPa	Basınç Birimi (Gigapaskal)
mm	Uzunluk Birimi (milimetre)
CAD	Bilgisayar destekli dizayn
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
w/v	Konsantrasyon Birimi (kütle/hacim)
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
LiBr	Lityum bromür
kDa	Atomik kütle birimi (kilo dalton)

MATAL	Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
DKH	Düz kas hücresi
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	Fötal buzağı serumu
DMSO	dimetilsülfoksit
MTT	3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
EthD-1	Etidyum Homodimer-1
anti α -SMA	anti- α -smooth muscle actin antikoru
PFA	Paraformaldehit
NH ₄ Cl	Amonyum klorür
DAPI	4',6 Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride

1.GİRİŞ

İşlevini yerine getiremeyecek durumda zarar görmüş doku ve organları tekrar fonksiyonel hale getirebilecek yaklaşımları keşfetmek ve geliştirmek insanoğlunun büyük hayallerinden biridir. Bu yaklaşımların araştırılmasını ve gelişmesini içeren modern rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanı yaklaşık olarak 40 yıllık bir geçmişe sahip olup ancak 1993 yılında doku mühendisliği adını alabilmiştir (Langer & Vacanti, 1993). Standart tıp yaklaşımlarının yetersiz kaldığı noktalarda malzeme bilimi, biyoloji, kimya, tıp ve mühendislik gibi birçok farklı alandan beslenen disiplinler arası bir alan olan doku mühendisliği şu ana kadar pek çok farklı yaklaşımlar ile doku fonksiyonlarını iyileştirmeye ve geliştirmeye çalışmıştır. Bu farklı yaklaşımlar kullanılarak üretilen doku mühendisliği ürünleri üretra (A. Raya-Rivera et al., 2011), kalp kapakçığı (Cebotari et al., 2006), mesane (Atala et al., 2006) ve vajina (A. M. Raya-Rivera et al., 2014) gibi dokularda klinikte kullanılmıştır. Doku mühendisliği yaklaşımlarının kullanıldığı bir diğer organ olan özofagus ile ilgili çalışmalar ise son yıllarda oldukça popülerlik kazanmıştır (Arakelian et al., 2018; Jones et al., 2019).

Özofagus kanseri dünya çapında en yaygın 8. kanser tipi olup sadece ABD’de 2020 yılında 18 bin yeni vakaya ve yaklaşık 16 bin ölüme sebep olmuştur (Howlander, 2017). Bu kanser vakalarının tedavisinde endoskopik rezeksiyon standart uygulama olsa da son yıllarda özellikle büyük lezyonlara güvenli bir şekilde müdahale etme şansı veren endoskopik submukozal diseksiyon (ESD) yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Fakat, bu söz konusu ESD uygulamaları sonrasında özofagusta oluşan striktürler ciddi birer problem haline gelmiştir (Funakawa et al., 2015; Shi et al., 2014). Bu striktürlerin tedavisinde standart olarak kullanılan balon dilatasyonu tekniğinde ise özofagusta perforasyon gibi ciddi problemler oluşabilir. Kanser dışında konjenital veya özellikle çocuklarda kostik yaralanmalara bağlı oluşan durumlar da ise özofagus replasmanına ihtiyaç duyulabilmektedir. Konjenital sebepli oluşan atrezilerde genellikle cerrahi müdahale ile devamlılığı bozulmuş olan özofagus mide ile birleştirilir. Fakat, bu cerrahi müdahale sonucu sızıntı, striktür, reflü veya özofagus dismotilitesi gibi yaşam kalitesini düşürecek komplikasyonlar oluşabilmektedir (E. Lee et al., 2017). Ayrıca, uçtan uca bu birleştirme işleminin mümkün olmadığı uzun aralıklı

atrezilerde mide bölmesi, spiral miyotomi gibi özofagus uzatma teknikleri veya kolon, jejunal ve mide interpozisyonu gibi özofagusun yerini tutabilecek yapılar kullanılabilir (E. Lee et al., 2017; Zani et al., 2009). Fakat, kullanılan tüm bu teknikler sonucu gene sızıntı, striktür, reflü veya özofagus dismotilitesi gibi komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır. Bu sebeplerden dolayı özofagus ile ilgili yaşanan hastalıkların tedavisinde kullanılabilir alternatif yaklaşımlar aranmaya başlanmıştır. Doku mühendisliği yaklaşımları kullanılarak sentetik, doğal polimerlere veya deselülerize matrikslere düz kas hücreleri veya epitel hücreleri ekilerek oluşturulan doku mühendisliği ürünleri gibi alternatif tedavi yöntemleri geliştirilmektedir (Tan et al., 2012). Fakat özofagus anatomik olarak çok kompleks bir yapı olduğundan, özofagusa yönelik geliştirilecek bir doku mühendisliği ürününde göz önüne alınması gereken birçok faktör vardır.

Özofagus, boyun, toraks ve karın bölgesinden geçen yaklaşık 20 cm uzunluğunda kaslı yapıda olan, sıvı ve gıda iletimini sağlayan yassı epitel, boyuna ve çevresel olarak yönlendirilmiş düz kas ve fibroblast hücrelerinden oluşan silindirik bir yapıdır (Menezes et al., 2020; Zhu et al., 2017). İçerdiği farklı hücre tipleri ve farklı katmanlarından dolayı bu dokuya yönelik geliştirilecek doku mühendisliği ürünleri peristaltik aktiviteye, uygun elastisiteye ve mekanik dayanıma sahip olmalıdır (Poghosyan et al., 2016). Bu karakteristik özellikleri elde etmek için de doğru malzeme seçimi, bu malzeme ile doğru mikro yapının oluşturulmasının yanında bu yapı üzerinde kültüre edilecek hücrelerin nativ özofagus yapısındaki gibi davranabilmeleri için gerekli sinyallerin sağlanabilmesi gerekmektedir (Schizas et al., 2020).

Yapılan bu yüksek lisans tezinde özellikle özofagusa yönelik, doğal bir polimer olan ipek fibronin elektroçirme yöntemi ile yönlendirilmiş doku iskeleleri üretilmesi, bu iskeleler üzerinde düz kas hücrelerinin statik ve çekme biyoreaktörü kullanılarak dinamik kültürünün gerçekleştirilmesi ve bu dinamik kültürün söz konusu hücreler üzerindeki etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Yönlendirilmiş yüzeylerde yapılan kültür ile nativ özofagus dokusu taklit edilmeye çalışılırken çekme biyoreaktörünün kültür sırasında kullanılması ile nativ dokudaki düz kas hücrelerinin maruz kaldığı mekanik stres taklit edilmeye çalışılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

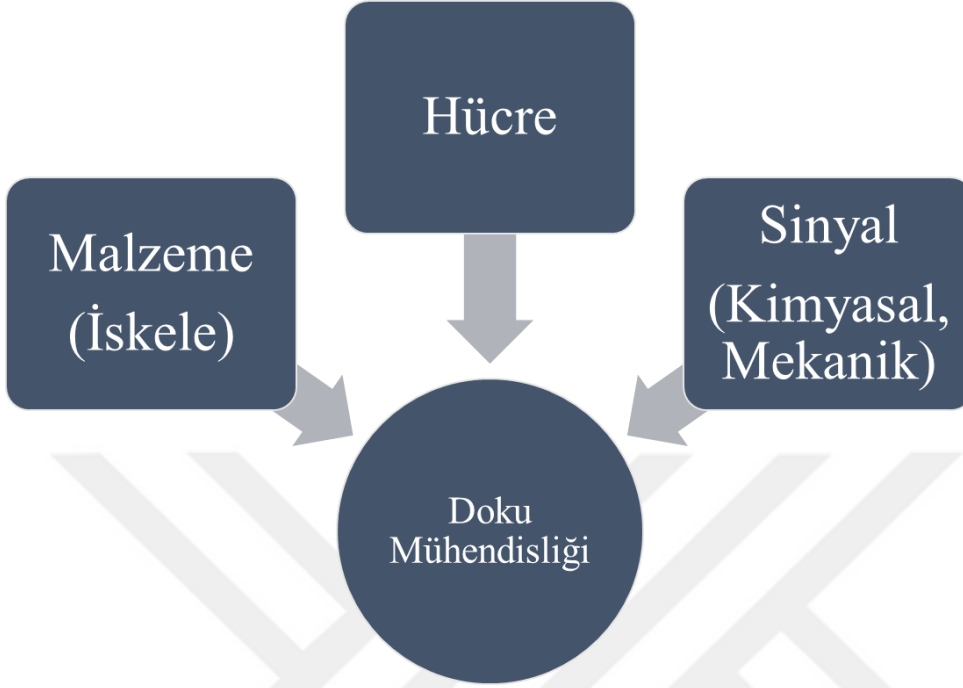
2.1 Doku Mühendisliği

Son ürünleri sayesinde tıp ve sağlık hizmetlerini kökünden değiştirebilecek doku mühendisliği, 1993 yılında Langer ve Vacanti tarafından yaşam bilimleri ile mühendislik yaklaşımlarının beraber kullanılarak işlevini kaybetmiş doku ve organların fonksiyonlarının geri kazandırılması, korunması veya geliştirilmesini hedefleyen bir araştırma alanı olarak tanımlanmıştır (Langer & Vacanti, 1993). Doku mühendisliği her ne kadar adını 1993 yılında almış olsa da bu alandaki ilk çalışmalar 1970'li yıllarda otolog sentetik deri greftleri ile başlamıştır (Hauben et al., 1982). Günümüzde ise artan popülerliği ve farklı mühendislik yaklaşımları sayesinde sinir, kemik, kırık, kas gibi her türlü doku ve organ için çalışmalar yürütülmeye devam etmektedir. (Camarero-Espinosa et al., 2020; Dong et al., 2020; Eivazzadeh-Keihan et al., 2020; Madhusudanan et al., 2020).

Doku mühendisliği çalışmalarına duyulan ihtiyaç, modern tıpta tedavi için kullanılan farmakoloji ve transplantasyon temelli yaklaşımlarının yetersiz kaldığı durumlardan ortaya çıkmaktadır. İlaç kullanımı içeren farmakoloji temelli yaklaşımlar ancak geri dönüşümü mümkün olan noktaya kadar hasar görmüş dokuların tedavisi için kullanılabilirdiğinden bu grup dışında kalan hastalıklar için kullanışsızdır. Bunun yanında her ne kadar birçok organ ve dokunun transplantasyonu mümkün olsa da tarihin hiçbir noktasında ihtiyacı karşılayacak yeterli donör bulmak mümkün olmamıştır (Vacanti & Vacanti, 2013). Bu klasik tedavi yöntemlerinin eksik kaldığı durumlarda doku mühendisliği yaklaşımlarına başvurulmuştur.

Doku mühendisliği yaklaşımları özünde malzeme, hücre ve sinyal olmak üzere üç ana elementin tek tek veya farklı kombinasyonlarla kullanılması prensibine dayanır (Şekil 1). Sadece, çeşitli malzemeler kullanılarak üretilen doku iskelelerinin hasarlı bölgeye yerleştirilmesi ve bölgedeki hücrelerin hasarlı bölümü, iskeleyi bir model olarak kullanarak iyileştirmesi mümkündür. Ayrıca, sadece otolog hücrelerin ve kök hücrelerin kişilerden izole edilip *in vitro* ortamda çoğaltılıp hasarlı bölgeye enjekte edilmesi veya küçük hasarlı bölgelerde sadece büyüme

faktörlerinin kullanılması, hücrelere verdiği sinyaller sonucu iyileşme görülmesi de mümkündür.



Şekil 1. Doku mühendisliği yaklaşımının üç temel elemanı

Fakat, birçok doğal doku, yapıları ve fonksiyonları bakımından oldukça komplekslerdir. Ve doğal dokuların fonksiyonunu pek çok açıdan taklit etmek için malzeme, hücre ve sinyaller birlikte kullanılır. Bu sebeple söz konusu yapıların doğal hallerine en yakın şekilde taklit edilebilmeleri için doğru malzeme ve malzemenin işlenme yönteminin seçilmesi, yeterli ve uygun hücre tipi kullanılmasının yanında orantılı, sürdürülebilir sinyal sağlanması gereklidir (Nerem & Schutte, 2013).

2.1.1 Hücreler

Hücreler, pek çok doku mühendisliği çalışmasının en önemli parçalarından biridir. Hücreler alındığı kaynağa göre otolog, allojenik ve ksenojenik olmak üzere üç ana kategoriye ayrılabilirler. Otolog hücreler, hastanın kendisinden izole edilip *in vitro* ortamda çoğaltılarak kullanılabilirler. Bu tip hücreler hastada immün yanıt oluşturmayacağından ne kadar doku mühendisliği çalışmaları için en uygun tercihlerden biri olsa da çoğu durumda yeterli miktarda hücrenin hastadan izole

edilmesi mümkün olmamaktadır. Elde edilebilen hücrelerin de *in vitro* ortamda üretilebilmesi için çok çeşitli güvenlik regülasyonlarını sağlayabilmiş merkezlerde yapılması gerektiğinden oldukça yüksek maliyetlerle mümkün olmaktadır. Allojenik hücreler iste hasta dışında başka bir insandan alınan hücreleri temsil edip immün yanıt oluşturma riskinin yanında potansiyel olarak başka hastalıkları da taşıma ihtimaline sahiptir. Ksenojenik hücreler ise tamamen farklı bir tür canlıdan alınan hücreler olup kullanımı doku mühendisliği çalışmalarında sınırlıdır (Grounds, 2018). Ototog veya allojenik kaynaktan alınabilen kök hücreler ise plastisitelerine göre doğru şartlar altında farklı hücre tiplerine farklılaşma özelliğine sahip özel hücre grupları olup doku mühendisliği için en sık kullanılan hücre tipleridir. 2006 yılında Takahashi ve Yamahaka tarafından geliştirilen indüklenmiş pluripotent kök hücre teknolojisi ise doku mühendisliğinde kullanılmaya başlanan bir diğer hücre tipidir. Bu hücre tipleri, kolayca izole edilebilen fibroblast hücrelerinin genetiklerinin yeniden programlanması sonucu yetişkin somatik hücrenin plastisitesi çok yüksek embriyonik kök hücre benzeri haline getirilmesi sonucu elde edilmektedir. Bu hücreler, zaman zaman eldesi invaziv, zor ve maliyetli olan diğer kök hücrelere doku mühendisliği açısından çok etkili bir alternatif haline gelmiştir (Romanazzo et al., 2019). Bazı doku mühendisliği yaklaşımlarında tüm bu hücre tipleri tek başlarına kullanılabilirse de genellikle doku mühendisliğinin bir diğer önemli parçası olan doku iskeleleri ile beraber kullanımı daha yaygındır.

2.1.2 Malzemeler

Pek çok, büyük boyuttaki ve kompleks geometrideki doku ve organlara yönelik doku mühendisliği çalışmaları biyoyumlu doğal veya sentetik polimerlerin farklı tekniklerle işlenmesi sonucu ortaya çıkan ve doku iskelesi denilen destek yapılarını kullanır. Bu doku iskelelerinin en temel görevi doğal ekstraselüller matrisi (ECM) taklit etmek ve doğal olarak hücrelere tutunacak yüzey sağlamaktır. İdeal bir doku iskelesinin biyoyumlu, kontrol edilebilir bozunma oranına, hedef doğal doku ile benzer mekanik ve mimari özelliklere ve hücre büyümesini destekleyecek porlu bir yapıya sahip olması beklenir (Roseti et al., 2017).

Biyouyumluluk, hücrelerin malzeme yüzeyine tutunabilme, büyüebilme, farklılaşabilme ve hatta zamanla kendi ECM'sini oluşturabilme gibi farklı faktörlerin değerlendirildiği ve üretilecek herhangi bir doku iskelesinde göz önünde bulundurulması gereken ilk önemli karakteristik özelliştir (O'Brien, 2011).

Bozunma oranı, doku iskelesi malzemesinin hangi hızda ve ne miktarda bozunduğunu belirten bir özelliktir. Doku mühendisliğinde doku iskelesi kullanımının amacı her ne kadar hücrelere doğal dokuya benzer bir yapı sağlamak olsa da bu tarz ürünlerin kullanıldığı yaklaşımlarda asıl amaç söz konusu hücrelerin üreyip, olgunlaşıp kendi ECM'lerini üretip hasarı iyileştirmesidir. Bu sebeple de kullanılan doku iskelelerinin zamanla vücut tarafından enzimler yardımıyla parçalanıp toksik olmayan ve immün yanıt oluşturmayacak ufak parçalara ayrılıp tamamen yok olması gerekmektedir (H. Zhang et al., 2014).

Bir doku iskelesinin mekanik özellikleri seçilen malzeme ve üretim yöntemine göre manipüle edilebilir. Bu manipülasyonların amacı doku iskelesinin fiziksel özelliklerini hedef doğal doku veya organdaki hale yaklaştırmaktır. Çünkü, genel olarak hücreler etraflarındaki ECM ile direk ilişkide olup çeşitli yollar sayesinde bu ECM'i sürekli olarak şekillendirirler. Farklı hücre tipleri ECM'leri farklı derecelerde şekillendirdiği için doku iskelesi olarak kullanılacak malzemelerin fiziksel özellikleri çok büyük bir öneme sahiptir. Örnek olarak normal bir kas dokusunun elastik modülü 10-13 kPa, adipoz dokunun 2-4 kPa iken kalsifiye olmamış kemik dokunun ise yaklaşık 80 kPa civarındadır (Urrutia et al., 2017). Metaller, seramikler ve doğal veya sentetik polimerler gibi biyomalzemeler hedef dokudakine benzer bir doku iskelesi üretmek için kullanılabilir. Biyomalzemeler, Biyomalzeme Avrupa Birliği (ESB) tarafından vücudun herhangi bir yerindeki biyolojik sistemlerle etkileşime girmek üzere tasarlanmış biyouyumlu malzemeler şeklinde tanımlanmıştır (O'Brien, 2011).

Titanyum, demir oksit, altın gibi metal veya alaşımları temelli iskeleler genellikle ortopediye yönelik doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır. İnert yapıları sayesinde vücut içindeki canlı dokuyla etkileşimi çok az olup harika mekanik özellikleri sebepleriyle tercih edilirler. Özellikle biyoaktif cam gibi seramik temelli iskeleler ise kimyasal özellikleri sebebiyle kemik doku

mühendisliğinde sıklıkla kullanılmaktadır (Okamoto, 2019). Doğal veya sentetik polimerler ise yüksek yüzey alanı/hacim oranı, kontrol edilebilir mekanik özellikleri, yüzey enerjileri, hidrofilitik / hidrofobiklik gibi pek çok özelliklerinden dolayı kemik, kırık, karaciğer, kalp, sinir, kornea ve damar gibi pek çok doku ve organ için doku iskelesi olarak kullanılmıştır (Dhandayuthapani et al., 2011; Okamoto, 2019).

Sentetik polimerler, her bir üretim partisinde homojen olarak elde edilebilmesi, kimyasal ve fiziksel özelliklerinin çok hassas bir şekilde kontrol edilebilmesi ve herhangi bir immün yanıt oluşturmaması sebebiyle doku iskelesi üretiminde sıklıkla kullanılırlar. Fakat, doğal polimerlere göre çok zayıf biyoaktivite göstermeleri ve hidroliz sonucu bozunmalarından dolayı ortama CO₂ salıp pH değerini yükseltmesi ciddi dezavantajlar olarak değerlendirilmektedir. İskele üretimi için kullanılacak pek çok sentetik polimer olmasına rağmen polikaprolakton (PCL), poli (L-laktik asit) (PLLA), poli (DL lactic acid-ko-glikolik asit) (PLGA) günümüzde hala en popüler tercihlerdir (Janoušková, 2018; Stratton et al., 2016).

Doğal polimerler klinik olarak ilk kullanılan malzemelerdir (Nair & Laurencin, 2007). Protein veya polisakkarit yapılı doğal polimerler biyoaktif özelliklere sahip olduğundan hücrelerle etkileşimi oldukça yüksek seviyelerdedir. Bu malzemeler ayrıca vücudun kendi metabolik süreçleri sayesinde işlendikleri için zamanla bozunmaya uğrarlar. Bu sebeplerden dolayı doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla doku iskelesi malzemesi olarak kullanılır (Tang et al., 2014).

Protein yapılı, kolajen, jelatin, fibrin, elastin, ve ipek (fibroin ve serisin) farklı üretim yöntemleri kullanılarak doku iskelesi üretmek için kullanılır. Kolajen, özellikle kas-iskelet sistemi ECM'lerinde yüksek miktarda bulunan doğal bir polimerdir. Çeşitli memeli hayvanlardan izole edilip farklı konsantrasyonlarda kullanılarak pek çok normal doku özelliklerine yakın doku iskeleleri elde etmek için kullanılabilir. Doku mühendisliği marketinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nden (FDA) onay almış "Collagrafts" gibi kolajen içeren kompozit ürünler de mevcuttur (Tang et al., 2014). Kolajene göre daha az immün reaksiyona sebep olacak ve deri, kırık ve bağ doku pek çok doku ve organda bulunan jelatin ise

dünya çapında yıllık yaklaşık 300 milyon kg üretim hacmine sahip iskele üretiminde sıklıkla kullanılan protein yapılı bir doğal polimerdir. Jelatin, kolajenin kısmi olarak hidrolizi sonucu üretildiği için kolajene göre kısmen daha ucuz olması ve organik çözücüler yanında suda da kolaylıkla çözünebilmesi yüzünden doku mühendisliği alanında kullanımı oldukça popülerleşmiştir (Echave et al., 2017). Fibrin, kolajene benzer yapısıyla daha çok kan pıhtılaşma sürecinde görev alan bir protein olup FDA onayı almış cerrahi yapıştırıcı olarak kullanılabilen bir biyomalzemedir. Elastin, kolajen ve jelatine göre kısmen daha sınırlı bir kullanım alanına sahip çözünmeyen ve yüksek seviyede immün yanıtı sebep olabilecek bir biyomalzemedir.

Bu tez çalışmasında da kullanılmış ipek, doku mühendisliği çalışmalarında kullanımı son yıllarda oldukça artmış, dayanıklılık, biyoyumluluk ve mekanik özellikleri bakımından bir doku iskelesi üretimi için çok uygun bir biyomalzemedir. İpek, bazı böcek larvaları tarafından fiber şeklinde koza üretmek amacıyla sentezlenen ve fibroin ve serisin adı verilen iki farklı grup proteinden oluşur. Bu fiber yapıdaki protein yapısındaki yüksek sayıdaki hidrojen bağları ve kristal yapısından dolayı diğer globular proteinlere göre çok daha sağlam olduğu bilinmektedir (Altman et al., 2003). Ayrıca ipek, allojenik ve ksenojenik kaynaklardan elde edilen diğer protein yapılı biyomalzemelere karşı çeşitli avantajları bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi ipeğin işlenme maliyetinin düşük olmasıdır. Özellikle tekstil endüstrisinde sıklıkla kullanıldığı için yılda yaklaşık 1 milyon ton üretimi yapılan ipek laboratuvar ölçeğinde ise bu tez çalışmasında da yapıldığı gibi ipek böceği kozalarından hafif alkali solüsyonlar kullanılarak serisini uzaklaştırılmış ipek fibroinin izole edilebilmesi mümkündür.

İpek fibroin, diğer protein yapılı biyomalzemelere göre çok dengeli bir elastik modülüs, esneme ve en yüksek çekme mukavemeti sağlaması bakımından pek çok doku mühendisliği uygulaması için tercih edilmiştir (Tablo 1). Ayrıca, ipek fibroinin bu mekanik özellikleri izolasyon ve saflaştırma aşamasında yapılabilecek bazı modifikasyonlarla ihtiyaca göre manipüle edilebilmektedir (Kundu et al., 2013). Örnek olarak ipek fibroin solüsyonu kullanılarak elde edilmiş film formundaki yapının çekme mukavemeti 8-10 MPa arasındayken (J. Zhou et al., 2014), hidrojel formundaki yapının mukavemeti yaklaşık 1 MPa (Luo et al., 2016) ve

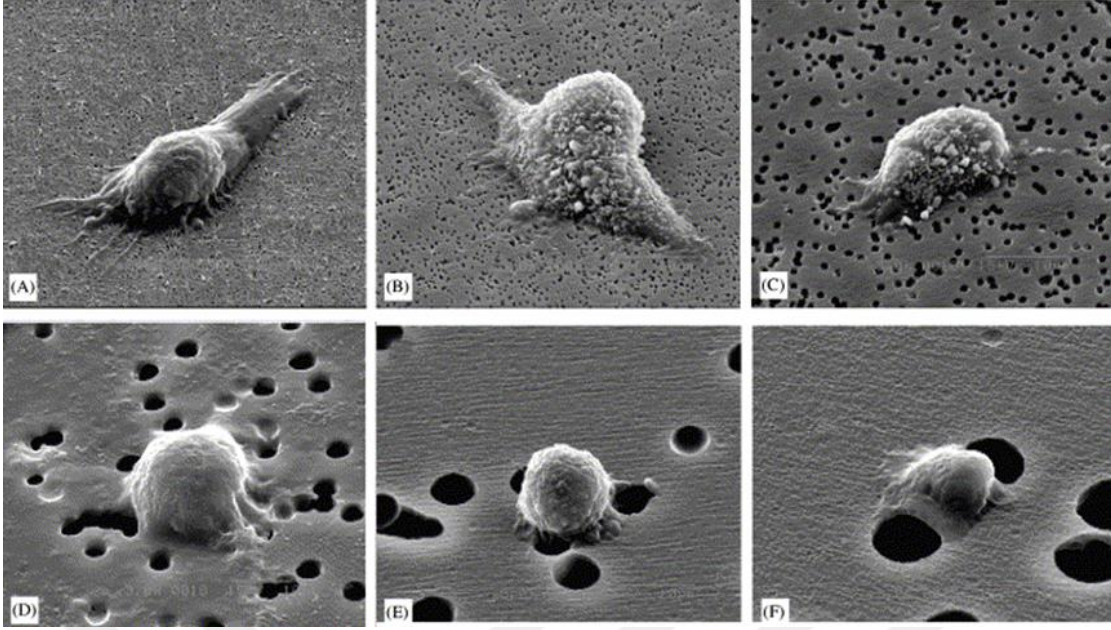
elektroğrılmış fiber formdaki yapının mukavemeti ise 30-60 MPa arasında olabilmektedir (Amiraliyan et al., 2010).

Tablo 1. Çeşitli malzemelerin mekanik özellikleri

Malzeme	En Yüksek Çekme Mukavemeti (MPa)	Elastik Modülüs (GPa)	% Uzama
<i>Bombyx mori</i> (serisinsiz)	610-690	15-17	4-16
Kolajen	0.9-7.4	0.0018-0.046	24-68
Çapraz bağlanmış Kolajen	47-72	0.4-0.8	12-16
Polilaktik Asit	28-50	1.2-3	2-6
Tendon	150	1.5	12
Kemik	160	20	3
Kevlar	3600	130	2.7

İpek fibroinden elde edilmiş hidrojeller, köpükler, filmler ve elektroğrılmış fiber damar, nöral, kemik, kırık, ligament ve tendon, kardiyak, oküler, hepatik, omurilik gibi pek çok farklı doku ve organa yönelik doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır (Kundu et al., 2013). **Bu tez çalışmasında da ipek fibroinden elde edilmiş elektroğrılmış yüzeyler, düşük maliyeti, kolay işleme süreçleri ve hedeflenen kullanım alanına uygun mekanik özellikleri sebebiyle kullanılması tercih edilmiştir.**

Bir doku iskelesinin mimari ve yüzeysel özelliklerinin hücrelerin iskele içindeki dağılımını, çeşitli proteinlerin ifadesini ve bunlara bağlı olarak da doku oluşumunu etkilediği bilinmektedir (Declercq et al., 2014). Temel olarak doku iskelesinin mimarisi dokunun gelişeceği sınırları belirlerken, bu iskelenin mikroskobik yapısı hücrelerin tutunma morfolojisi, üreme profillerini ve sonuç olarak genel davranışlarını etkilemektedir. Örnek olarak, farklı por çaplarına sahip bir yüzeye tutunan MG63 hücrelerinin morfolojileri şekil 2’de görülebilir. Daha küçük por çapına sahip yüzeydeyken hücre tutunduğu yüzey alanını artırıp daha yayılmış bir durumdayken daha büyük por çapında tutunduğu yüzey alanı azalmış ve daha yuvarlak bir hale gelmiştir. Bu por çapı değişikliği sadece hücrelerin morfolojisini değil söz konusu hücrelerin farklılaşma yeteneklerini de etkilemiştir. Por çapı arttıkça hücrelerde ALP ve osteokalsin ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (S. J. Lee et al., 2004).



Şekil 2. Farklı por çaplarına sahip yüzeye tutunmuş MG63 hücreleri. (Por çapları A'dan F'ye sırasıyla 0.2, 0.4, 1, 3, 5 ve 8 mm dir) (S. J. Lee et al., 2004)

İdeal bir doku iskelesinin mimarisi, yüksek oranda porlu bir yapıya sahip olup besin maddelerinin hücrelere difüzyonunu kolaylaştırması aynı anda metabolik atıkların da uzaklaştırılmasını desteklemelidir. Ayrıca bu porlu yapı birbirleriyle bağlantılı olup hücrelerin tüm iskele boyunca kendi ECM'lerini oluşturabilmesine izin vermelidir. Tabi ki sadece yüksek por oranına sahip iskelelerin üretilmesi ve bu iskeleler üzerinde hücre kültür edilmesi çoğunlukla hedef organ veya dokuya benzer özelliklerde doku mühendisliği ürünleri oluşturmak için yeterli değildir. Pek çok organ farklı yüzey özelliklerine sahip hiyerarşik yapılardan oluşmaktadır. Bu sebeple hedef organın mimari ve yüzey özellikleri iyi tayin edilmesi ve bu özelliklerde iskele üretmek için doğru üretim yöntemlerinin seçilmesi çok önemlidir.

Doku mühendisliği için iskele üretilirken kullanılacak pek çok biyoyumlu malzeme olduğu bu malzemeleri işlemek için de pek çok üretim yöntemi mevcuttur. Bu yöntemler genel olarak, geleneksel yöntemler ve hızlı prototipleme yöntemleri olarak sınıflandırılabilir (Tablo 2) (Eltom et al., 2019).

Tablo 2. Doku mühendisliği iskele üretim yöntemleri

Hızlı Prototipleme Yöntemleri	Geleneksel Yöntemler
Stereolitografi	Dondurarak Kurutma
Seçici Lazer Sinterleme	Gaz köpüklendirme
Biyoyazıcı	Çözücü döküm-parçacık uzaklaştırma
Eriyik Yığıma Modelleme	Elektroegirme

Geleneksel yöntemlerle elde edilen iskeleler, bir doku iskelesinde bulunması istenen yüksek oranda porlu bir yapıyı sağlayabilir. Ayrıca, bu teknikler genelde düşük maliyetli ve hızlı olması açısından da sıklıkla tercih edilir. Fakat, bu teknikler kullanılarak kompleks geometrik şekillere sahip iskeleler oluşturmak hızlı prototipleme yöntemlerine göre çok daha zordur (Eltom et al., 2019).

Hızlı prototipleme yöntemleri, bilgisayar destekli dizayn (CAD) modellerini kullanan fabrikasyon tekniklerinin tamamı olarak adlandırılabilir. Bu tekniğin en önemli özelliklerinden biri zaten mimari açıdan çok karışık olan bazı doku ve organlara uygun geometrideki iskelelerin üretilebilmesinin yanında bu iskelelerin kişiye özel olarak da modifiye edilebilmesidir. Bu yöntemleri kullanan tekniklerde doğal polimerlerin kullanılmasının zor olmasının yanında, geleneksel yöntemlere göre yüksek başlangıç maliyeti bazı çalışmalar ve araştırma grupları için dezavantaj oluşturabilmektedir (Zhao et al., 2018).

Hem geleneksel yöntemlerin hem de hızlı prototipleme yöntemlerinin kendine has avantaj ve dezavantajları olduğu bir gerçektir. Bu sebepten dolayı bir doku mühendisliği iskelesi üretirken yapılacak seçim her çalışmanın özelinde yapılmaz. **Bu tez çalışmasında oluşturulması hedeflenen iskele geometrisi silindir ve hedef organ özofagus olduğundan iskelenin bir geleneksel iskele üretme yöntemi olan elektroegirme tekniği ile üretilmesine karar verilmiştir. Bu teknik biyoaktivitesi yüksek doğal bir polimer olan ipek fibroin'in kullanılmasına izin vermiştir.**

Elektroegirme, elektrostatik gücü kullanarak polimer süspansiyonundan fiber yapılu doku iskeleleri oluşturmak için doku mühendisliği alanında sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Güç kaynağı, şırınga pompası ve iletken bir toplayıcı plakadan oluşan kısmen basit bir düzenden pek çok doğal veya sentetik polimer kullanılarak farklı amaçlara yönelik doku iskeleleri üretilebilir (Şekil 3).



Şekil 3. Standart bir elektroğirme düzeneği

Elektroğirme işleminde, yüksek voltaj altında polimer solüsyonu içindeki aynı yüklerin oluşturduğu elektrostatik güç, solüsyonun yüzey geriliminden büyük olduğu durumda ortaya çıkan sıvı damlasının Taylor konisi adı verilen geometriye dönüşüp şırınga ucundan çıkması ve negatif olarak yüklenmiş toplayıcıya doğru uzaması sonucu fiberler oluşturulur (Taylor, 1964).

Bu teknik, diğer geleneksel iskele üretim yöntemlerine göre bazı avantajlar taşımaktadır. Mikro ölçekten nano ölçeğe kadar yüksek yüzey alanına sahip fiber yapıların çok düşük maliyetlerle oluşturulabilmesi, çok geniş yelpazedeki sentetik, doğal veya bu ikisinin karışımından oluşan malzemelerle çalışmaya izin vermesi, porozite oranının ayarlanabilmesi ve farklı üretim sonrası süreçlerle yüzeysel özelliklerinin ihtiyaca göre modifiye edilebilmesi bu avantajların en önemlilerindedir (Yawen Li & Bou-Akl, 2016; H. Liu et al., 2013; Rahmati et al., 2020). Bu teknik her ne kadar kısmen düşük maliyetli, hızlı ve basit bir deneysel düzeneğe sahip olsa da son ürünün fiziksel özelliklerini değiştirebilecek pek çok parametre vardır.

Elektroeğirme işlemindeki değişkenler genel olarak solüsyon parametreleri ve proses parametreleri olarak sınıflandırılabilir. Tablo 3'te bu parametrelerin bazıları ve parametrelerin son ürünlerdeki fiber morfolojisine etkisi özetlenmiştir.

Tablo 3. Elektroeğirme işlemindeki ana parametreler ve bu parametrelerin fiber morfolojisi üzerine olan genel etkileri.

Solüsyon Parametreleri	Fiber morfolojisine Etkisi
Polimer Konsantrasyonu	Artıkça fiber çapı artar.
Solüsyon Viskozitesi	Artıkça fiber çapı artar.
Solüsyon İletkenliği	Artıkça fiber çapı azalır.
Proses Parametreleri	Fiber morfolojisine Etkisi
Voltaj farkı	Değişimine göre damla oluşumu görülebilir
Akış hızı	Artıkça fiber çapı artar, damla oluşumu görülebilir.
Toplayıcı-İğne arası mesafe	Artıkça fiber çapı azalır
Toplayıcı Geometrisi	Değiştikçe fiber yönlendiği gözlemlenebilir.

Tablo 3'te verilen bu temel parametreler optimize edilerek doğal dokuları taklit edebilecek yapay ECM'ler üretilebilir. Diğer parametrelerden daha özel olan toplayıcı geometrisi değiştirilerek makro ve mikro ölçekte anizotropik doku iskeleleri oluşturulabilir. Bu anizotropik fiber yapıları doku iskeleleri, elektroegirme sistemindeki toplayıcının manipüle edilmesi ile elde edilebilir. Genelde kullanılan sabit toplayıcı plaka yerine, dönen (tambur) toplayıcı veya paralel toplayıcı kullanılır.

Dönen toplayıcılarda fiber yönlendiği, yüksek hızın ve dönen tamburun uyguladığı mekanik olarak çekme kuvvetinin bir sonucu olarak oluşur (Şekil 4).



Şekil 4. Dönen toplayıcı düzeneği (Turuncu oklar tambura doğru çekilen fiberleri göstermektedir.)

Dönen toplayıcılarda genellikle dönme hızı kritik seviyeye ulaşana kadar arttıkça fiber yönlenebilirliği de artar. Bu kritik seviye sistemden sisteme, polimerden polimere değiştiği için literatürde pek çok farklı grup tarafından 3 m/s ile 13 m/s arasında pek çok farklı kritik dönme hızı rapor edilmiştir (Long et al., 2012; Yuan et al., 2017). Bu teknik en kolay ve kullanılan en eski yöntem olmasına rağmen bazı dezavantajları vardır. Bu sistemlerde genellikle dönme hızı arttıkça fiber çapı azalmaktadır bu da yüksek dönme hızlarına ihtiyaç duyan polimerler ve sistemlerde elde edilebilen fiber çaplarını sınırlamaktadır. Ayrıca, eğirme süresi ve doğal olarak kalınlık arttıkça yönlenebilirlik derecesi de azalmaktadır (Katta et al., 2004).

Bir diğer teknik olan paralel toplayıcı tekniğinde ise iletken iki paralel plakanın birbirlerinden belirli bir miktar uzaklaştırılması sonucu arada yalıtkan bir kısmın oluşturulması ile fiber yönlenebilirliği elde edilir (Jha et al., 2011; Linder et al., 2020). Bu teknikte yönlenebilirlik, dönen toplayıcıdaki gibi yüksek hız ve mekanik çekme kuvveti ile değil iki iletken plaka arasındaki boşluğun elektrik alanında oluşturduğu manipülasyondan kaynaklanmaktadır. Paralel plakalar kullanılarak birkaç milimetreden bir metreye kadar farklı uzunluklarda yüksek oranda yönlenebilir fiberler elde edilebilir (Jha et al., 2011; Lei et al., 2018). Ayrıca, bu teknik, dönen toplayıcı gibi ekstra deney düzeneğine ihtiyaç olmadan birbirinden

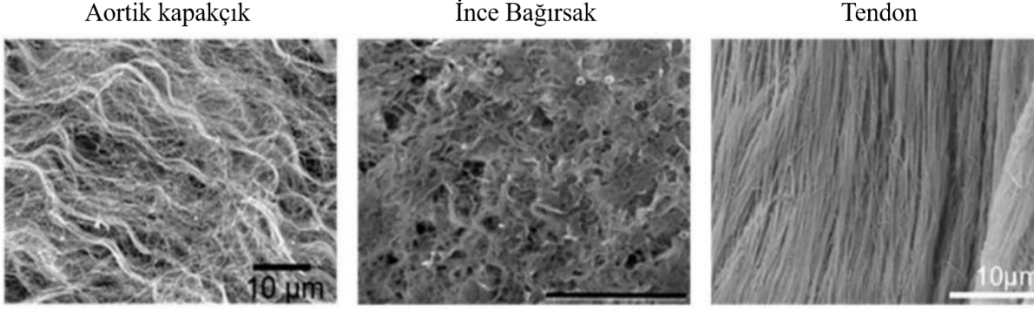
bir miktar ayrılmış sıradan iki alüminyum folyo parçasıyla kullanılabilmesi bakımından fiberlerin yönlendirilmesi için çok kolay ve düşük maliyetli bir yöntemdir (Şekil 5).



Şekil 5. Paralel toplayıcı düzeneği

Fiberleri yönlendirmek için bu iki yöntem dışında su banyosuna toplamak, ekstra manyetik alan oluşturmak, merkezkaç kuvvetini kullanmak, hava akışını kullanmak veya eğirme sonrası fiberlere germe uygulamak gibi pek çok teknik de mevcuttur. Fakat, bu teknikler dönen ve paralel toplayıcı yöntemlerine göre çok daha karmaşık deneysel kurulum gerektirdiği gibi zaten çok fazla parametreden etkilenen elektroegirme yöntemine ekstra pek çok parametre eklemektedir. **Bu sebeplerden dolayı da bu tez çalışmasında anizotropik fiber elde etme çalışmalarında dönen ve paralel toplayıcı teknikleri kullanılmıştır.**

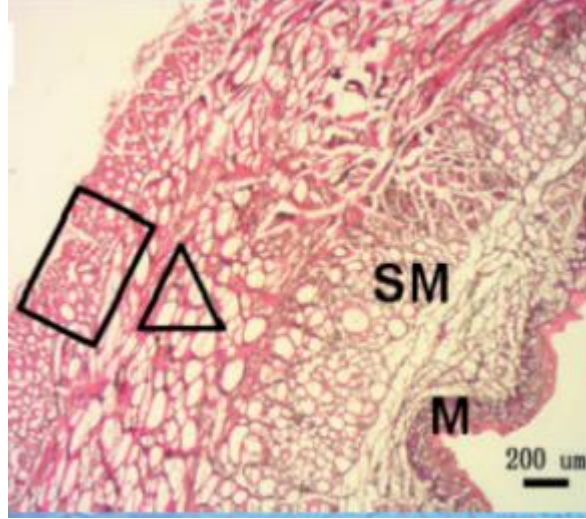
Vücutta, kalp, kan damarları, sinir dokusu, özofagus dokusu gibi pek çok doku ve organ anizotropik ve kendilerine has özel ECM'lere sahiptir (Şekil 6).



Şekil 6. Farklı dokuların doğal ECM'lerinin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri. (Aortik Kapakçık ve ince bağırsak izotropik, Tendon ise anizotropik özellik göstermektedir.) (Jun et al., 2018)

Genelde bir yöne doğru yönelme ile ortaya çıkan bu anizotropi, sadece ECM'lerde değil hücrelerde de sıklıkla görülmektedir. Zaten anizotropik ECM oluşumu genellikle hücrelerin yönelmesi sonucu oluşmaktadır. Hücre yönelmesi, isminden de anlaşılacağı gibi hücrelerin organize bir şekilde aynı yöne doğru yönelmesi olarak tanımlanabilir. Bu yönelme, embriyogenesisten hücre farklılaşmasına kadar pek çok süreçte kritik rol oynamaktadır. **Bu yüzden herhangi bir doku mühendisliği çalışması için geliştirilecek iskelelerin doğal dokudaki hücre yönelmesi destekleyecek nitelikte olmalıdır** (Yuhui Li et al., 2014).

Bu tez çalışmasına da konu olan düz kas hücreleri özofagusun muscularis propria kısmında dairesel ve uzunlamasına olmak üzere iki farklı şekilde yönelmişlerdir (Şekil 7). Bu yönelme, tüketilen gıda ve sıvıların peristaltik hareket ile mideye gönderilmesinde çok büyük rol oynamaktadır. Bu sebepten dolayı özofagusa yönelik geliştirilecek bir doku iskelesinin anizotropik olması büyük önem taşımaktadır (Zhu et al., 2017).



Şekil 7. Doğal Özofagus doku kesitinin Hematoksilen ve Eozin boyama fotoğrafı. (M harfi mukozayı, SM harfi submukozayı, Dikdörtgen içindeki alan uzunlamasına yönlenmiş, Üçgen içindeki alan ise dairesel yönlenmiş düz kas hücrelerini belirtmektedir.) (Hou et al., 2016)

Stegemann'ın yaptığı çalışmada düz kas hücrelerinin davranışlarının iskele geometrisi ile doğrudan ilişkili olduğu belirtilmiştir (Stegemann & Nerem, 2003). Elektroğirme yöntemi ile paralel olarak yönlenmiş şekilde üretilmiş iskeleler üzerinde kültür edilen düz kas hücrelerinin fiberlere paralel olarak yönlendiği gösterilmiştir (Nivison-Smith & Weiss, 2012). **Bu sebeplerden dolayı bu tez çalışmasında düz kas hücrelerinin kültürü paralel olarak yönlenmiş elektroğirilmiş yüzeylerde gerçekleştirilmiş ve bu sayede kendi doğal ECM'leri üstünde aldıkları fiziksel sinyalleri almaları sağlanmaya çalışılmıştır.**

2.1.3 Sinyaller

Bir doku mühendisliği ürünün başarıya ulaşabilmesi için doğru hücre tipi seçimi, doğru malzeme ve üretim tekniği seçimi kadar hücrelere doğru sinyalleri ulaştırabilmek de elzemdir. Bu sinyaller, büyüme faktörü veya çeşitli biyoaktif ajanlar şeklinde biyokimyasal/çözünür sinyaller olabileceği gibi mekanik uyarma şeklinde fiziksel sinyaller de olabilir (Dang et al., 2018).

2.1.3.1 Biyokimyasal sinyaller

Büyüme faktörleri ECM’de veya hücre membranında bulunan hücreler tarafından salgılanan ve evrimsel olarak korunmuş çok geniş yelpazedeki polipeptitleri tanımlamak için kullanılır (Tablo 4). Bu faktörler, hücrelerin proliferasyon, migrasyon, farklılaşma veya apoptoza uğrama gibi pek çok farklı davranışları regüle eder. Bu hücre davranışları da temel olarak doku ve organlar içindeki homeostasinin korunmasını sağlar (Mina, 2014). Bu faktörler, iskele üretiminde kullanılan biyomalzemelerle birlikte kullanılıp iskele üzerindeki hücrelere doğal çevresindeki benzer sinyaller vermek için sıklıkla kullanılır. Örnek olarak, sıçan kemik iliği kök hücreleri ekilmiş anjiyojenik ve osteojenik büyüme faktörleri içeren ipek fibroin doku iskeleleri kafataslarında defekt oluşturulmuş sıçanlara implante edilmiş ve ekilen kök hücrelerin farklılaşmaları incelenmiştir. Büyüme faktörü içeren iskelelerdeki kök hücrelerin içermeyen iskelelerdekine göre daha yüksek oranda osteblastlara ve endotel hücrelere farklılaştığı rapor edilmiştir (W. Zhang et al., 2014).

Tablo 4. Bazı temel büyüme faktörü aileleri.

Büyüme Faktörü Aileleri
Epidermal Büyüme Faktörü Ailesi
Fibroblast Büyüme Faktörü Ailesi
Hedgehog Ailesi
Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Ailesi
Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Ailesi
Tümör Nekrosis Ailesi
Damar Endotel Büyüme Faktörü Ailesi
İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Ailesi

2.1.3.2 Fiziksel sinyaller

Aynı biyokimyasal sinyaller gibi fiziksel sinyaller de pek çok hücre davranışına doğrudan etki etmektedir. Vücutta doğal koşullarda hücreler bu fiziksel sinyallere, yerçekimi ve fiziksel aktivitelerden kaynaklanan güçlerden veya direk ECM’in kendisinden maruz kalabilirler. Bu sebeple ECM’leri taklit etme amacıyla üretilmiş doku mühendisliği iskeleleri makro, mikro ve nano ölçekte hücrelere, por büyüklüğü ve oranı, yüzey sertliği, yüzey fizikokimyası gibi özellikleri aracılığıyla fiziksel sinyal sağlamaktadır. Örnek olarak, farklı bölgelerde farklı yüzey sertliği

özelliği gösteren aynı substrat üzerinde kültürü yapılan mezenkimal kök hücrelerde, hücrelerin substrat üzerindeki daha sert olan bölgelere doğru göç ettiği görülmüştür. Bu göç davranışının sebebinin söz konusu kök hücrelerin bu yüzey sertliğini pek çok hastalık durumunda ortaya çıkabilen fibröz alanlarla eşleştirdiğinden o bölgedeki homeostaziye sağlamak olduğu belirtilmiştir (Vincent et al., 2013). Ayrıca, piezoelektrik özelliğe sahip doku iskelelerinin de pek çok farklı doku ve organın rejenerasyonunda gerekli olan sinyalleri sağlayabildiği literatürde rapor edilmiştir (Castro et al., 2020). Aynı şekilde, dışarıdan uygulanabilecek manyetik ve akustik alanların da hücre davranışlarını etkileyebilecek fiziksel sinyalleri sağladığı bilinmektedir (Armstrong & Stevens, 2020).

Bu farklı fiziksel sinyallerin çeşitli yollarla biyolojik tepkilere dönüştürülmesine mekanotransdüksiyon adı verilir (Martino et al., 2018). Bu fiziksel güçlerin biyolojik bir tepkiye dönüşmeye başladığı yer direk ECM ile temasta bulunan hücre membranındaki olup oradan sitoplazmaya ve sonunda çekirdeğe aktarılır.

Bu hücre ve ECM arasındaki etkileşim fokal adhezyon adı verilen pek çok sayıdaki integrin, aktin filamentleri veya çeşitli sitoplazma proteinlerinin bütünü oluşturduğu yapılar sayesinde gerçekleşir (Orr et al., 2006). Bu fokal adhezyon proteinlerinden en önemlilerinden biri olan integrin farklı ECM proteinlerine bağlanarak hücre membranının iki tarafından da sinyal alır ve iletir. Sitoskeletal gerginliğindeki değişimler ECM'ye bağlı integrin bağlantı noktalarını çeker. Bu çekme sırasında diğer fokal adhezyon proteinlerine bağlı aktin proteinlerini deforme eder ve bu deformasyon gen ve protein ifadelerini değiştirir (Sun et al., 2016).

Gen ve protein ifadesinde değişikliğe sebep olmasından dolayı hücre davranışlarını değiştirebilen bu fiziksel sinyalleri *in vitro* koşullarda uygulayabilmek için doku mühendisliği biyoreaktörleri tasarlanmış ve üretilmiştir.

Doku mühendisliği biyoreaktörleri, kısaca *in vitro* ortamda kültürü yapılan hücrelere *in vivo* ortamdakine benzer biyolojik olarak aktif koşulları sağlayan sistemler olarak tanımlanır (Bayir et al., 2020). Farklı şekilde

tasarlanabilen bu sistemler, *in vitro* ortamda pek çok biyokimyasal ve fizikokimyasal sinyalleri kontrol etmeye yardımcı olduğu gibi pek çok farklı fiziksel sinyalleri de uygulayabilecek kapasitededir.

Karıştırıcı, perfüzyon, dönen-duvar, mekanik kuvvet veya bu prensiplerin kombinasyonunu kullanan biyoreaktörler günümüzde doku mühendisliği uygulamaları için en sık kullanılan sistemlerdir.

Karıştırıcı biyoreaktörler en basit reaktör sistemleri olup manyetik bir karıştırıcı çubuk kullanarak reaktör hazenesi içindeki hücre süspansiyonu belirlenen hızlarda karıştırır ve karıştırıcı çubuğun dönme hızına bağlı olarak hücrelere belirli miktarda kayma gerilimi uygular.

Perfüzyon biyoreaktörleri ise kapalı döngüye sahip olup doku mühendisliği ürünün içinden pompa kullanarak devamlı olarak besi ortamının belirlenen basınç ve akış hızı gibi parametreler ile geçişini sağlar. Bu geçen ortamın yarattığı basınç, iskele duvarlarında kayma gerilimi oluşmasına sebep olduğu için hücrelere fiziksel sinyaller yollamak için kullanılır.

Dönen-duvar biyoreaktörleri ise reaktör hazenesini yanal ekseninde döndürerek hücreleri mikro yerçekimi ortamına maruz bırakmaya yarayan özelleşmiş sistemlerdir.

Bu tez çalışmasında da bir örneği kullanılan mekanik kuvvet biyoreaktörleri ise hücrelere veya doku iskelelerine doğrudan mekanik germe uygulaması için geliştirilmiştir. Bu mekanik germe farklı dizaynlar yoluyla çekme, sıkıştırma veya bükme şeklinde uygulanabilir (Sladkova & de Peppo, 2014). Bu çalışmada da kullanılan çekme biyoreaktörler genelde bilgisayar kontrollü motorlara bağlanan, farklı tasarımlarda bulunabilen ve iskelelerin takılabileceği kıskaçlardan oluşur (Şekil 8) (Bayir et al., 2020).



Şekil 8. Tek eksenli çekme biyoreaktör sistemi fotoğrafı.

Vücudun farklı doku ve organlarında bulabildiği gibi özofagusta da bulunan düz kas hücreleri hem aktif germeye hem de pasif germeye maruz kalırlar. Bu germe kuvvetinin bu hücreler üzerindeki proliferasyonu, migrasyon, farklılaşma ve fenotip özellikleri üzerine olan etkileri literatürde mevcuttur. Düz kas hücreleri genelde germe kuvvetine paralel şekilde yönelip sentetik fenotip adı verilen kasılma fenotipine farklılaşırlar. Literatürde düz kas hücrelerine mekanik kuvvetin uygulandığı pek çok çalışma olmasına rağmen bu çalışmalarda genelde üç noktadan bükme uygulayan sistemler ve bu sistemlerle beraber çalışabilecek kolajen tip 1, laminin, jelatin veya fibronektin gibi doğal polimerler kaplı iki boyutlu substratlar kullanılarak yapılmıştır (Cheng et al., 2012; Guha et al., 2011; Rodríguez et al., 2015; Scherer et al., 2014; Song et al., 2012).

Tüm bu bilgiler ışığında sonuç olarak, hücrelerin konumsal olarak yönlendirilmiş organizasyonunu ifade eden hücre yönelmesi doğal dokularda sıklıkla karşılaşıp, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, membran proteinlerinin yer değiştirmesi, çekirdek gen ifadesi ve ekstraselüler matriks yeniden modellenmesi gibi çeşitli hücre davranışlarında farklılıklar yaratarak embriyogenez sırasında model oluşumunda, doku olgunlaşmasında, rejenerasyonunda ve büyümesinde

kritik bir rol oynar (Aubin et al., 2010; Yuhui Li et al., 2014). **Bu nedenle, biyomekanik, hücre biyolojisi, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları için *in vitro* ortamda mühendislik teknikleri kullanılarak hücre yönlendirilmesi çalışmalarının gerekliliği fark edilmiş ve yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmıştır** (Jia et al., 2014; Yanming Wang et al., 2014; Q. Zhou et al., 2015). **Bu sebeple de bu tez çalışmasında düz kas hücrelerinin elektroğirilerek yönlendirilmiş ipek fibroin yüzeylerde ve çekme kuvveti altında kültürü gerçekleştirilmeye çalışılmış ve hücrelerin bu koşullara karşı yanıtları incelenmiştir. Gene bu bilgiler ışığında da geleneksel cerrahi yöntemlerle tedavisi gerçekleştirilemeyen veya gerçekleştirilmesi çok riskli olan özofagus rahatsızlıklarına yönelik fonksiyonel bir doku mühendisliği yapısının oluşturulmasının temelleri atılmaya çalışılmıştır.**

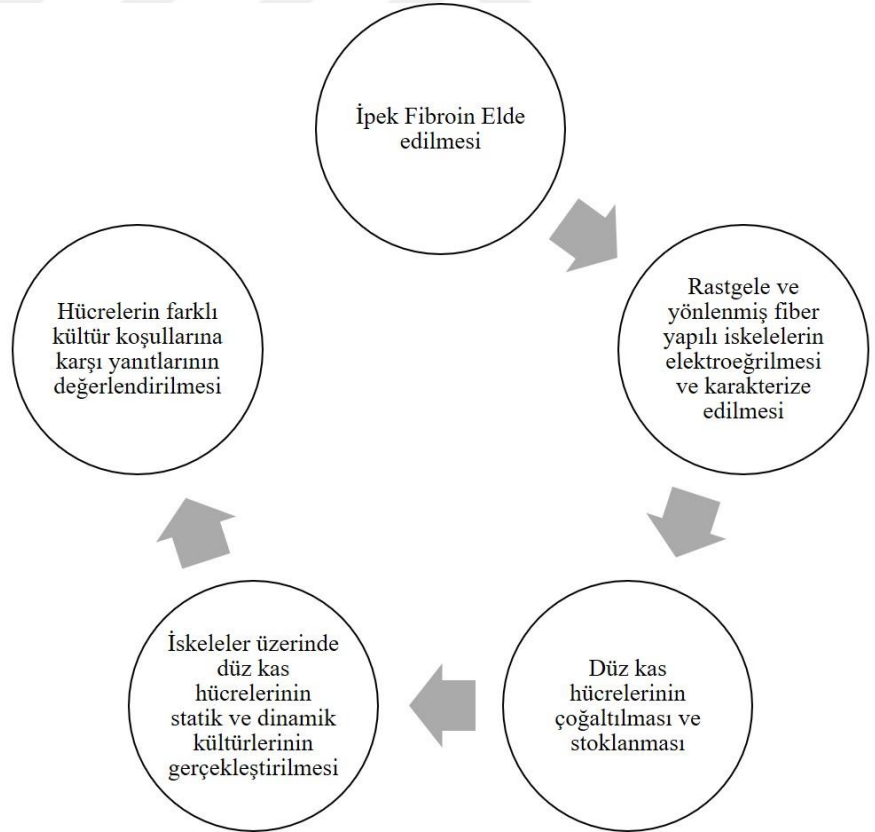


3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Tasarımı

Bu tez çalışmasının tamamı Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünde bulunan Ege Üniversitesi Biyomalzemeler ve 3 Boyutlu Biyoarafazlar Laboratuvarı (EBIOPHASE)'nda gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada kısaca, *Bombyx mori* kozalarından ipek fibroin elde edilip, bu ipek fibroinlerle elektroğirme yöntemi kullanılarak rastgele ve yönlendirilmiş fiber yapıda bulunan doku iskeleleri üretilmiştir. Üretilen bu doku iskeleleri üzerinde düz kas hücrelerinin statik ve çekme biyoreaktörü kullanılarak dinamik kültürü gerçekleştirilmiş ve bu kültür şartlarının hücre davranışlarına olan etkileri araştırılmıştır (Şekil 9).



Şekil 9. Bu tez çalışmasının genel deney plan şeması

3.2 Gereç

Bu tez çalışmasında ipek fibroin iskelelerin üretilmesi ve hücre kültürü çalışmalarında aşağıda verilmiş tabloda bulunan malzemeler kullanılmıştır (Tablo 5).

Tablo 5. Bu tez çalışmasında kullanılan başlıca sarf malzemeleri listesi

No.	Malzeme adı, kodu ve markası
1	Sodyum bikarbonat (106329, Merck, Almanya)
2	<i>Bombyx mori</i> kozaları (Bursa Koza Birlik, Türkiye)
3	Lityum Bromür (213225, Sigma, Amerika)
4	Selüloz Membran (D9277, Sigma, Amerika)
5	Şırınga Pompası (NE-300, Syringepump, Amerika)
6	Güç kaynağı
7	%98 Formik Asit (33015, Sigma, Amerika)
8	%100 Etil Alkol (Merck, Almanya)
9	CellCrown (Z742380-12EA, Scaffdex, Finlandiya)
10	15 ve 50 mL Santrifüj Tüpleri (188161, Greiner, Almanya)
11	75 ve 175 cm ² Hücre kültür kapları (50809261, Sarstedt, Almanya)
12	Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (L2113, Merck, Almanya)
13	%0.25 Tripsin/Edta solüsyonu (, L0932, Biowest, Amerika)
14	Fötal buzağı serumu (FBS) (Capricorne, Almanya)
15	Dimetilsülfoksit (DMSO) (A3672, AppliChem, Amerika)
16	Kriyo tüpler (123278, Greiner, Almanya).
17	(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) (M5655, Sigma, USA)
18	96 gözlü kültür kabı (655101, Greiner, Almanya)
19	Live&Dead Kiti (L3224, Invitrogen, , Amerika)
20	Gluteraldehit (820603, Merck, Almanya)
21	Sodyum kakodilat (C0250, Sigma, Amerika)
22	Ozmiyum tektroksit (19134, Electron Microscopy Sciences, İngiltere)
23	Anti- α -smooth muscle actin (anti α -SMA) (A5228 Sigma, Amerika)
24	Alexa Fluor® 488 sekonder antikor (ab150113, Abcam, Amerika)
25	Farklı hacimlerde serolojik pipetler (Sarstedt, Almanya)
26	24 Gözlü kültür kapları (Greiner, Almanya)
27	SMC growth medium (Rb311-500, Cell Application, Amerika)

3.3 Yöntem

3.3.1 Doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu

3.3.1.1 İpek fibroin Eldesi

Bombyx mori kozaları içindeki ipek böcekleri çıkarılıp 5 gr olacak kadar tartılıp makas ile kesilerek iyice küçük parçalar haline getirilmiştir. Kozalardaki serisini ipek fibroinden ayırmak için iki sefer 100° C’de 30 dakika boyunca %0,5 (w/v) sodyum bikarbonat (NaHCO₃) içeren distile suda kaynatılmıştır (Şekil 10).



Şekil 10. Kozaların serisinden arındırılma işleminin fotoğrafları

Bu serisinden ayırma işlemi sonrası ipek fibroin filamentleri bol distile su ile yıkanıp kuruması için 1 gün 37°C’deki inkübatöre bırakılmıştır. Serisinden uzaklaştırma yüzdesinin belirlenebilmesi için [(başlangıç ipek kozası ağırlığı- kuruma sonrası ipek filament ağırlığı)/ başlangıç ipek kozası]*100 formülü kullanılmıştır (Kundu et al., 2014).

Kurumuş filamentleri çözmek için literatürde yer alan iki farklı protokol dikkate alınarak, iki farklı çözelti, eş zamanlı olarak hazırlanmıştır (Şekil 11). İlk çözelti için %10 (w/v) filament 1:2:8 mol oranındaki (CaCl₂:su:etanol) üçlü çözücü sisteminde 6 saat 70°C’de karıştırılmış ve ipek filamentlerinin tamamen çözülmesi sağlanmıştır (Kim et al., 2003). Diğer çözelti için ise %10 (w/v) filament 9.3 M

lityum bromür (LiBr)-Su çözelti içinde 3 saat boyunca 60°C’de karıştırılmış ve çözülmesi sağlanmıştır (van Uden et al., 2019).



Şekil 11. Her iki çözücü sisteminde de tamamen çözülmüş ipek filamentlerinin fotoğrafı

Tamamen çözülmüş ipek fibroin filamentleri 9000 - 12000 kDa aralığındaki uygun boyutlarda kesilip distile su kullanılarak açılan selüloz membrana (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ABD,D9277) pipet yardımıyla yüklenip membran uçları sıkıca bağlanmıştır (Şekil 11). Ardından doldurulmuş membranlar distile suya karşı 3 gün boyunca günde 3 kere su değiştirilerek diyaliz edilerek saflaştırılmıştır (Şekil 12).



Şekil 12. Yüklenmiş ve diyalize hazır selüloz membranların fotoğrafı

Diyaliz sonunda elde edilen saflaştırılmış ipek fibroin çözeltisi 24 gözlü kültür kaplarına pipet yardımı ile alınıp daha sonra elektroegirme aşamasında kullanılmak üzere liyofilize edilmiştir (Şekil 4). Ayrıca, diyaliz sonunda elde edilen solüsyon serolojik pipet yardımıyla ölçülmüştür. Bilinen hacmindeki sıvının liyofilizasyon sonucu elde edilen katı maddeye oranlanmasıyla ipek fibroin solüsyonunun konsantrasyonu belirlenmiştir (Dyakonov et al., 2012).

3.3.1.2 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analizi

Farklı çözücü sistemlerinde saflaştırılmış ve liyofilize edilmiş ipek fibroin köpükler Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (MATAL)'inde bulunan Elmas kristal-ATR modüllü Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) cihazı ile 4 cm^{-1} çözünürlük ile $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyları arasında karakterize edilmiştir.

3.3.1.3 Elektroegirme ile ipek fibroin rastgele nano-lifli doku iskelelerinin üretimi

Elektroegirme işlemi LiBr ve üçlü çözücü sistem sonucu elde edilen ipek fibroinlerle denenmiş ve fiber yapıları değerlendirilmiştir. Liyofilize halde bulunan ipek fibroin köpükleri %98 (v/v) formik asit içerisinde %15 (w/v) konsantrasyonda 3 saat boyunca çözdürülmüş ve kısa sürelerde (1-2 dakika) 12-15 kV voltaj farkı, 0,15-2 mL/s akış hızı ve 10-15 cm arasındaki toplayıcı uzaklığı ile elektroegirme işlemlerine maruz bırakılmış. Denenen bu farklı parametreler sonucu oluşan fiber yapıları homojenlik, fiber çapı ve boncuk oluşum miktarı bakımından incelenmiştir. Bu incelemeler için cam lameller kullanılmış olup fiberler faz kontrast ışık mikroskopunda incelenmiştir.

3.3.1.4 Elektroegirme ile ipek fibroin yönlendirilmiş nano-lifli doku iskelelerinin üretimi

Rastgele yapıdaki fiberleri elde etmek için yapılan egirme işlemi için alüminyum folyo kaplı dikdörtgen iletken plaka kullanılırken, yönlendirilmiş yapıdaki fiberleri elde etmek için gene alüminyum folyo kaplı aralarında boşluk

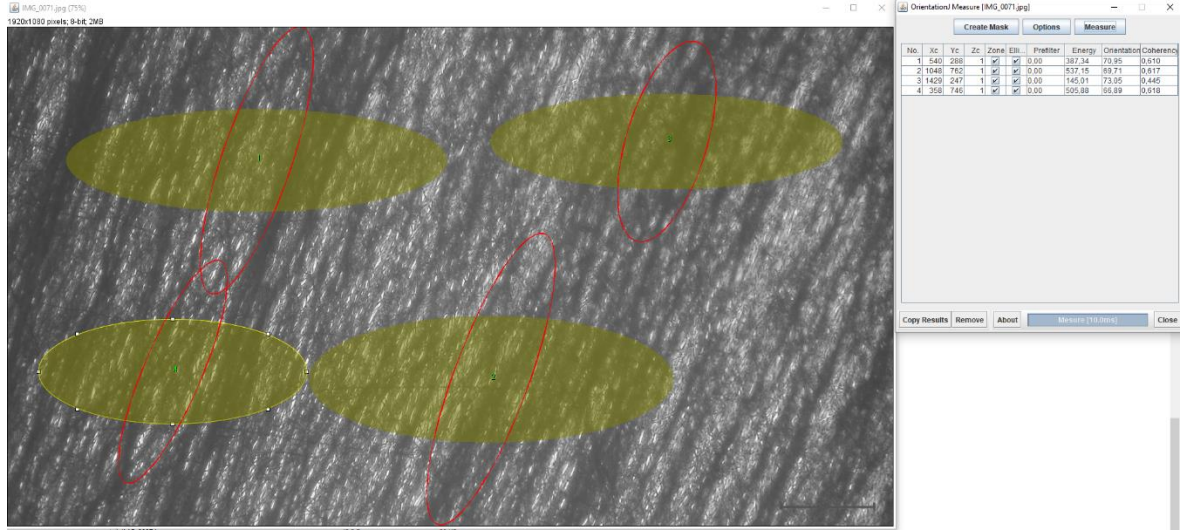
olan iki iletken paralel plaka ve dönen tambur sistemi kullanılmıştır. Paralel plakalar arası boşluklar 1.5 ve 2 cm olacak şekilde, plakaların enjektör ucundan uzaklığı ise 10 cm uzakta olacak şekilde farklı voltaj değerlerinde eğirme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Tambur kullanılarak yapılan eğirme işlemi için ise el yapımı bir döner tambur sistemi kullanılmıştır. Sistem 20 cm uzunluğunda boya ve 1 cm çapa sahip bir milden ve bu mili döndürmeye yarayan bir motordan oluşmaktadır. Bu eğirme işlemi için 14 ile 16 kV arası voltaj farkı ve tambur ile enjektör arası uzunluğun ise 20 cm olduğu parametreler kullanılmıştır.

3.3.1.5 Mikroyapı analizi

Karar verilen parametrelerde elektroēgriilen doku iskeleleri MATAI'da bulunan SEM ile incelenip Image J yazılımı ile liflerin ortalama çapları belirlenmiştir.

3.3.1.6 Fiber yönlenme derecesi analizi

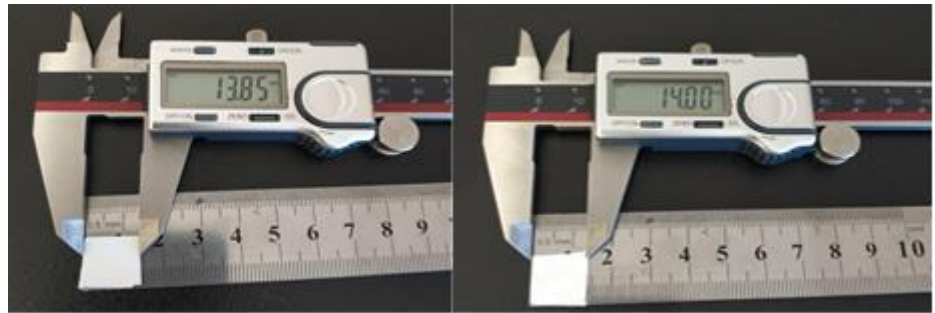
Fiberlerin yönlenme dereceleri Image J yazılımı içinde kullanılabilen Orientation J eklentisi ile gerçekleştirilmiştir (Rezakhaniha et al., 2012). Farklı parametreler kullanılarak eğriilen örneklerden SEM ve ışık mikroskobu görüntüleri alınmış ve her parametre kullanılarak çekilen en az 3 fotoğraf üzerinden üç farklı bölgeden analiz gerçekleştirilmiştir (Şekil 13). Her bir grup için elde edilen ortalama coherency katsayısı değerleri rapor edilmiştir. Yazılım kısaca, fotoğraftaki yapılara ait her piksel 2x2'lik pozitif bir matrikse çevirip farklı interpolasyon ve türev tekniklerini kullanarak x ve y düzlemleri için matematiksel hesaplamalar yapmaktadır. Bu hesaplamalar sonucu her bir pikselin dominant yönü hesaplanarak 1 ile 0 arasında % coherency değerine dönüştürülür. Bu değer 1'e ne kadar yakınsa yapının o kadar anizotropik olduğunu gösterirken değer 0'a yaklaşması yapının tamamen rastgele izotropik olduğunu belirtir (Zajaczkowska, 2015).



Şekil 13. Işık mikroskobu ile elde edilmiş fotoğraf üzerinden yönlenme derecesi analizi

3.3.1.7 In vitro biyobozunurluk testi

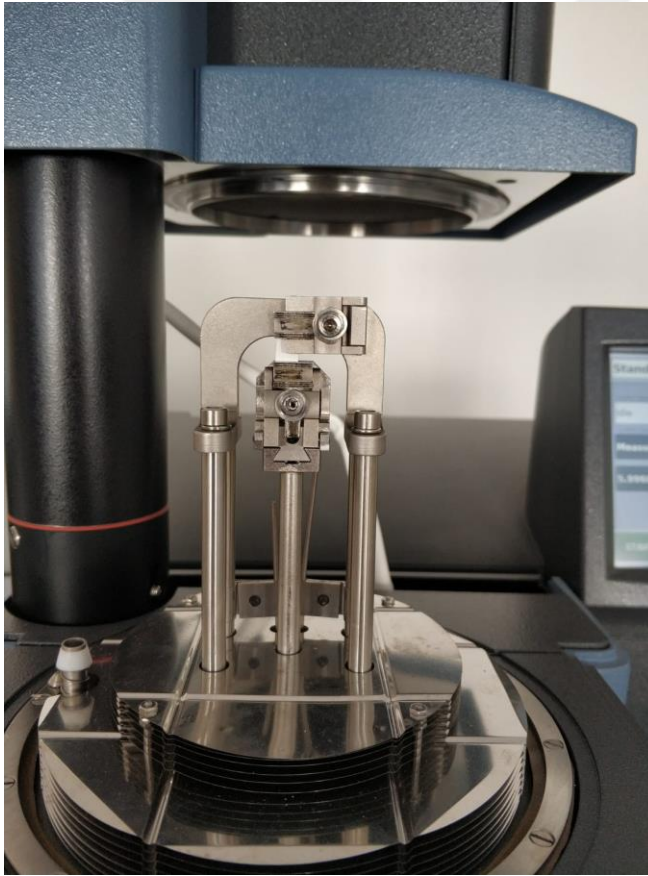
Elde edilen pek fibroin doku iskelelerinin *in vitro* biyobozunurluğunun belirlenmesi için $1.72 (\pm 0.122) \text{ cm}^2$ ipek doku iskeleleri fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ve 5U ve 20U aktivitede olacak şekilde proteaz XIV (Sigma, P5147-1G) içeren PBS içerisinde 37 C° de 4 hafta bekletilmiş ve haftalık olarak fotoğraflanmıştır (Şekil 14). Elde edilen fotoğraflar fiziksel yapıda bir parçalanma olup olmadığı bakımından görsel olarak incelenmiştir.



Şekil 14. Proteaz XIV içine bırakılmak üzere kesilmiş doku iskeleler

3.3.1.8 Mekanik analiz

Elektroeğrilmiş ipek fibroin iskeleye mekanik analiz Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (EGE-MATAL) gerçekleştirilmiştir. 1 cm x 1 cm boyutundaki ipek iskelelerden 6 mm x 6 mm boyutunda numuneler kesilmiş ve mekanik analiz cihazı (TA Instruments, DMA Q800, USA) çenelerine dikkatlice yerleştirilmiştir (Şekil 15). Yapılan ön denemeler sonucu cihaz, "stress controlled film tension" modunda 37 °C'de 0,001 N pre load force ile 0' dan 18 N'a 0.1 N/dakika artacak şekilde ayarlanmaya karar verilmiş ve analiz ipek fibroin iskele kopana kadar sürdürülmüştür. Test sonucu oluşan ham veriler TA Instruments Universal Analysis 2000 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 15. Mekanik Analiz cihazı çenelerine yerleştirilmiş elektroeğrilmiş ipek fibroin iskelesini fotoğrafı

3.3.1.9 İpek fibroin iskelelerin sterilizasyonu ve hücre ekimine hazırlanması

İpek fibroin iskeleler hücre kültüründe kullanılmadan önce %70 etanol ile muamele edilip β -tabaka konformasyonuna kristalleştirilip kullanılmıştır. (Bunu ispatlamak lazım) Ayrıca, hücre ekim işleminin kolaylaştırılması ve hücrelerin iskele üzerinden kayıp başka bir yüzeye tutunmasını engellemek amacıyla tabaka olarak üretilen iskeleler CellCrown (Z742380-12EA, Scaffdex, Finlandiya) çerçevelerine yerleştirilerek kullanılmıştır. Bu aşamalar kısaca aşağıda listelenen şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 16).

1. 1.5 cm x 1.5 cm ölçülerindeki iskeleler kesilmiştir.
2. Kesilen iskeleler dikkatlice CellCrown'lara yerleştirilerek sıkıştırılmıştır. Bu işlem sonucu efektif hücre kültürü alanı 0.58 cm^2 olarak elde edilmiştir.
3. İskele yerleştirilmiş CellCrowns %70 etanol içerisinde 1 saat bekletilmiştir.
4. 1 saat sonunda etanol uzaklaştırılmış ve distile su ile yıkama basamağına geçilmiştir.
5. İskeleler 1 saat boyunca 20 dakikada bir değiştirilmek kaydıyla bol distile su ile yıkanmıştır.
6. Yıkama aşaması sonrası iskeleler kurumaya bırakılmıştır.
7. Hazırlanan iskeleler etilen oksit gazı ile steril edilmiş ve hücre ekimi işlemine hazır hale getirilmiştir.
8. Steril hale getirilen iskeleler hücre ekiminden önce 24 saat süre boyunca hücrelerin kültüründe kullanılan ortam ile şartlandırılmıştır.

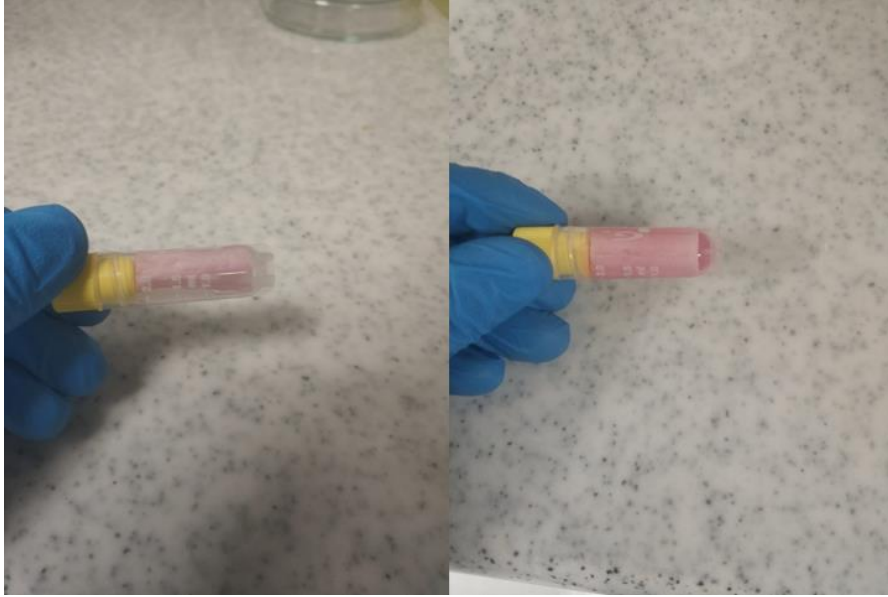


Şekil 16. İpek Fibroin İskelelerin CellCrown'lara yerleştirilmesi. A) alüminyum folyo üzerine eğrilmiş ipek fibroin iskele, B) üzerinden iskele alınmış boş alüminyum folyo, C) boş CellCrown çerçeve, D) iskele yerleştirilmiş CellCrown çerçeve ve E) %70 etanol ile muamele edilmiş iskele takılmış CellCrown.

Silindir olarak üretilmiş olan iskelelere hücre ekim işlemi tabaka olarak üretilmiş iskelelere uygulanan işlemden daha farklı olarak gerçekleştirilmiştir. Bunun başlıca sebebi silindirik geometrideki iskeleleri sıkıştırarak bir çerçeve yapısının bulunamamasından kaynaklanmıştır. Özellikle bu tez çalışmasının dinamik kültür çalışmalarında kullanılan silindirik iskelelere ekim işlemi aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Silindir olarak üretilen iskeleler 3 cm uzunluğunda kesilmiştir.
2. Kesilen iskeleler etilen oksit gazı ile steril edilmiştir.
3. Steril edilen iskeleler, kabin içinde 0.22 μm şırınga filtresinden geçirilerek steril hale getirilmiş %70 etanol içinde 1 saat bekletilmiştir.
4. 1 saat sonunda etanol uzaklaştırılmış ve otoklav kullanılarak steril hale getirilmiş distile su ile yıkama basamağına geçilmiştir.

5. İskeleler 1 saat boyunca 20 dakikada bir değiştirilmek kaydıyla bol steril distile su ile yıkanmıştır.
6. Yıkama işlemi bittikten sonra iskeleler ya steril PBS içinde saklanmış yada hücre ekimine hazırlamak için 24 saat süre boyunca hücrelerin kültüründe kullanılan ortam ile şartlandırılmıştır.
7. Şartlandırılmış silindirik iskeleler, steril pens yardımıyla hücre dondurmak için kullanılan kriyo tüplere yerleştirilmiştir (Şekil 17).
8. İskele başına 1×10^6 hücre 1.5 mL ortam ile kriyo tüp içinde bulunan silindirik iskelenin içine verilmiştir.
9. Hücrelerin iskelenin iç yüzeyine tutunmasını sağlamak için kriyotüp yatay pozisyonda $37^{\circ}C$ 'de, %5 CO_2 'li inkübatörde tutulmuş ve her 20 dakikada bir kendi etrafında yaklaşık 90° kadar döndürülmüştür.
10. Bu döndürme işlemi 4 saat boyunca devam ettirilmiş ve 4 saat sonunda silindirik iskele kriyo tüp içinden çıkarılıp 6 gözlü kültür kaplarına alınmış ve üzerine taze besi ortamı eklenmiştir.



Şekil 17. Silindirik iskeleye hücre ekimi fotoğrafı. Kriyo tüp içerisinde yerleştirilmiş iskele (solda) ve içine hücre süspansiyonu verilmiş iskele (sağda).

3.3.2 Hücre kültürü çalışmaları

3.3.2.1 Düz kas hücrelerinin (DKH) Kültürü, Pasajlanması ve Stoklanması

DKH'lerin üretimi ve stoklanması amacıyla hücrelerin kültürü aşağıda belirtilen protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

1. Ticari olarak satın alınmış, donmuş haldeki DKH (Cell Application, Rb354-05) içeren vial -196 °C sıvı azot tankından çıkarıldı.
2. Donmuş vial, tüp içeriğinin 2/3'ü sıvı hale gelene kadar 37 °C su banyosunda bekletildi.
3. Daha sonra vial içeriği laminar akışlı kabin (Class ii, Metissafe, Türkiye) içinde, daha önce gene 37 °C bekletilmiş ticari olarak satın alınmış rabbit SMC growth medium (Cell Application, Rb311-500, Amerika) ile santrifüj tüpüne alındı (Greiner, 188161 Almanya).
4. Santrifüj tüpü içine alınan hücreler 4 °C'de 1000 RPM'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi (Eppendorf, 5810 R, Almanya).
5. Santrifüj sonucunda süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüpün altına hafifçe vurularak hücrelerin yüzeyden kaldırılması sağlandı ve rabbit SMC growth medium ile süspanse edildi.
6. Süspanse haldeki hücreler T75 cm² kültür kabına (Sarstedt, 50809261, Amerika) alındı ve üzerine 20 mL kadar rabbit SMC growth medium eklendi.
7. Hücre içeren kültür kabı %5 CO₂ ve 37 °C'de bulunan inkübatörde (Forma Steri-Cycle, Thermo, Almanya) inkübasyona bırakıldı.

DKH'lerin kültürü sonucu pasajlama işlemi ise aşağıdaki protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

1. Hücrelerin üzerindeki kullanılmış besi ortamı uzaklaştırıldı.
2. Hücrelerin yüzeyi daha önce 37 °C'ye ısıtılan etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu (Merck, L2113, Almanya) ile bir kere yıkandı.
3. Yıkama işlemi sonrası kültür kabına hücrelerin üzerini kaplayacak miktarda %0.25 Tripsin/EDTA solüsyonu (Biowest, L0932, Amerika) eklendi ve kültür kabı 3 dakika kadar CO₂ içermeyen 37 °C inkübatörde bekletildi.
4. Mikroskop altında tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı teyit edildikten sonra hücreler besi ortamı ile kültür kabından toplanarak santrifüj tüpüne aktarıldı.
5. Hücreler 4 °C'de 1000 RPM'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi.
6. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpün altına hafifçe vurularak hücreler yüzeyden kaldırıldı.
7. Süspanse edilen hücreler 1:3 ile 1:6 arasında değişen oranlarla yeni kültür kabına alındı ve üzerine taze besi ortamı eklendi.
8. %5 CO₂ ve 37 °C'de bulunan inkübatörde kültüre alınan hücrelerin besi ortamı 2 günde bir tazesiyle değiştirildi.
9. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıncaya kadar sıvı azot tankında saklanmak üzere donduruldu.

Hücrelerin saklanması için uygulanan dondurma protokolü aşağıda verilmiştir.

1. Hücrelerin üzerindeki kullanılmış besi ortamı uzaklaştırıldı.
2. Hücrelerin yüzeyi daha önce 37 °C'ye ısıtılan EDTA solüsyonu ile bir kere yıkandı.

3. Yıkama işlemi sonrası kültür kabına hücrelerin üzerini kaplayacak miktarda %0.25 Tripsin/EDTA solüsyonu eklendi ve kültür kabı 3 dakika kadar CO₂ içermeyen 37 °C inkübatörde bekletildi.
4. Mikroskop altında tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı teyit edildikten sonra hücreler besi ortamı ile kültür kabından toplanarak santrifüj tüpüne aktarıldı.
5. Hücreler 4 °C'de 1000 RPM'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi.
6. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpün altına hafifçe vurularak hücreler yüzeyden kaldırıldı.
7. Hücreler daha önce hazırlanmış ve santrifüj işlemi sırasında buzdolabında bekletilmiş %90 Fötal buzağı serumu (FBS) ve %10 dimetilsülfoksit (DMSO) (AppliChem, A3672 Amerika) içeren dondurma ortamı ile süspansiyon edilip 1:3 ile 1:6 arasında değişen oranlarda kriyo tüplere alınmıştır (Greiner, 123278 Almanya).
8. Kriyo tüpler -86 °C'ye özel dondurma kutusu içine kaldırılmıştır.
9. Bir gün sonra kriyo tüpler -196 °C'deki sıvı azot içeren tanka alınmıştır.

3.3.2.2 DKH'lerin büyüme kinetiğinin çıkarılması

Hücrelerin 15 gün boyunca büyüme davranışlarının belirlenebilmesi için aşağıda belirtilen protokol takip edilmiş ve büyüme kinetiği çıkarılmıştır. Büyüme davranışlarının belirlenebilmesi için 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) (M5655, Sigma, USA) test yöntemi kullanılmıştır.

1. Hücreler 96 gözlü kültür kabına (Greiner, 655101, Almanya) 1×10^3 hücre/göz olacak miktarda besi ortamı içinde ekilmiştir.
2. Hücreler ekildikten sonra 15. güne kadar 2 günde 1 olmak üzere MTT ile canlılıklarına bakılmıştır.

MTT için kısaca aşağıdaki protokol kullanılmıştır.

1. MTT için, hücreler üzerindeki kullanılmış besi ortamı çekildi
2. Hücrelerin üzerine %10 MTT (5 mg/mL konsantrasyonda) içeren besi ortamı eklendi ve karanlıkta 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 3 saat süre ile inkübe edildi.
3. 3 saat inkübasyonun sonunda MTT içeren ortam çekilerek hücrelerin üzerine DMSO (8.02912.2500, Merck, Almanya) eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözülmesi sağlandı.
4. Hücreler yaklaşık 5 dakika boyunca 300 rpm' de çalkalayıcıda çalkalanarak kristallerin iyice çözünmesi sağlandı ve UV Spektrofotometrede (Biotek, Synergy HTX Multi-Mode, USA) 570 - 690 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri kaydedildi.
5. Elde edilen absorbans değerleri Excel yazılımında grafiğe dönüştürüldü.

Aynı işlemler CellCrown çerçevelerine tutturulmuş ipek fibroin iskeleler üzerine iskele başına 10⁴ oranında ekilen hücreler için de gerçekleştirilmiştir.

3.3.2.3 DKH'lerin ipek fibroin iskele üzerine tutunma kinetiğinin belirlenmesi

DKH'lerin iskeleye tutunma kinetiklerinin belirlenmesi için aşağıda verilen protokol takip edilmiştir.

1. CellCrown'lara sabitlenmiş ipek fibroin iskeleler üzerine hücreler 5x10⁴ hücre/iskele oranında ekilmiştir.
2. 15 dakikada bir iskele üzerindeki hücre süspansiyonundan 15 µL örnek alınarak tripan mavisi ile Neubauer Hemositometresi'nde sayım yapılmıştır.
3. Alınan örnekte sayılacak hücre kalmayana kadar bu işlem tekrarlanmıştır.

3.3.2.4 İpek fibroin iskelelerin sitotoksosite testi

Üretilen ipek fibroin iskelelerin DKH'ler üzerindeki sitotoksik etkisi *in vitro* koşullarda ekstraksiyon yöntemi ile %100, %50, %25 (v/v) oranında materyal ekstraktları kullanılarak yapılan MTT analizi ile belirlenmiştir. Sitotoksosite testi için ekstrakt hazırlama kriterleri ISO 10993-12 standartlarına göre Tablo 6' da belirlenmiştir.

Tablo 6. ISO 10993-12'ye göre ekstrakt hazırlama kriterleri. Tez çalışmasında kullanılan ipek fibroin iskeleler için kullanılan özellikler altı çizilerek belirtilmiştir.

Biyomateryalin kalınlığı (mm)	Ekstrakt çıkartma oranı	Test Materyalinin Türü
<u>≤0,5</u>	<u>6cm²/mL</u>	metaller, sentetik <u>polimerler</u> , seramikler, kompozit filmler vb.
>0,5	3 cm ² /mL	metaller, sentetik polimerler, seramikler, levhalar ve model kalıp malzemeler vb.
≤1,0	3 cm ² /mL	doğal elastomer
>1,0	1,25 cm ² /mL	doğal elastomerler
düzensiz	0,1- 0,2 g/mL, <u>6cm²/mL</u>	Pelletler

Bu test aşağıdaki protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

1. DKH'ler 1×10^5 hücre/mL oranında 96 gözlü kültür kabına ekilmiş ve 24 saat kültüre bırakılmıştır.
2. Hücrelerin ekildiği gün, 12 cm² alana sahip ipek fibroin iskele de 2 mL besi ortamı içinde 24 saat boyunca 37 °C'deki inkübatörde ekstrasyona bırakılmıştır.
3. 24 saat sonra hücreler üzerindeki besiyerleri çekilerek ekstrakt %100, %50, %25 ve %12,5 (v/v) oranında kültürdeki hücelere uygulanmıştır.
4. Ekstrakt uygulandıktan 24 saat sonra hücelere 3.3.2.2 kısmında anlatılan MTT protokolü uygulanmıştır.

5. Elde edilen absorbans sonuçların değerlendirilmesi için yapılan sayısal değerlendirmelerde ortalama değerler ve standart sapmalar rapor edilerek, deney grupları arasındaki istatistiksel farklar ANOVA (varyans analizi) yöntemi ile, %95 güven aralığında değerlendirilerek, gruplar arasında ikili ilişkiler Bonferroni yöntemiyle saptanmıştır.

3.3.2.5 DKH'lerin ipek fibroin iskele üzerinde canlılıklarının belirlenmesi

İpek fibroin iskele üzerine ekilmiş olan DKH'lerin canlılıklarının belirlenmesi amacıyla 1-7-15. günlerde Live&Dead (Invitrogen, L3224, Amerika) boyama yöntemi uygulanmıştır. Bu boyamada Etidyum Homodimer-1 membran bütünlüğü bozulan hücrelerin DNA'ları hücre tepkimeye girerek kırmızı renkte çok kuvvetli ışığa yayar. Calcein AM ise sadece hücrelerin membranı ile tepkimeye girerek yeşil renkte ışığa yayar. Bu yöntem aşağıdaki protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

1. CellCrown çerçevelerine yerleştirilmiş ve üzerlerine iskele başı 2×10^4 hücre ekilmiş iskeleler üzerindeki kullanılmış besi ortamı çekilmiştir ve PBS ile birer kere yıkanmıştır.
2. PBS içerisinde 2 mM'lık Etidyum Homodimer-1 (EthD-1) solüsyonu seyreltilerek $4 \mu\text{M}$ konsantrasyona ayarlanmış ve bu solüsyon içerisinde 4 mM'lık stok Calcein AM solüsyonu seyreltilerek $2 \mu\text{M}$ 'lık Calcein AM içeren $4 \mu\text{M}$ 'lık EthD-1 hazırlanmıştır.
3. Hazırlanan çalışma solüsyonundan iskeleler üzerine, iskeleyi kaplayacak kadar (yaklaşık olarak $500 \mu\text{L}$) konulmuştur.
4. İskeleler 35 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında kültive edilmiştir.
5. Kültivasyon süresi sonunda çalışma solüsyonları çekilip bir kere PBS ile yıkandıktan sonra iskele üzerlerine taze PBS konulmuştur ve floresans mikroskop altında incelenmiştir.

3.3.2.6 DKH'lerin ipek fibroin iskele üzerindeki morfolojilerinin incelenmesi

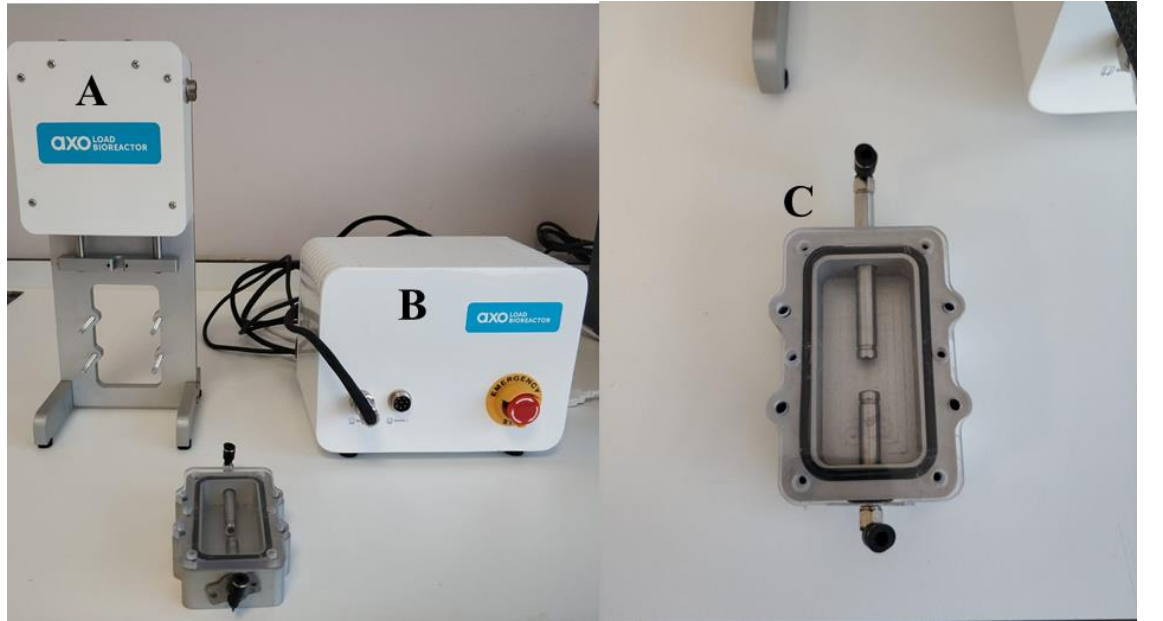
DKH'lerin iskele üzerindeki morfolojilerinin incelenebilmesi için SEM analizi uygulanmıştır. Bu test aşağıda belirtilen protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

1. CellCrown çerçevelerine yerleştirilmiş iskeleler üzerine iskele başına 1×10^4 hücre olacak şekilde DKH'ler ekilmiştir. Kontrol olarak kullanılan 12 mm çapına sahip cam coversliplere de aynı miktarda hücre ekilmiştir.
2. Hücreler ekildikten 24 saat sonra kültür sonlandırılıp SEM boyama basamaklarına geçilmiştir.
3. Önce, hücreler üzerindeki kullanılmış besi ortamı çekilip PBS ile yıkandı.
4. %5 Gluteraldehit (820603, Merck, Almanya) içeren 0.1 Molar sodyum kakodilat (C0250, Sigma, Amerika) (Tampon A) solüsyonu ile iskele ve coverslipler buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi.
5. Daha sonra %7 sükröz (A2211, AppliChem, İspanya) içeren 1 Molar sodyum kakodilat (Tampon B) solüsyonu ile buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi.
6. %2 ozmiyum tektroksit (19134, Electron Microscopy Sciences, İngiltere) içeren 1 Molar sodyum kakodilat (Tampon C) solüsyonu ile buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi.
7. Örnekler distile su ile iki sefer 5'er dakika boyunca oda sıcaklığında yıkandı.
8. Distile su çekildikten sonra sırasıyla %35, %50, %70, %85, %95, %100, %100 (v/v) alkol serilerinde 5 dakika inkübe edildi.
9. Alkol serileri tamamlanınca örnekler HMDS solüsyonunda 15 dk bekletildi.
10. 15 dakika sonunda HMDS çekilip örnekler 30 dakika oda sıcaklığında kurumaları için bırakıldı.

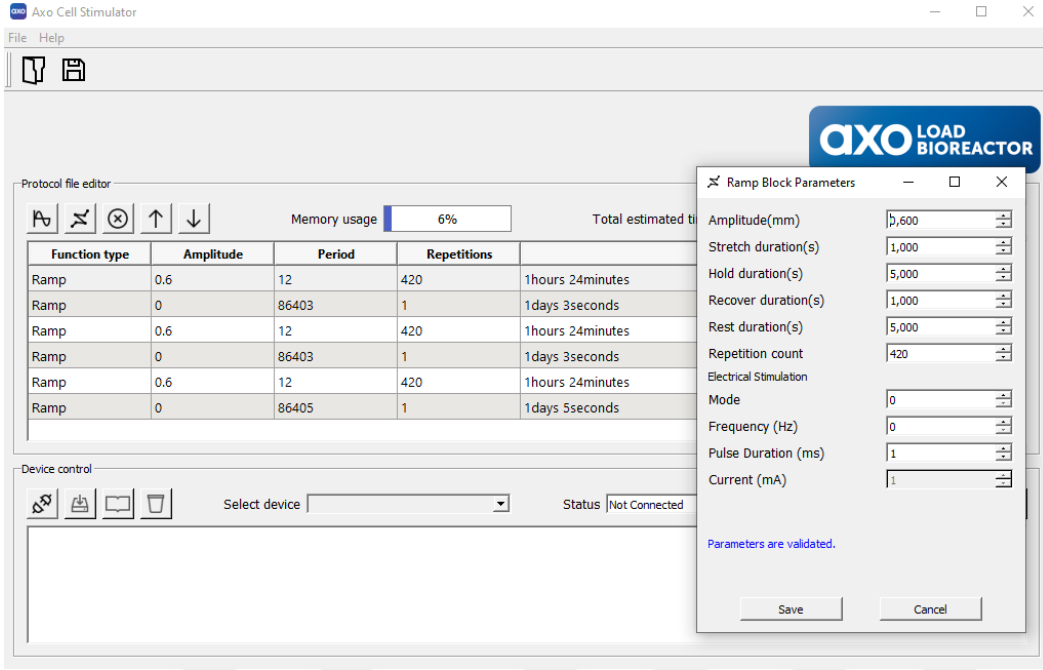
11. Kuruma tamamlandıktan sonra örnekler desikatöre kaldırıldı.
12. Kurutulan örnekler ile yaklaşık 20 nm olacak şekilde vakum kaplama yöntemi ile altın kaplandı (Leica EM ACE600, Almanya) ve Thermo Scientific Apreo S cihazı ile görüntülendi.

3.3.2.7 Dinamik kültür çalışmaları

Dinamik kültür çalışmaları için iskelelerin monte edilebileceği gibi bir ucu statik diğer ucu ise bilgisayar kontrollü belirlenen oranlarda çekme uygulama kapasitesine sahip motor sistemine bağlı bir biyoreaktör sistemi (Axolotl Biosystems, Türkiye) kullanılmıştır (Şekil 18). DKH ekili iskelelere %2 ve %10 germe miktarları, 0.0725 Hz frekansta ve toplam günde 420 döngü uygulanacak şekilde çalıştırılmıştır (Ritchie et al., 2009). Germe miktarı, frekans ve döngü miktarı bilgileri biyoreaktör sistemine Axo Cell Stimulator (Axolotl Biosystems, Türkiye) yazılımı kullanılarak rampa fonksiyonu aracılığı ile iletilmiştir (Şekil 19). 420 döngü sonrasında reaktör haznesinden çıkarılan iskelelerden hücreler 3.3.2.1 kısmında anlatılan hücre pasajlama yöntemine göre kaldırılmış ve α -SMA antikoru kullanılarak akış sitometresinde incelenmiştir.

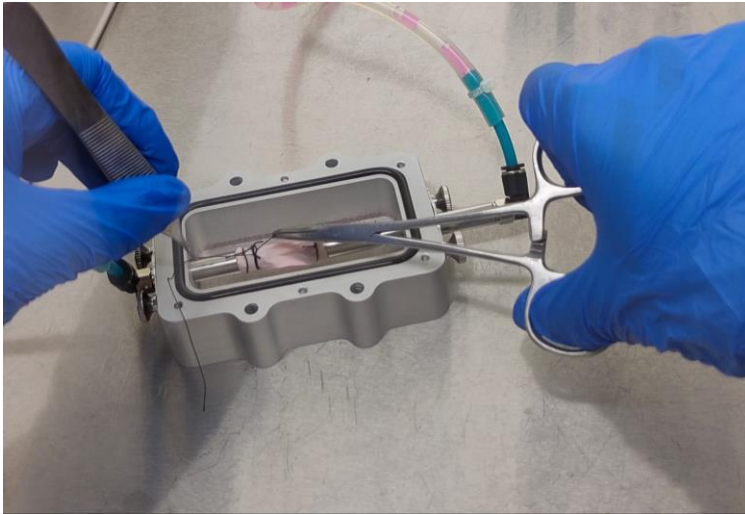


Şekil 18. Dinamik kültürde kullanılan çekme biyoreaktörü sistemi. A harfi motor sistemini, B harfi güç kaynağını, C harfi ise reaktör haznesini ifade etmektedir.



Şekil 19. Axo Cell Stimulator yazılımı kullanılarak oluşturulan 3 günlük çekme protokolü örneği

Dinamik kültür çalışmaları için 3.3.1.9 kısmında anlatıldığı gibi hücre ekilmiş olan 3 cm boyunda ve 1 cm çapındaki silindirik iskeleler yaklaşık olarak 9 cm uzunluğa ve 4.5 cm genişlikte kültür alanına sahip olan reaktör haznesine Şekil 18'deki C figüründe görülebilen borulara cerrahi suture kullanılarak pensler yardımıyla aseptik olarak sabitlenmiştir (Şekil 20). Daha sonra reaktör haznesi motor sistemine yerleştirilmiş ve yazılım kullanılarak çekme işlemleri başlatılmıştır.



Şekil 20. Üretilen silindirik iskelelerin reaktör haznesine cerrahi suture kullanılarak sabitlenmesi.

3.3.2.8 İmmünofloresans (IF) boyamalar

Statik ve dinamik kültürü yapılan DKH ekilmiş ipek fibroin iskelelere 1., 7. ve 15., günlerde DKH'nin kontraktıl fenotipi üzerindeki etkisini görebilmek amacıyla anti- α -smooth muscle actin (anti α -SMA) (A5228 SIGMA) antikorunu kullanarak immünofloresans boyamalar gerçekleştirilmiştir. Bu boyamalar aşağıda belirtilen protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

1. İmmünofloresan boyama DKH ekilmiş iskeleler üzerindeki kullanılmış besi ortamı çekildikten sonra hücreler PBS ile iki kez yıkanmıştır.
2. Ardından +4 °C' de saklanan %4 paraformaldehit (PFA) çözeltisi iskeleler üzerine eklenerek ve 300 rpm' de çalkalanarak, oda sıcaklığında, 15 dakika boyunca fiksasyon yapılmıştır.
3. Fiksasyon basamağının ardından PFA çekildi ve iskeleler Ca^{+2} , Mg^{+2} içeren PBS ile yıkanmıştır.
4. Aldehitleri uzaklaştırma amacıyla iskeleler üzerine 50 mM Amonyum klorür (NH_4Cl) solüsyonu eklendi ve 300 rpm' deki çalkalayıcıda, oda sıcaklığında, 7 dakika boyunca çalkanmıştır.
5. İskeleler PBS-Triton X-100 (% 0.2) ile iki kez 5' er dakika, gene 300 rpm' deki çalkalayıcıda çalkalanarak, oda sıcaklığında yıkanmıştır.
6. İskeleler Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile bir kez yıkanmıştır.
7. Kullanılacak olan anti- α -SMA antikorunu üreticinin belirttiği miktarda 1:50 oranında seyreltilmiştir.
8. Her bir göz için antikor solüsyonundan 60 μ L damlatıldı ve +4 °C'de bir gece inkübe edilmiştir.
9. Primer antikorlar ile inkübasyon sonunda iskeleler %0,2 PBS-Triton X-100 çözeltisi ile oda sıcaklığında 3 kez 15 dk sürelerle mikropılaka çalkalayıcı üzerinde

yıkanmıştır. %0,2 PBS-Triton X- 100 çözeltisi içerisinde 1:1000 oranda yeşil renkli Alexa Fluor® 488 sekonder antikor (ab150113, Abcam, Amerika) antikorların dilüsyonları ve 1:1000 oranda 4',6 Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI) boyasının dilüsyonu hazırlanmıştır.

10. Yıkama basamakları sonucunda iskeleler DAPI-sekonder antikor solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında 45 dk boyunca mikropilaka çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Sekonder antikor ile inkübasyon sonunda iskeleler %0,2 PBS-Triton X-100 çözeltisi ile 3 kez 10 dk sürelerle oda sıcaklığında mikropilaka çalkalayıcı üzerinde, Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile bir kez yıkanmıştır.

11. Örneklerin üzerine 20 µL Mowiol damlatıldıktan sonra oda sıcaklığında kuruması beklenildikten sonra floresan mikroskopta incelenmiştir.

3.3.2.9 Akış sitometrisi

%0, %2 ve %10 germe miktarlarının, 0.0725 Hz frekansta ve toplam günde 420 döngü uygulanacak şekilde 1 gün dinamik kültürü yapılmış iskelelerden hücreler bu tez çalışmasının 3.3.2.1 kısmında anlatıldığı gibi Tripsin/EDTA solüsyonu kullanılarak kaldırılmıştır. Daha sonra hücreleri akış sitometrisi analizine hazırlamak için aşağıda belirtilen protokol takip edilmiştir.

1. Hücreler PBS ile santrifüj kullanılarak iki kere yıkanmıştır.
2. Ardından +4 °C' de saklanan %4 paraformaldehit (PFA) çözeltisi iskeleler üzerine eklenerek ve 300 rpm' de çalkalanarak, oda sıcaklığında, 15 dakika boyunca fiksasyon yapıldı.
3. Fiksasyon basamağının ardından PFA çekildi ve iskeleler Ca^{+2} , Mg^{+2} içeren PBS ile yıkandı.
4. Hücreler, PBS-Triton X-100 (% 0.2) ile iki kez 5' er dakika, 300 rpm' deki çalkalayıcıda çalkalanarak, oda sıcaklığında yıkanmıştır.

5. Hücreler %3 (w/v) BSA içeren PBS-Triton X-100 ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
6. Kullanılacak olan anti- α -SMA antikoru üreticinin belirttiği miktarda 1:50 oranında seyreltilmiştir.
7. Bloklama aşaması sonrasında hücreler primer antikor ile 1 saat boyunca +4 °C'de inkübe edilmiştir.
8. Primer antikor ile inkübasyon sonrası hücreler PBS ile 3 kere yıkanmıştır.
9. Daha sonra hücreler %0,2 PBS-Triton X- 100 çözeltisi içerisinde 1:1000 oranda kırmızı renkli sekonder Alexa Fluor® 647 sekonder antikor (ab150119, Abcam, Amerika) antikoru ile oda sıcaklığında 45 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
10. Bu inkübasyon aşaması sonrasında hücreler 2 kere PBS ile yıkandıktan sonra akış sitometrisi analizi için 500 μ L PBS içerisinde süspansiyon haline getirilmiştir.
11. Hücreler, BD Accuri C6 (BD, Amerika) cihazı kullanılarak analiz edilmiştir.
12. Elde edilen veriler Flowjo v10 (Flowjo, Amerika) yazılımı ile analiz edilmiştir.

3.3.3 İstatistiksel Analizler

3.3.1 ve 3.3.2 kısımlarında gerçekleştirilmiş kantitatif deneyler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve deney grupları içinde en az üç örnek test edilmiştir. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi için yapılan sayısal değerlendirmelerde ortalama değerler ve standart sapmalar rapor edilerek, deney grupları arasındaki istatistiksel farklar Prism 8 (Graphpad, Amerika) yazılımı kullanılarak ANOVA (varyans analizi) yöntemi ile, %95 güven aralığında değerlendirilmiş; gruplar arasında ikili ilişkiler Bonferroni yöntemiyle saptanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. İpek fibroin eldesi ve FTIR Analizi

NaHCO₃ kullanılarak 100 C°'de 30'ar dakikadan üç kere yapılan serisinden uzaklaştırma işleminde uzaklaştırma verimi yüzdesi **29,75±3,51** olarak belirlenmiştir.

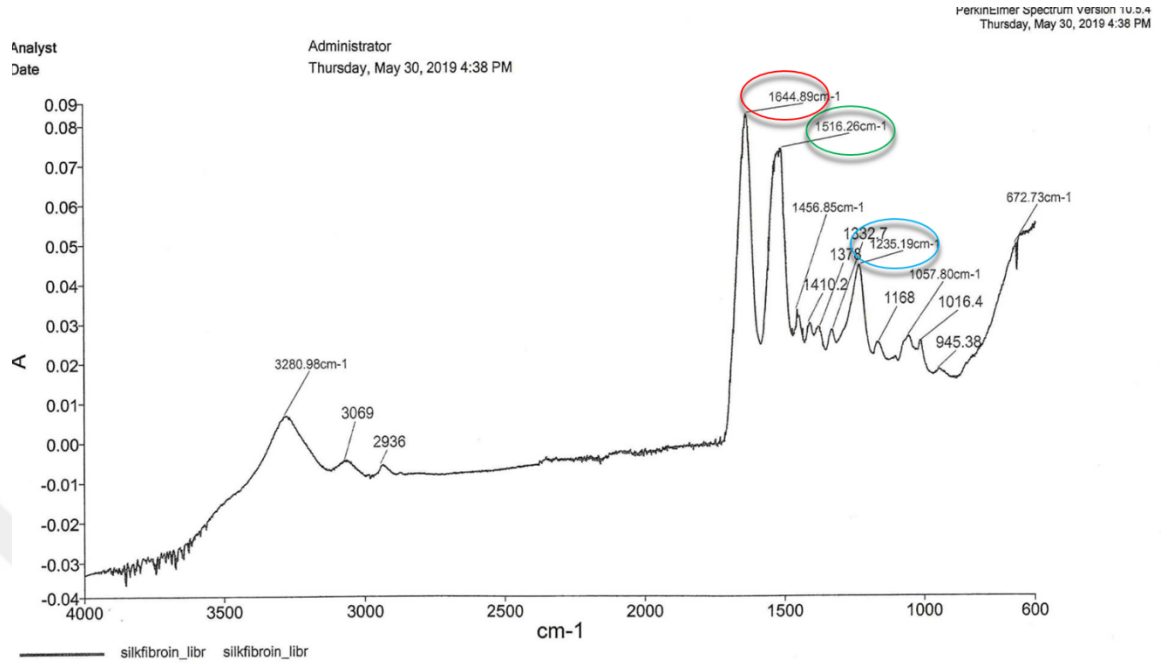
İpek fibroin'den doku iskelesi eldesi için serisini uzaklaştırılmış *Bombyx mori* ipek böceği kozaları LiBr ve CaCl₂:Su:Etanol (üçlü çözücü sistemi) çözücü sistemleri ile işlenip diyaliz edilmiştir. Diyaliz işleminden sonra elde edilen ipek fibroin çözeltisi liyofilize edilmiş ve elektroegirme işleminde kullanılmaya hazır ipek fibroin köpükleri başarı ile elde edilebilmiştir (Şekil 21).

LiBr solüsyonu kullanılarak işlenen, diyaliz işlemi sonrası liyofilizasyon işlemi öncesi solüsyondaki ipek fibroin konsantrasyonu **%5,19±1,3 (w/v)** olarak belirlenmiştir.

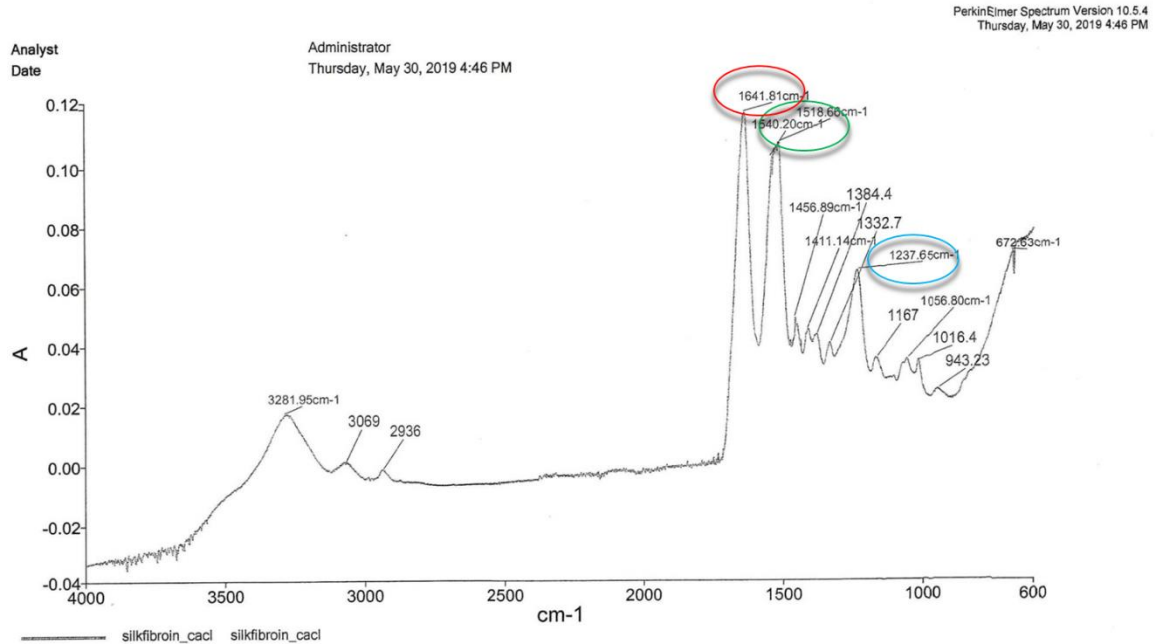


Şekil 21. Liyofilize edilmiş, saflaştırılmış ipek fibroin fotoğrafı

Farklı çözücü yöntemleri ile elde edilen bu köpüklerin karakterizasyonu FTIR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 22 ve 23).



Şekil 22. LiBr çözücü sisteminden elde edilmiş ipek fibroin FTIR spektroskopisi. Kırmızı, yeşil ve mavi daireler sırası ile karakteristik 1644 cm^{-1} C-O gerilmesi, 1516 cm^{-1} N-H deformasyonları ve 1235 cm^{-1} C-N gerilmesi ile N-H bükülmesini göstermektedir.



Şekil 23. Üçlü çözücü sisteminden elde edilmiş ipek fibroin FTIR spektroskopisi. Kırmızı, yeşil ve mavi daireler sırası ile karakteristik 1641 cm^{-1} C-O gerilmesi, 1518 cm^{-1} N-H deformasyonları ve 1237 cm^{-1} C-N gerilmesi ile N-H bükülmesini göstermektedir.

LiBr ve üçlü çözücü sistemi ile hazırlanan ipek fibroinlerde $1640 - 1670 \text{ cm}^{-1}$ arası C-O gerilmesi, $1520-1540 \text{ cm}^{-1}$ arası N-H deformasyonları, $1265 - 1313 \text{ cm}^{-1}$ arası C-N gerilmesi ve N-H bükülmesi olmak üzere tüm karakteristik pikler çok rahat bir biçimde gözlemlenmiştir (Kamalha et al., 2013).

4.2 Elektroeğirme ile ipek fibroin rastgele nano-lifli doku iskelelerinin üretiminin optimizasyonu

Her iki çözücü sistemi ile de üretilen ipek fibroin %15 (w/v) oranında %98'lik formik asit içinde çözdürülmüş ve kısa süreler (1-2 dakika) 12-15 kV voltaj farkı, 0,15-2 mL/s akış hızı ve 10- 15 cm arasındaki toplayıcı uzaklığı ile elektroeğirme işlemlerine maruz bırakılmış, oluşan yapılar mikroskop altında incelenmiştir. Yapılan ön denemeler sonucu üçlü çözücü sistemi ile üretilen ipek fibroinden lifli yapı oluşturulamamıştır (Şekil 24). Bu sebepten dolayı optimizasyon işlemleri LiBr çözücü sistemi ile elde edilen ipek fibroinler için gerçekleştirilmiştir.



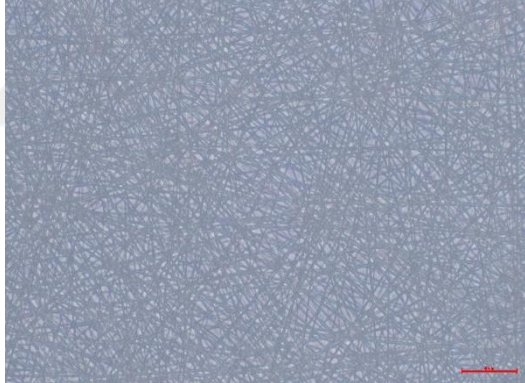
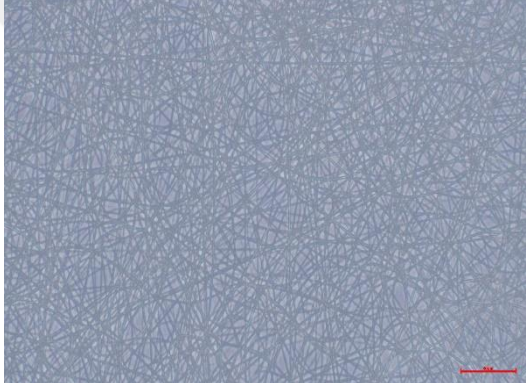
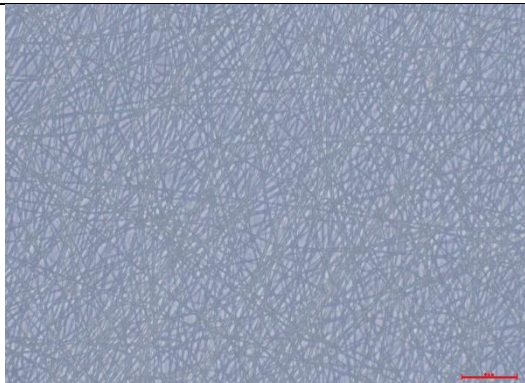
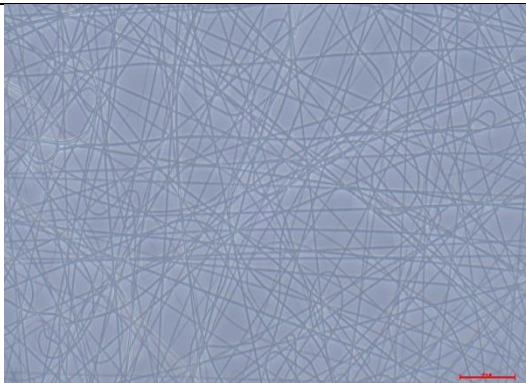
Şekil 24. %15 (w/v) Üçlü çözücü sistemi ile elde edilmiş ipek fibroin solüsyonunun elektroeğirme işlemi sonucu alüminyum folyo üzerindeki oluşmuş damlacık yapıları. Düzgün fiber oluşumu gözlenememiştir.

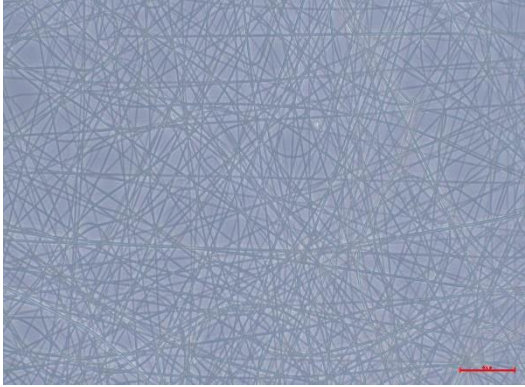
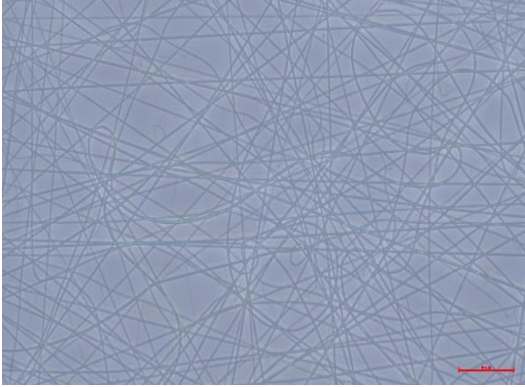
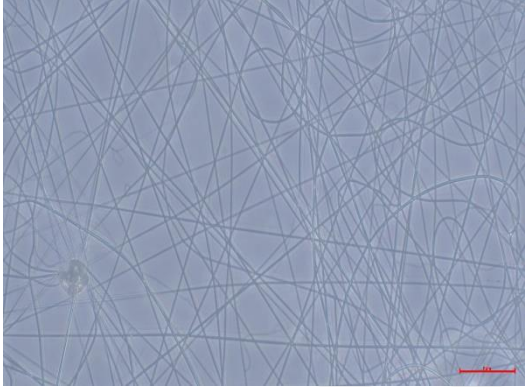
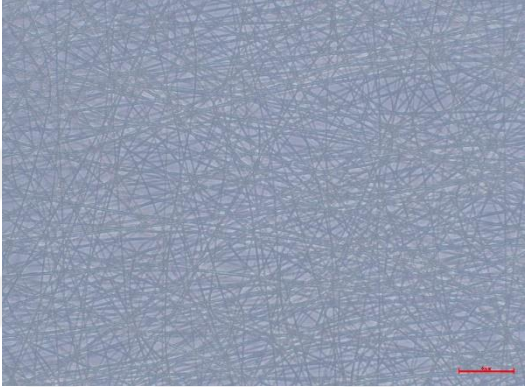
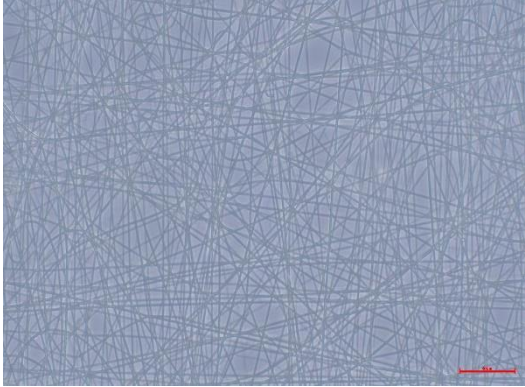
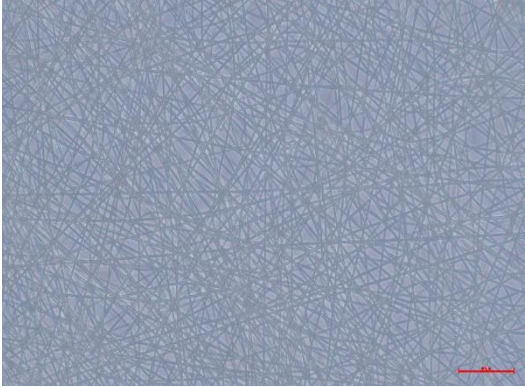
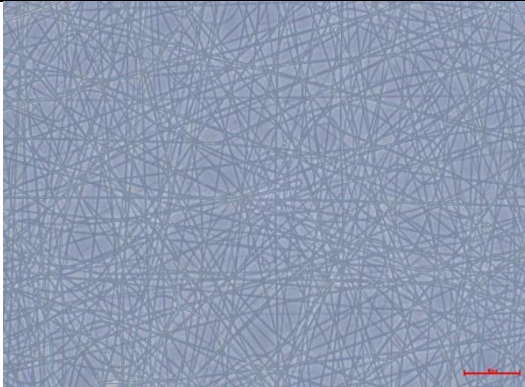
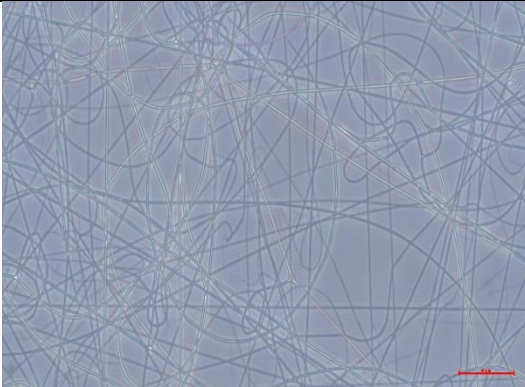
LiBr çözücü sistemi ile üretilen ipek fibroinler için denenen parametreler aşağıdaki Tablo 7'de verilmiştir. Bu parametrelerde elektroeğirme işlemi 1 ile 3 dakika arasında devam ettirilmiş ve mikroskop altında oluşan fiber yapıları incelenmiştir.

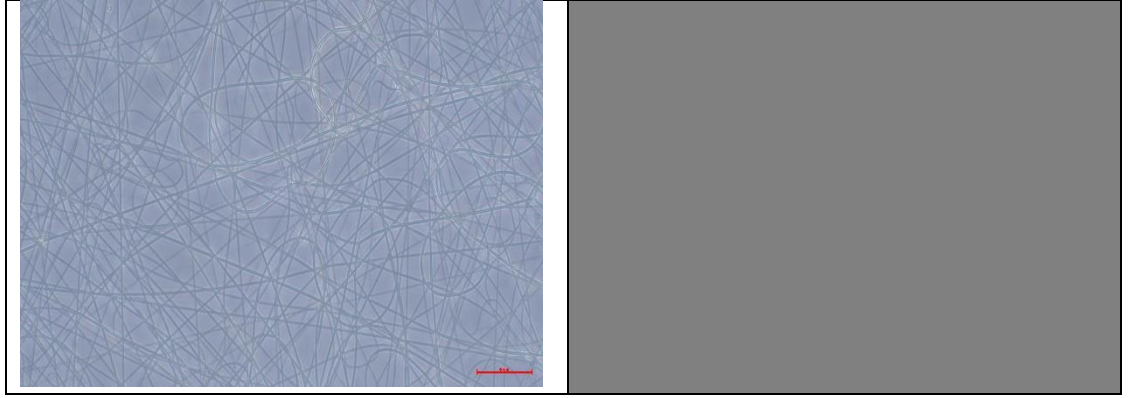
Tablo 7. LiBr çözücü sistemi ile üretilen ipek fibroin elektroğirmesi için denenen parametreler

Deneme	Hız (mL/s)	Voltaj (kV)	Uzaklık (cm)
1	0.15	15.0	10
2	0.15	14.5	10
3	0.15	14.0	10
4	0.15	13.5	10
5	0.25	14.5	10
6	0.35	14.5	10
7	0.55	14.0	10
8	0.55	14.5	15
9	0.55	14.5	10
10	0.55	14.5	8
11	0.55	14.5	15
12	0.77	12.0	10
13	1.10	12.0	10
14	1.50	15.0	10
15	2.00	15.0	10

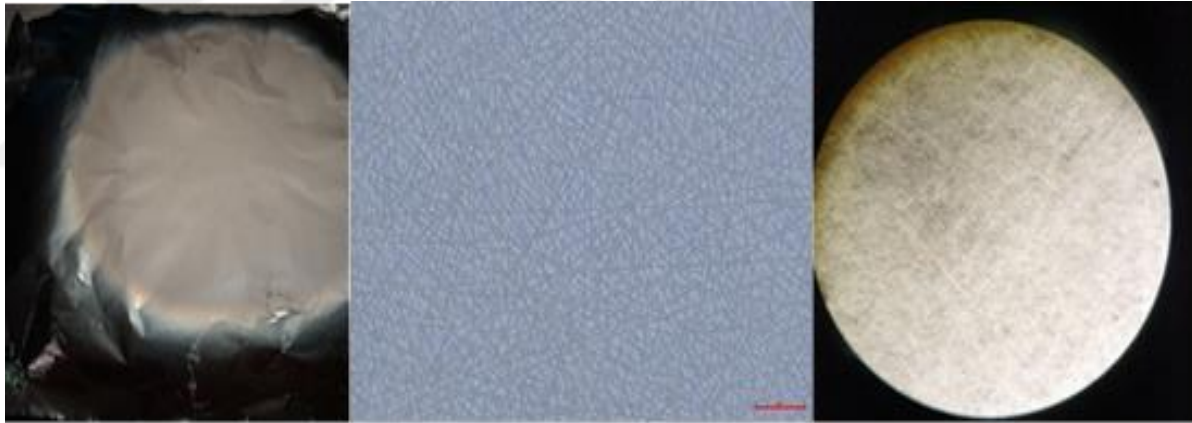
Tablo 8 LiBr çözücü sistemi ile üretilmiş ipek fibroinlerin farklı parametrelerde eğrilmesi sonucu oluşan fiber yapılar. Ölçek çizgileri 40 μm 'ye denk gelmektedir.

Hız (mL/h): 0.3, Voltaj (kV): 15, Uzaklık (cm): 10	Hız (mL/h): 0.15, Voltaj (kV): 10, Uzaklık (cm): 10
	
Hız (mL/h): 0.15, Voltaj (kV): 14,5, Uzaklık (cm): 10	Hız (mL/h): 0.15, Voltaj (kV): 14, Uzaklık (cm): 10
	
Hız (mL/h): 0.15, Voltaj (kV): 13,5, Uzaklık (cm): 10	Hız (mL/h): 0.15, Voltaj (kV): 13, Uzaklık (cm): 10

	
Hız (mL/h): 0.15, Voltaj (kV): 12,5, Uzaklık (cm): 10	Hız (mL/h): 0.15, Voltaj (kV): 11,5, Uzaklık (cm): 10
	
Hız (mL/h): 0.25, Voltaj (kV): 14,5, Uzaklık (cm): 10	Hız (mL/h): 0.35, Voltaj (kV): 14,5, Uzaklık (cm): 10
	
Hız (mL/h): 0.55, Voltaj (kV): 14,5, Uzaklık (cm): 10	Hız (mL/h): 0.55, Voltaj (kV): 14,5, Uzaklık (cm): 15
	
Hız (mL/h): 0.55, Voltaj (kV): 14,5, Uzaklık (cm): 8	



Tablo 8'deki görüntülere göre, damlacık oluşumu, fiber homojenliği ve düzgünlüğü, fiberlerin kesikli olup olmaması ve fiber yoğunluğu gibi kriterler göz önünde bulundurularak **0.35 mL/s, 14.5 kV ve 10 cm** parametreleri bu tez çalışmasında kullanılmak üzere seçilmiştir (Şekil 25).



Şekil 25. Seçilen parametreler sonucu eğrilmiş %15 (w/v) ipek fibroin fiberlerinin görüntüleri. Resimler soldan sağa sırasıyla, alüminyum folyo üzerine toplanmış, ters faz mikroskopta 20x büyütme ve stereo mikroskop görüntüsüdür. Ölçek çizgisi 40 μm 'ye denk gelmektedir

4.3 Elektroğirme ile ipek fibroin yönlendirilmiş nano-lifli doku iskelelerinin üretiminin optimizasyonu

Rastgele dağılmış iskele elde etmede kullanılan voltaj ve akış hızı sabit tutularak, toplayıcı ile iğne ucu arasındaki mesafe ve iki toplayıcı plaka arasındaki

boşluk mesafesi değiştirilerek fiberlerde yönlenme sağlanmıştır (Şekil 26). Bu parametreler aşağıdaki Tablo 9’de verilmiştir.



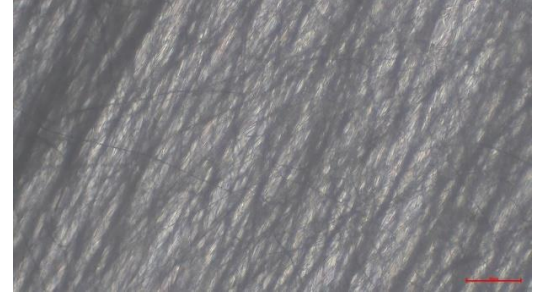

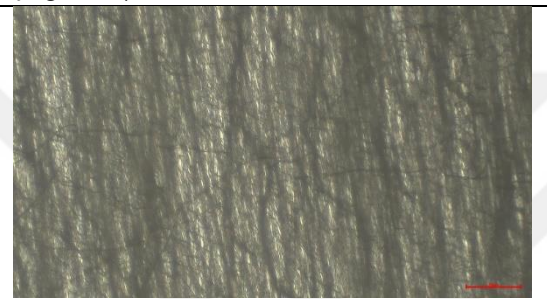
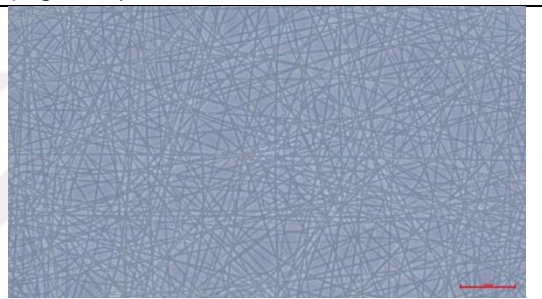
Şekil 26. Birbirinden ayrı iki toplayıcı plaka arasında yönlendirilmiş fiberlerin fotoğrafları

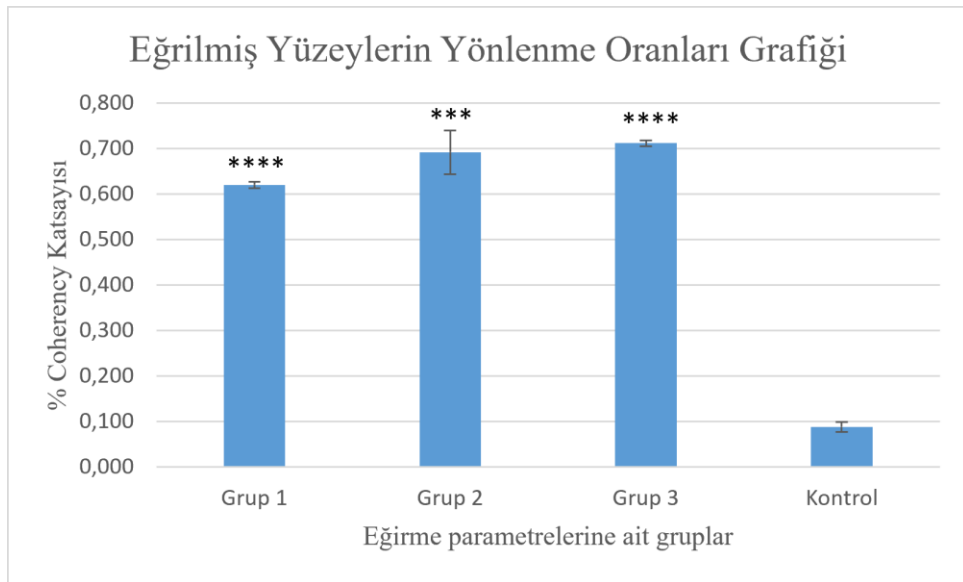
Tablo 9. Fiber yönlenmesi için denenen parametreler

Grup	Hız (mL/s)	Voltaj (kV)	Toplayıcı- iğne arası uzaklık (cm)	İki iletken plaka arası uzaklık (cm)
1	0.550	14.5	10	1,5
2	0.550	14.5	15	1,5
3	0.550	14.5	10	2
Kontrol	0.550	14.5	10	0

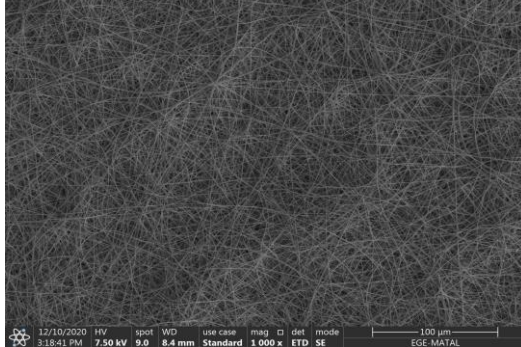
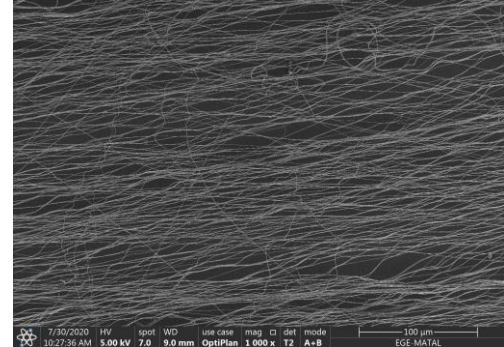
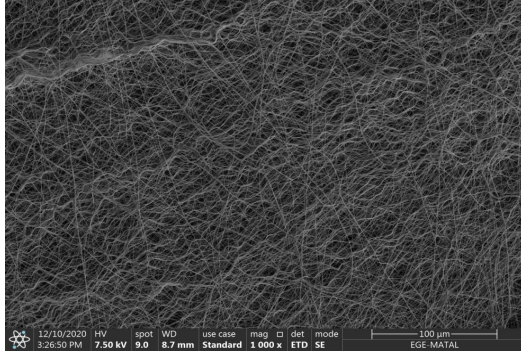
Tablo 9’da verilen parametreler kullanılarak elde edilen eğrilmiş yüzeylere ait coherency katsayı değeri Orientation J yazılımı ile tespit edilmiş ve kontrol olarak rastgele eğrilmiş yüzeyin değerleri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 27). Bu analiz için ışık mikroskobu fotoğrafları kullanılmıştır. Bu parametrelere ait eğrilmiş yüzeylerin fotoğrafları Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10. Yönlenme oranının hesaplanmasında kullanılan fotoğraflardan bazıları.

Grup 1 , Toplayıcı- iğne arası uzaklık (cm): 10, İki iletken plaka arası uzaklık (cm): 1,5. Ölçek çizgisi 80 μm 'dir	Grup 2 , Toplayıcı- iğne arası uzaklık (cm): 15, İki iletken plaka arası uzaklık (cm): 1,5. Ölçek çizgisi 80 μm 'dir
	
Grup 3 , Toplayıcı- iğne arası uzaklık (cm): 10, İki iletken plaka arası uzaklık (cm): 2. Ölçek çizgisi 80 μm 'dir	Kontrol Toplayıcı- iğne arası uzaklık (cm): 10, İki iletken plaka arası uzaklık (cm): 0. Ölçek çizgisi 80 μm 'dir
	

Şekil 27. Farklı parametrelerde eğrilmiş yüzeylerin yönlenme oranlarının grafiği. Her üç grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür. (***) $p \leq 0.001$, (****) $p \leq 0.0001$

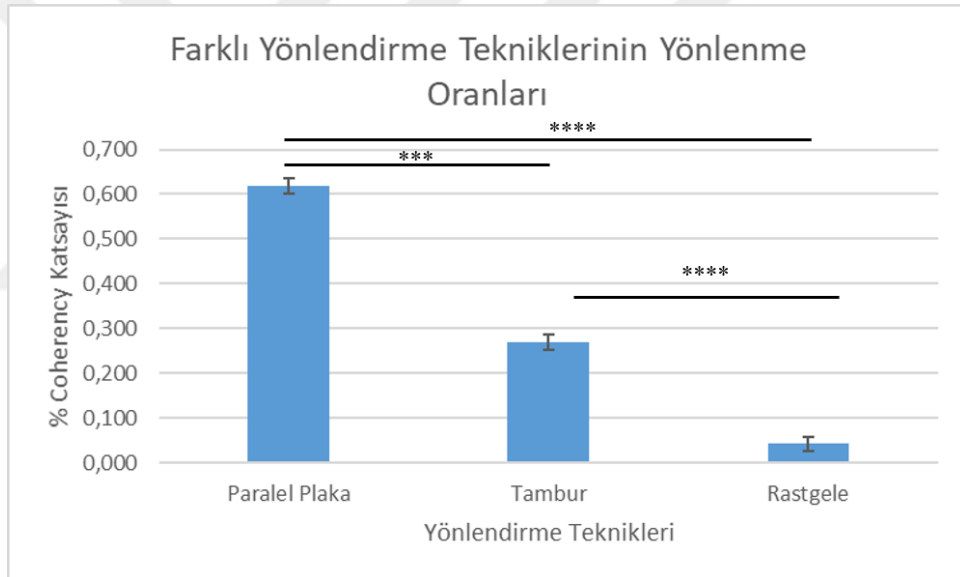
Tablo 11. Farklı teknikler ile üretilen yönlenmiş yüzeyler

Rastgele Yüzey	Paralel Plaka ile Yönlendirilmiş Yüzey
 <p>12/10/2020 HV spot WD use case mag det mode 100 µm 3:18:41 PM 7.50 kV 9.0 8.4 mm Standard 1.000 x ETO SE EGE-MATAL</p>	 <p>7/30/2020 HV spot WD use case mag det mode 100 µm 10:27:36 AM 5.00 kV 7.0 9.0 mm OptiPlan 1.000 x TZ A+B EGE-MATAL</p>
Döner Tambur ile Yönlendirilmiş Yüzey	 <p>12/10/2020 HV spot WD use case mag det mode 100 µm 3:26:50 PM 7.50 kV 9.0 8.7 mm Standard 1.000 x ETO SE EGE-MATAL</p>

Döner tambur kullanılarak üretilen silindirik iskelelerinin yönlenme oranı hesaplaması ve paralel plaka eğirme yönteminde üretilmiş olan fiberlerle karşılaştırılması SEM görüntüleri üzerinden gerçekleştirilmiştir (Tablo 11 ve Şekil 29). SEM fotoğraflarının kullanılmasının sebebi, döner tambur üzerinde üretilen yüzeyin silindirik formda çıkarılabilmesi için ulaşması gereken kalınlık miktarında ışık mikroskobu görüntüsünün alınamamasıdır (Şekil 28).



Şekil 28. Dönen tambur sistemi kullanılarak üretilen silindirik iskeleler

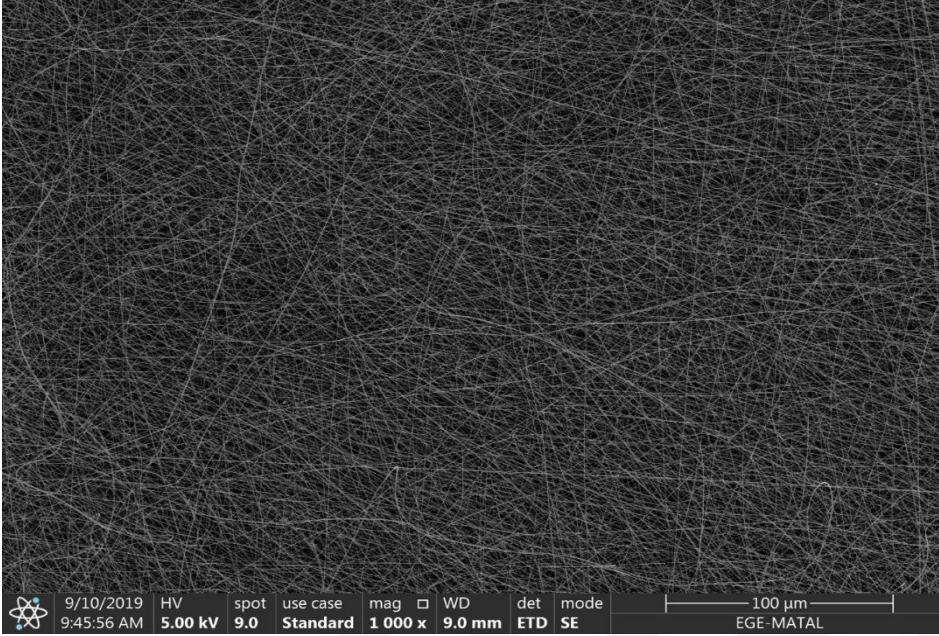


Şekil 29. Farklı yönlendirme teknikleri ile eğrilmiş yüzeylerin yönlenme oranlarının grafiği. Paralel plaka ile tambur ve rastgele grubunu arasında ve tambur ile rastgele grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülmüştür. (***) $p \leq 0.001$, (****) $p \leq 0.0001$

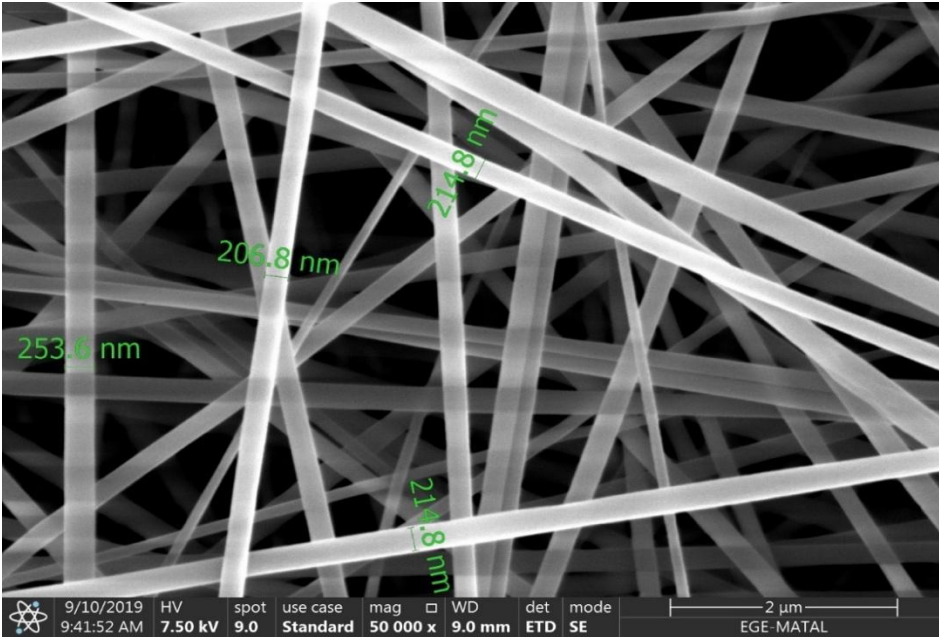
4.4 Üretilen ipek fibroin iskelelerin mikroyapı analizleri

Karar verilen parametrelerde elektroğrilen doku iskeleleri EgeMATAL'da bulunan SEM (Thermo, Apero S) ile incelenip Image J yazılımı ile liflerin ortalama çapları belirlenmiştir (Şekil 30 ve 31). Ayrıca doku iskeleleri hücre kültürü

çalışmalarından önce %70 etanol ile muamele edilip β -tabaka konformasyonuna kristalleştirilip kullanılacağı için etanol ile muamele edilmiş doku iskelelerinin SEM görüntüleri de Şekil 32 ve 33'te verilmiştir.

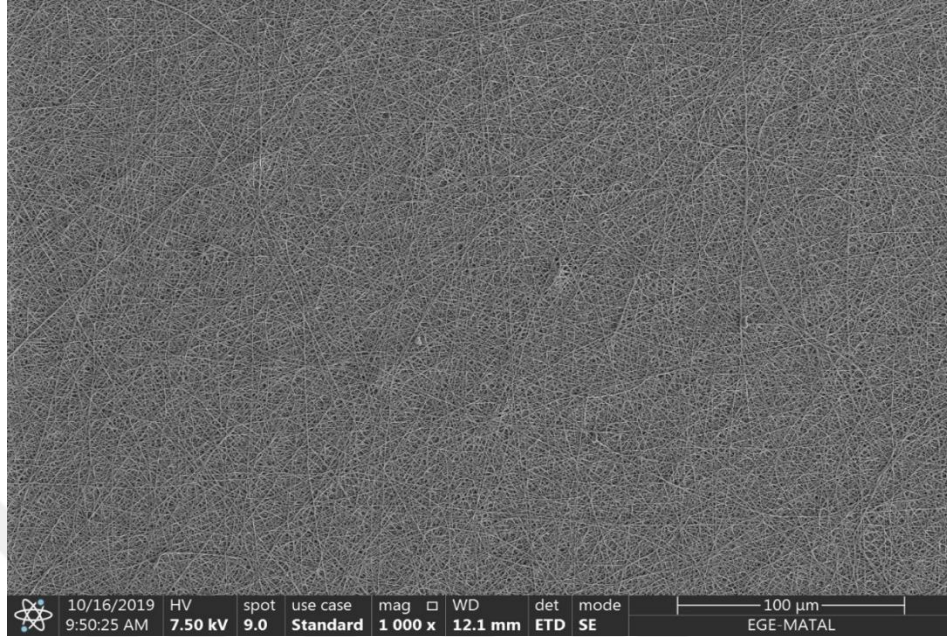


Şekil 30. LiBr çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde elektroğirilmesi ile elde edilmiş nanolifli yapının 1000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 100 μ m'ye denk gelmektedir.

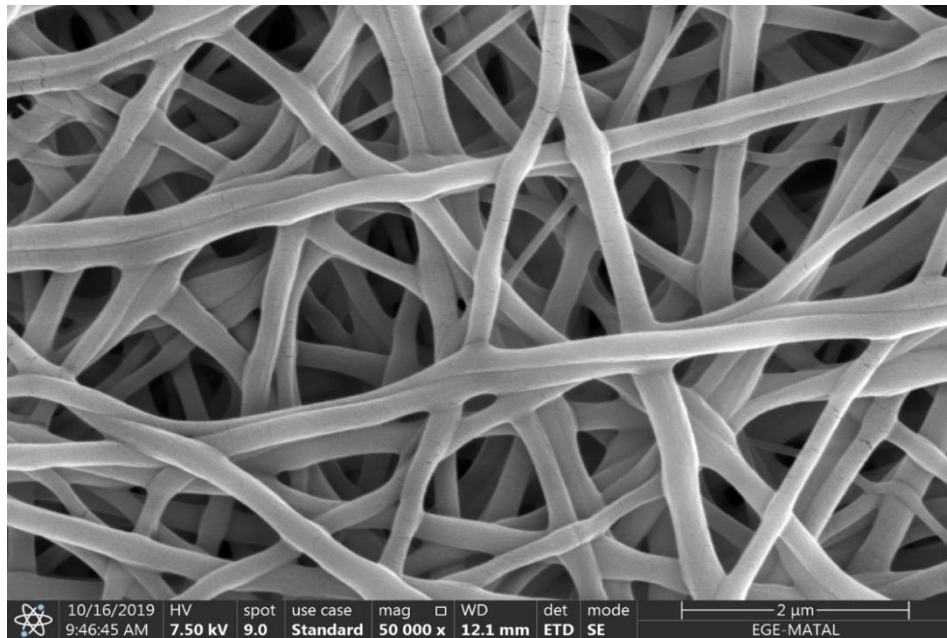


Şekil 31. LiBr çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde elektroğirilmesi ile elde edilmiş nanolifli yapının 50000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 2 μ m'ye denk gelmektedir.

%15 (w/v) ipek fibroin kullanılarak elektroğirilmiş liflerin ortalama çapları ImageJ yazılımı kullanılarak $243 (\pm 26,23)$ nm olarak belirlenmiştir.



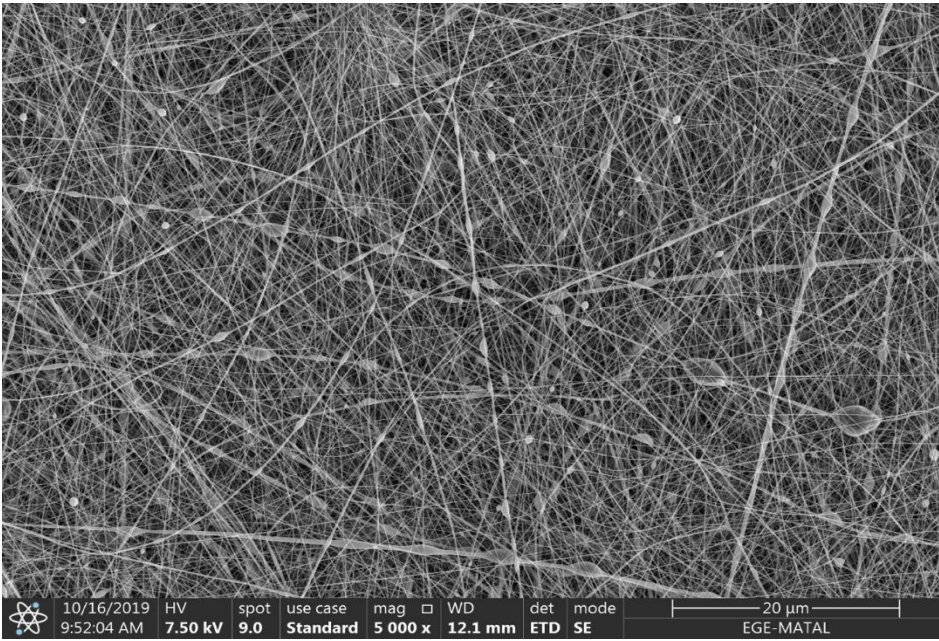
Şekil 32. LiBr çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde elektroğirilmesi ile elde edilmiş nanolifli yapının %70 etanol ile muamele edildikten sonra 1000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 100 μm 'ye denk gelmektedir.



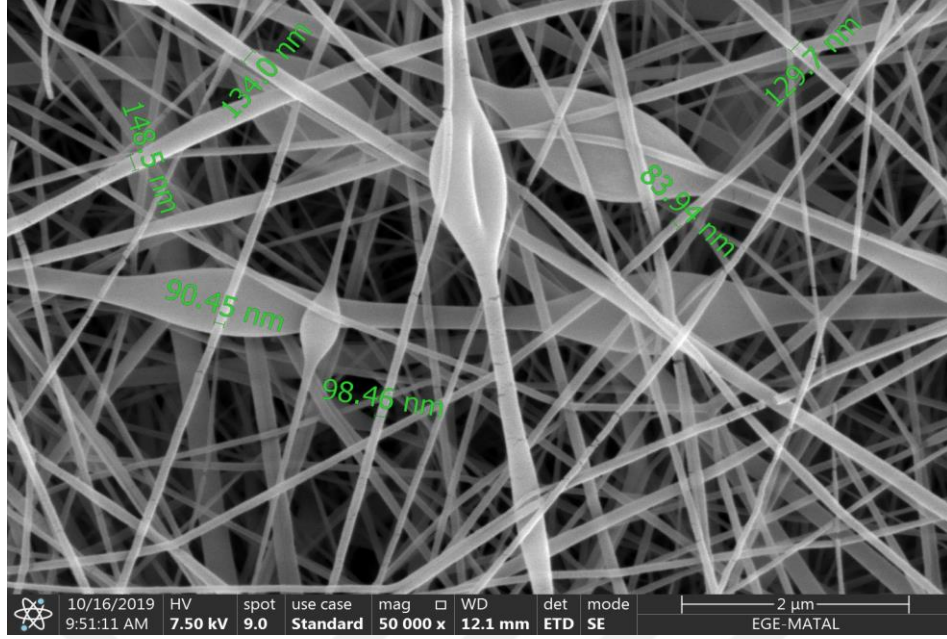
Şekil 33. LiBr çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde elektroğirilmesi ile elde edilmiş nanolifli yapının %70 etanol ile muamele edildikten sonra 50000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 2 μm 'ye denk gelmektedir.

%70 etanol ile muamele edilmiş iskelelerin ortalama çapları ise 305,73 ($\pm 32,23$) nm olarak belirlenmiştir.

Üçlü çözücü sisteminden elde edilmiş ipek fibroin %15 (w/v) konsantrasyonunda herhangi bir fiber yapısı gözlenememiştir. Bu sebepten dolayı konsantrasyon %66 arttırılarak %25 (w/v)'e çekilmiştir. Bu durumda ise ancak boncuklu bir fiber yapısı gözlemlenmiş ve ortalama çap 115 ($\pm 27,03$) nm olarak belirlenmiştir (Şekil 34 ve 35).

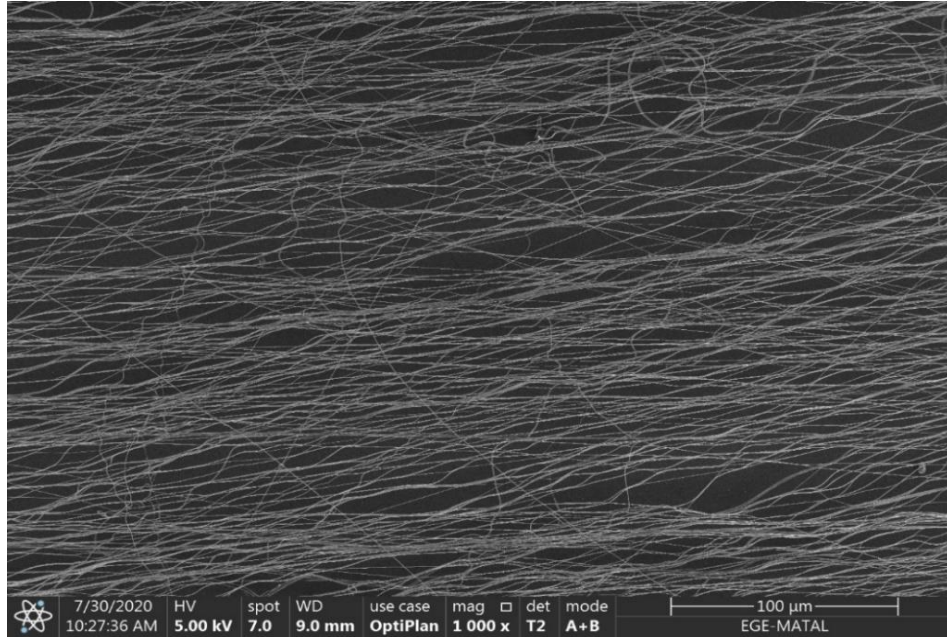


Şekil 34. Üçlü çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde elektroğirilmesi ile elde edilmiş nanolifli yapının 5000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Yoğun damla oluşumu gözlenmiştir. Ölçek izgisi 20 µm'ye denk gelmektedir.



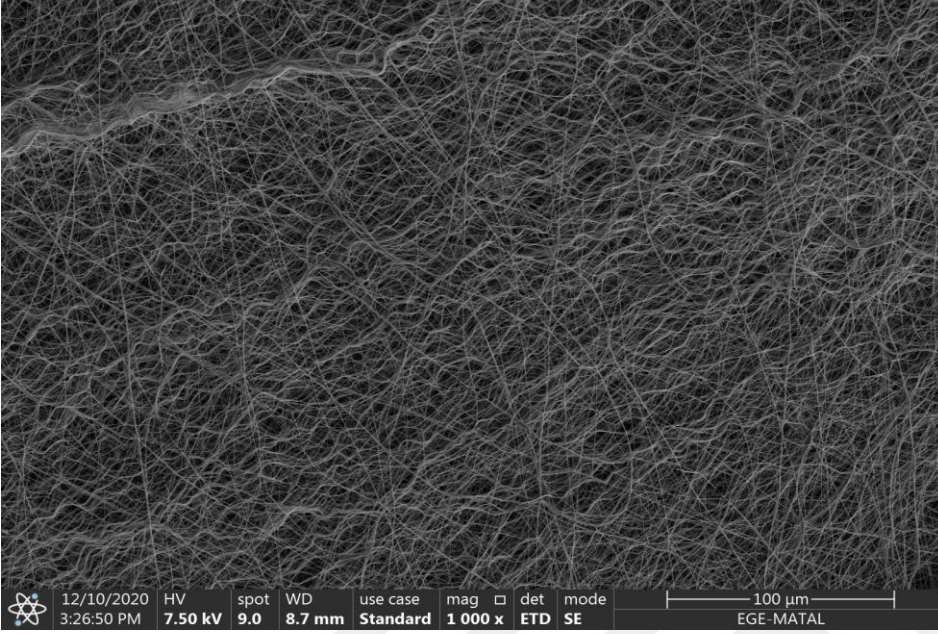
Şekil 35. Üçlü çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde elektroğirilmesi ile elde edilmiş nanolifli yapının 50000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 2 μ m'ye denk gelmektedir.

Paralel iki iletken plaka kullanılarak yönlendirilmiş fiberlere ait SEM görüntüleri ise Şekil 36'da verilmiştir. Paralel olarak yönlendirilmiş fiberlerin ortalama çapları $362 \pm (71)$ nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 36. LiBr çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde paralel plaka kullanılarak elektroğirilmesi ile yönlendirilmiş nanolifli yapının 1000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 100 μ m'ye denk gelmektedir.

Döner Tambur kullanılarak yönlendirilmiş fiberlere ait SEM görüntüleri Şekil 37'de verilmiştir. Bu teknik ile yönlendirilmiş fiberlerin ortalama çapları $439 \pm (107)$ nm olarak belirlenmiştir.



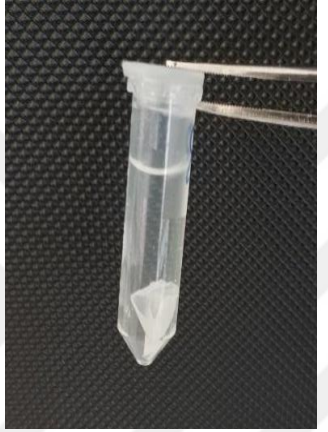


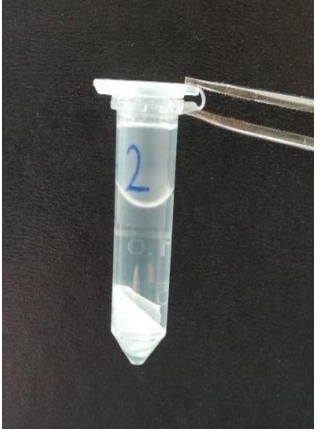




Şekil 37. LiBr çözücü sisteminin kullanılması ile elde edilen ipek fibroinin formik asit %15 (w/v) içinde döner tambur sistemi kullanılarak elektroğirilmesi ile yönlendirilmiş nanolifli yapının 1000x büyütmedeki SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 100 µm'ye denk gelmektedir.

4.5 Üretilen iskelelerin *in vitro* biyobozunurluğu

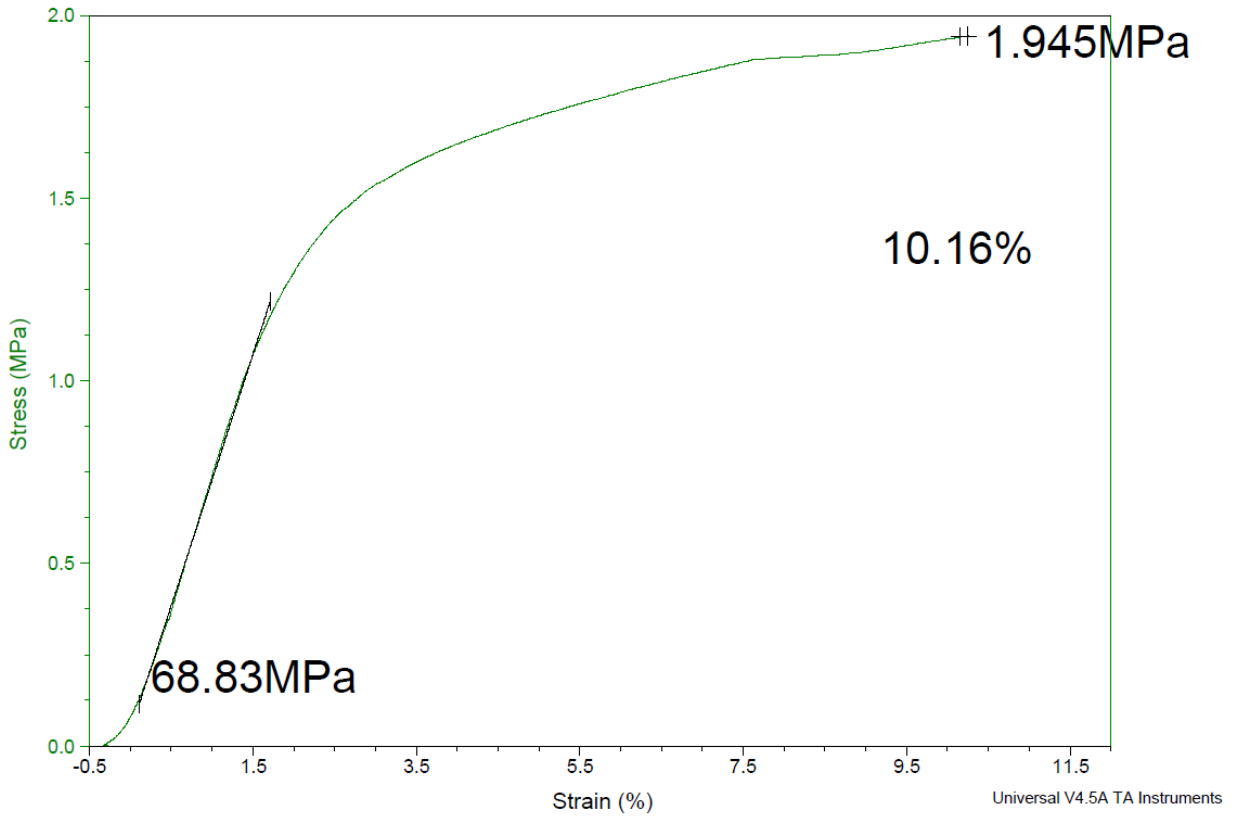
Elde edilen rastgele fiber yapılı ipek fibroin doku iskelelerinin *in vitro* biyobozunurluğunun belirlenmesi için $1.72 (\pm 0.122)$ cm² ipek doku iskeleleri PBS ve 5U ve 20U aktivitede olacak şekilde proteaz XIV (Sigma, P5147-1G) içeren PBS içerisinde bekletilmiştir. 20U aktivite de bırakılan iskeleler 24 saat sonunda parçalanmıştır. 4 hafta sonunda 5U ve PBS içindeki ipek fibroin iskelelerde gözle görülür bir kopma, erime, parçalanma gözlemlenmemiştir (Tablo 12).

Tablo 12. 5U proteaz ve PBS içerisindeki doku iskelelerinin haftalık fotoğrafları

Hafta	5U	PBS
1		
2		
3		
4		

4.6 İpek fibroin iskelelerinin mekanik özellikleri

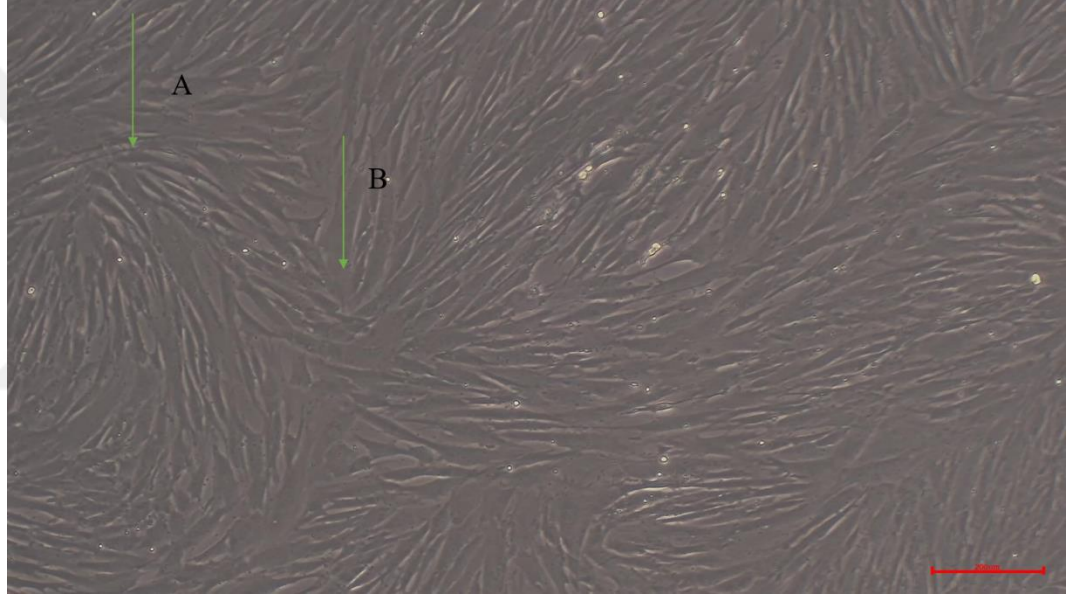
Üretilen ipek fibroin iskelelerinin başlangıç elastik modülü, en yüksek çekme mukavemeti ve % uzama değerleri elde edilen gerilim/gerinim eğrilerinden hesaplanmıştır (Şekil 37). Başlangıç elastik modülü, gerilim/gerinim eğrisinin lineer kısmının eğiminden yazılım kullanılarak 68.83 MPa olarak hesaplanmıştır. En yüksek çekme mukavemeti ise gene gerilim/gerinim eğrisinin ulaştığı en yüksek stres değeri üzerinden 1.945 MPa olarak belirlenmiştir. % uzama ise maksimum gerinim değeri olan %10,16 olarak belirlenmiştir (Şekil 38).



Şekil 38. İpek fibroin iskelesinin Gerilim/gerinim eğrisi.

4.7 DKH Kültürü

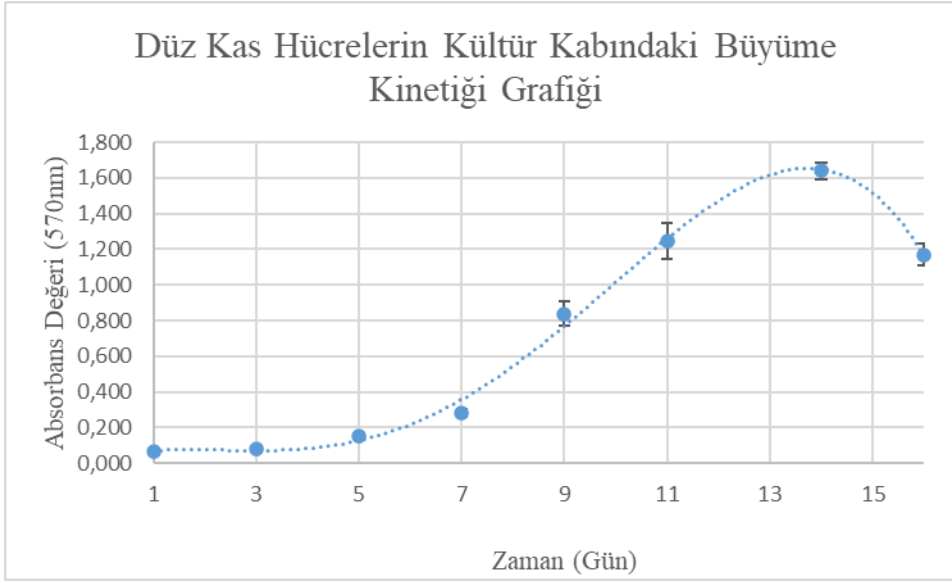
Bu tez çalışmasında kullanılan DKH hücrelerinin kültür kabındaki morfolojilerinin gözlemlenebilmesi için ışık mikroskobu görüntüleri alınmıştır (Olympus CK40, Japonya). Hücrelerde düz kas hücrelerine özgü uzatılmış iğ şeklindeki ve klasik tepe ve vadi görünümündeki fenotip özellikleri rahatlıkla gözlemlenebilmiştir (Şekil 39) (Beamish et al., 2010; Thakar et al., 2009). Hücreler pasaj 4 ile 6 arasında stoklanıp hücre çalışmalarında kullanılmıştır.



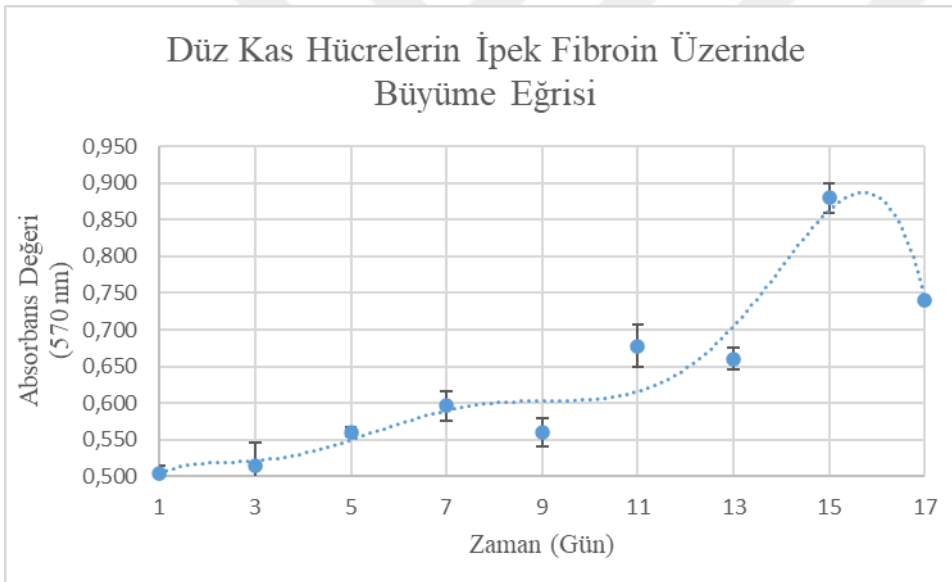
Şekil 39. Pasaj 4 düz kas hücrelerindeki tepe ve vadi oluşumlarının 5x büyütmedeki ışık mikroskobu görüntüsü. A harfi tepe oluşumunu B harfi ise vadi oluşumun göstermektedir. Ölçek çizgisi 200 μm 'ye denk gelmektedir.

4.8 DKH'lerin büyüme kinetiği

MTT testi kullanılarak normal kültür kabında ve rastgele fiber yapısına sahip iskeleler üzerindeki DKH'lerin büyüme kinetik grafikleri sırasıyla Şekil 40 ve Şekil 41'de verilmiştir. DKH'lerin yaklaşık olarak 16 günlük bir süre zarfında hem kültür kabında hem de iskele üzerinde eksponansiyel üreme fazlarını tamamladıkları görülebilmektedir. Hücrelerin hem kültür kabı hem de iskele üzerinde yaklaşık 16. günden sonra üremelerinin durduğu görülmüştür.



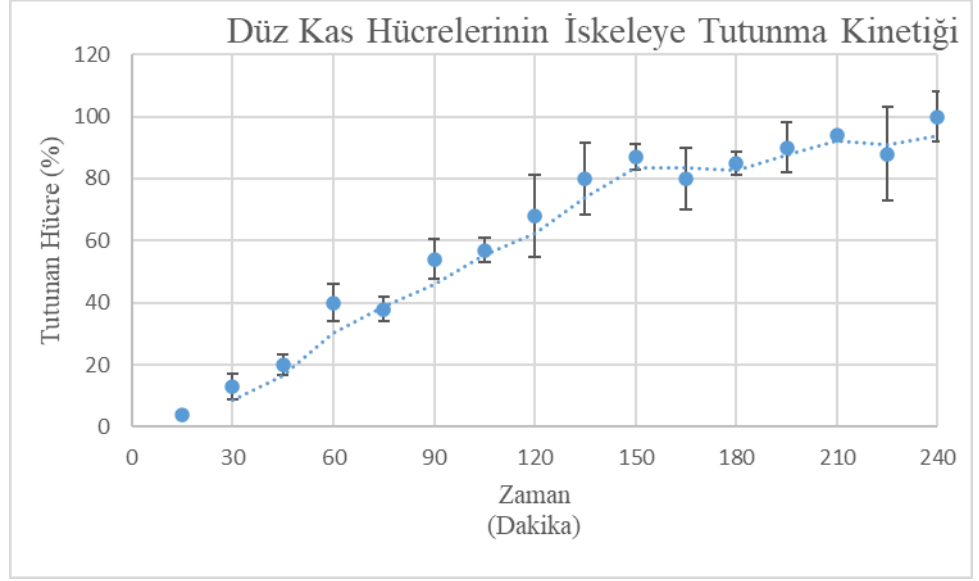
Şekil 40. DKH'lerin kültür kabındaki büyüme kinetiği grafiği.



Şekil 41. DKH'lerin ipek fibroin üzerinde büyüme kinetiği grafiği.

4.9 DKH'lerin iskele üzerine tutunma kinetiğinin belirlenmesi

DKH'lerin iskele üzerine tutunma kinetiği için hazırlanan grafik Şekil 42'de verilmiştir. Yaklaşık olarak 4 saat sonunda hücrelerin neredeyse tamamının iskele yüzeyine tutunduğu görülmüştür.

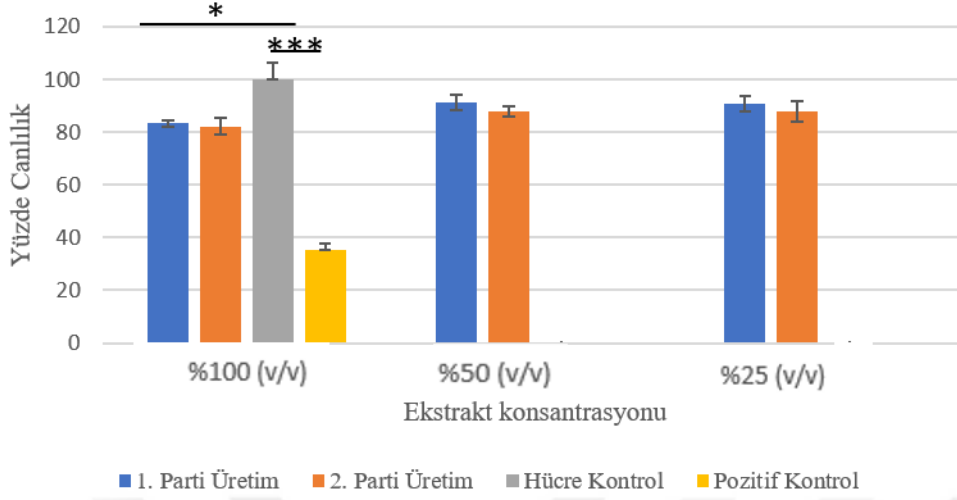


Şekil 42. DKH'lerin iskeleye tutunma kinetiği grafiği.

4.10 İpek fibroin iskelelerin sitotoksitesi

Üretilen ipek fibroin iskelelerin ISO 10993-12 standartlarına göre yapılan indirekt sitotoksite testi grafiği Şekil 43'de verilmiştir. Grafiğe göre farklı üretim partilerinden alınmış ipek fibroinlerden elde edilen %100 (v/v) ekstrakt konsantrasyonun kullandığı gruplarda normal ortam ile inkübasyonu yapılan hücre kontrol grubuna göre canlılıkta anlamlı bir düşüş görülmüştür, ancak bu düşüş %20'nin altındadır. %10 (v/v) oranında DMSO içeren ortam ile inkübe edilmiş pozitif kontrol grubunda ise tüm diğer gruplara göre canlılıkta anlamlı düşüş görülmüştür. ISO 10993-12'ye göre bir malzemenin toksik sayılabilmesi için canlılığın %70'in altına inmesi gerektiğinden üretilen ipek fibroin iskelelerin yapılan indirekt sitotoksite testine göre toksik olmadığı belirlenmiştir.

İpek Fibroin İskelelerinin 24 Saatlik Sitotoksisite Grafiği

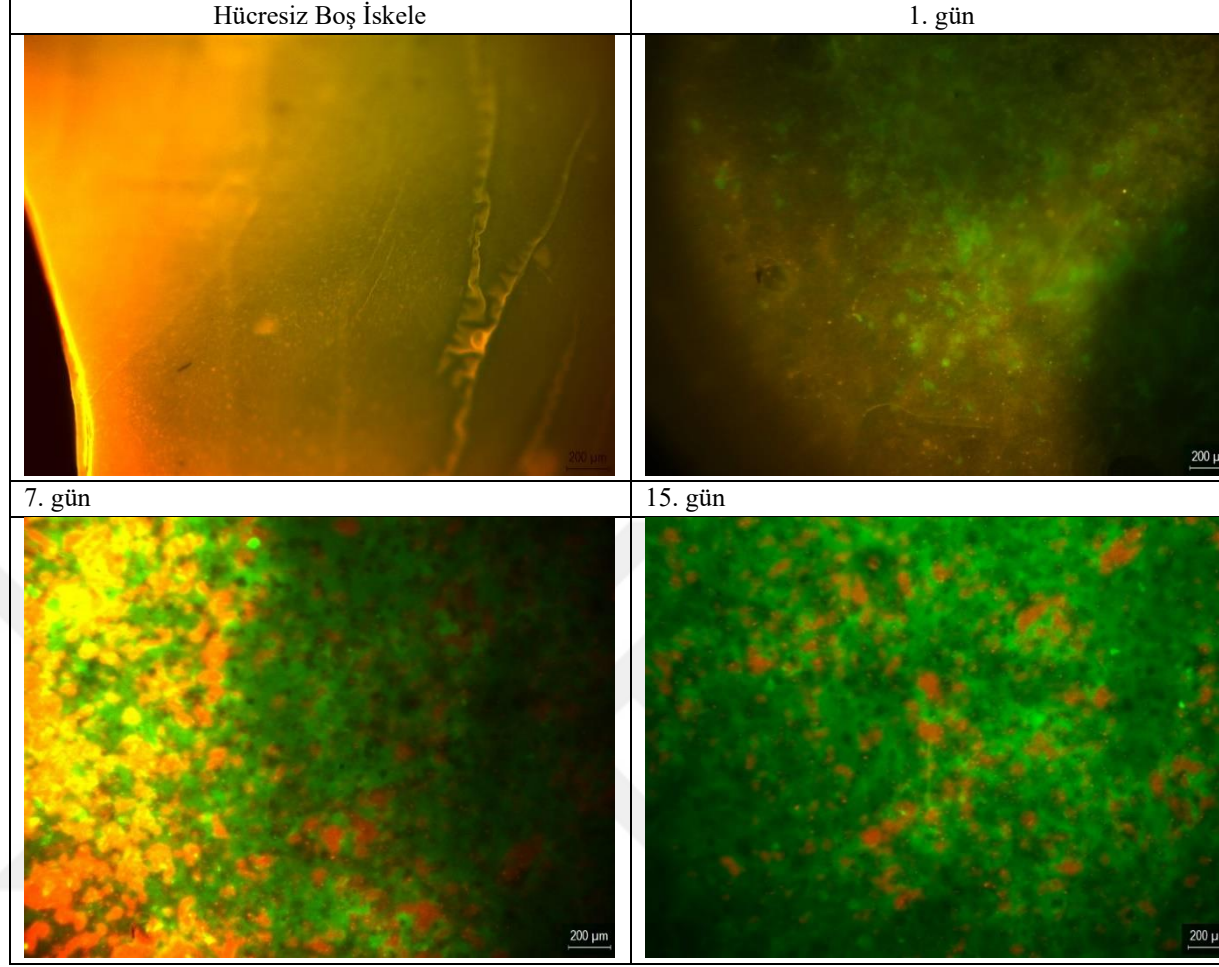


Şekil 43. DKH ile yapılan ipek fibroin sitotoksisite testi grafiği. (100%: 1/1 oranında ekstrakt içeren besi yerini, 50%: 1/2 oranında ekstrakt içeren besi yerini, 25%: 1/4 oranında ekstrakt içeren besi yerini, Hücre Kontrol; Hiçbir prosedür uygulanmamış taze besi yerini, Pozitif Kontrol ise; %10 (v/v) oranında DMSO içeren serumlu besi yerini ifade etmektedir.) (* $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$)

4.11 DKH'lerin iskele üzerindeki canlılıkları

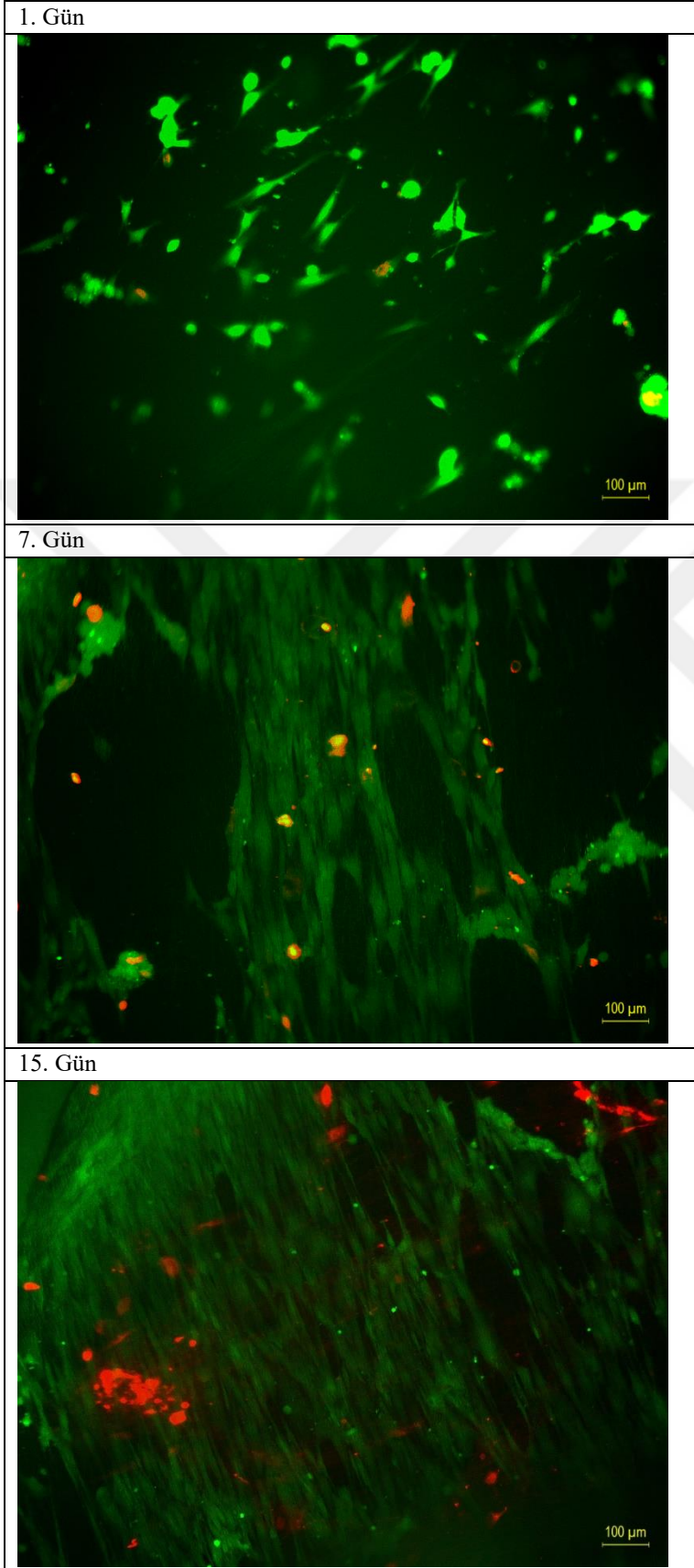
Live&Dead kiti ve rastgele fiber yapıları iskeleler kullanılarak yapılan canlılık çalışmasına ait fotoğraflar Tablo 13'te sunulmuştur. İpek fibroin kendi otofloresans özelliğinden dolayı Tablo 13'te de görülebileceği gibi 494 ve 528 nm uyarma ışıkları kullanılarak elde edilen ve birleştirilen fotoğraflarda turuncu/kırmızı şekilde görünmektedir. İpek fibroin iskeleler ile yapılan bir çalışmada da ipek fibroin iskelelerin otofloresans özellikleri rapor edilmiştir (Amirikia et al., 2017). Tablo 13'te 1. ve 7. günde görülebilen kırmızı renkler ölü hücreleri değil henüz DKH'lerin kaplamadığı ipek fibroin iskeleyi göstermektedir. 15. günde ise neredeyse iskelenin tamamının DKH'ler tarafından kaplandığı görülebilmektedir. İskelelerin kalınlığından dolayı daha net görüntüler elde edilememiştir. Buna rağmen DKH hücrelerinin ipek fibroin iskele üzerinde en az 15 gün boyunca canlı kalabildiği ve iskeleyi kapladığı gösterilmiştir.

Tablo 13. DKH'lerin rastgele fiber yapılı iskele üzerindeki Live&Dead fotoğrafları. Ölçek çizgileri 200 μm 'ye denk gelmektedir.



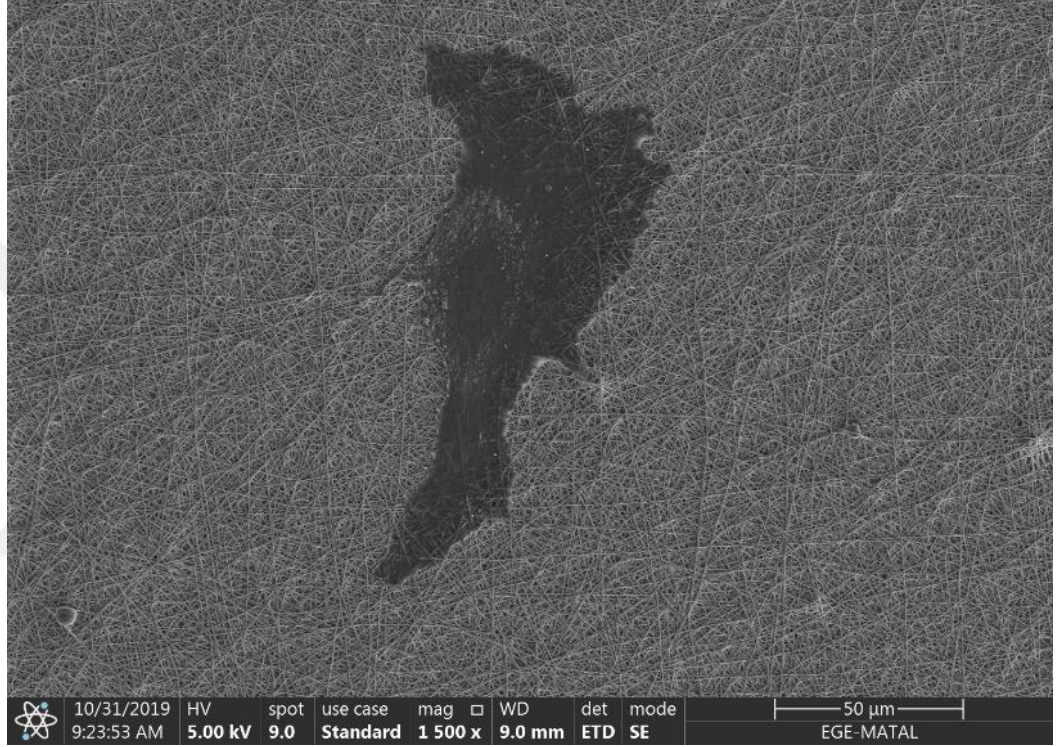
Ayrıca, aynı analiz yönlenmiş fiber yapılı iskeleler üzerine ekilmiş hücreler ile de gerçekleştirilmiştir. Bu analizin sonuçları ise Tablo 14'te verilmiştir. Yönlendirilmiş yüzeylerdeki DKH'lerin canlılık durumları da rastgele fiber yapısına sahip yüzeylere benzerlik göstermektedir. **Ayrıca, bu fotoğraflarda DKH'lerin fiberler doğrultusunda yönlendiği de açıkça görülebilmektedir.**

Tablo 14. DKH'lerin yönlenmiş fiber yapılı iskele üzerindeki Live&Dead fotoğrafları. Ölçek çizgileri 100 μm 'ye denk gelmektedir.



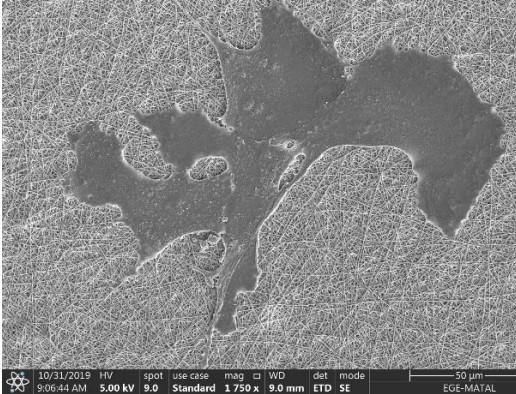
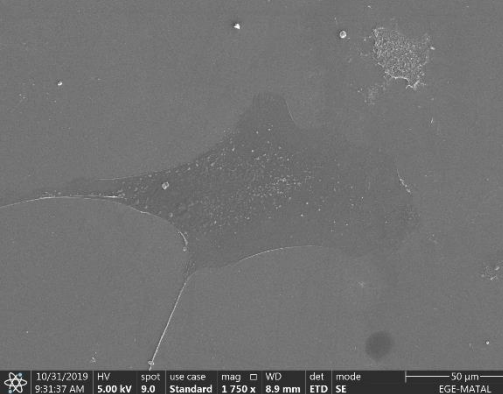

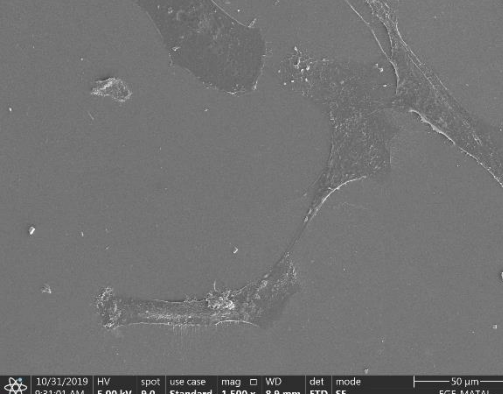
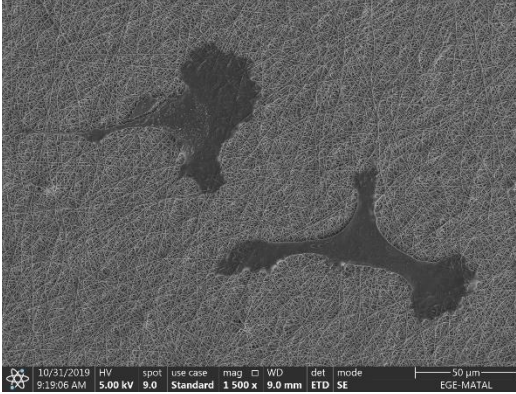
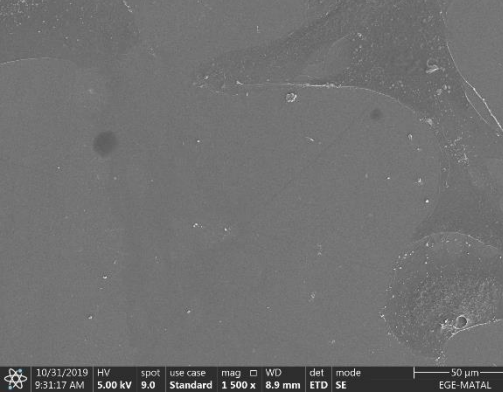
4.12 DKH'lerin iskele üzerindeki morfolojileri

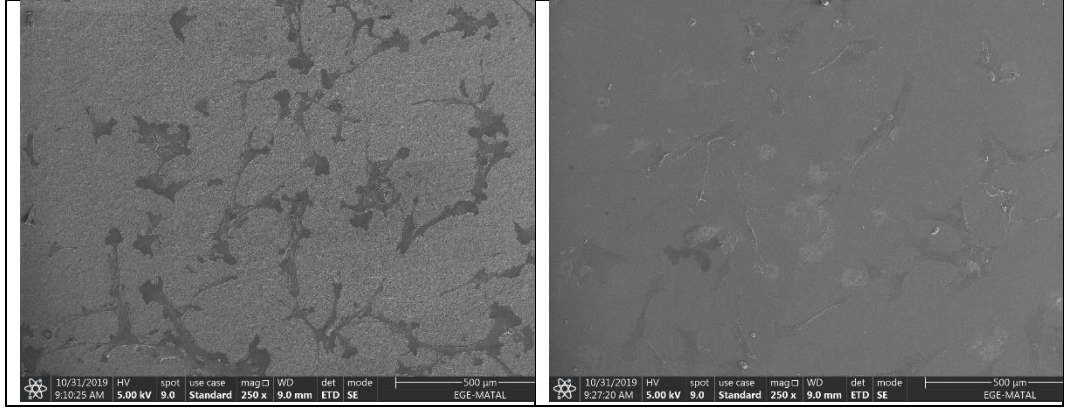
DKH'lerin rastgele fiber yapılı iskele üzerindeki morfolojilerinin incelenmesi için yapılan SEM analizi sonuçları Tablo 15'te ve Şekil 44'te verilmiştir. Hücre morfolojisinin karşılaştırılabilmesi için kontrol olarak cam coverslip kullanılmıştır.



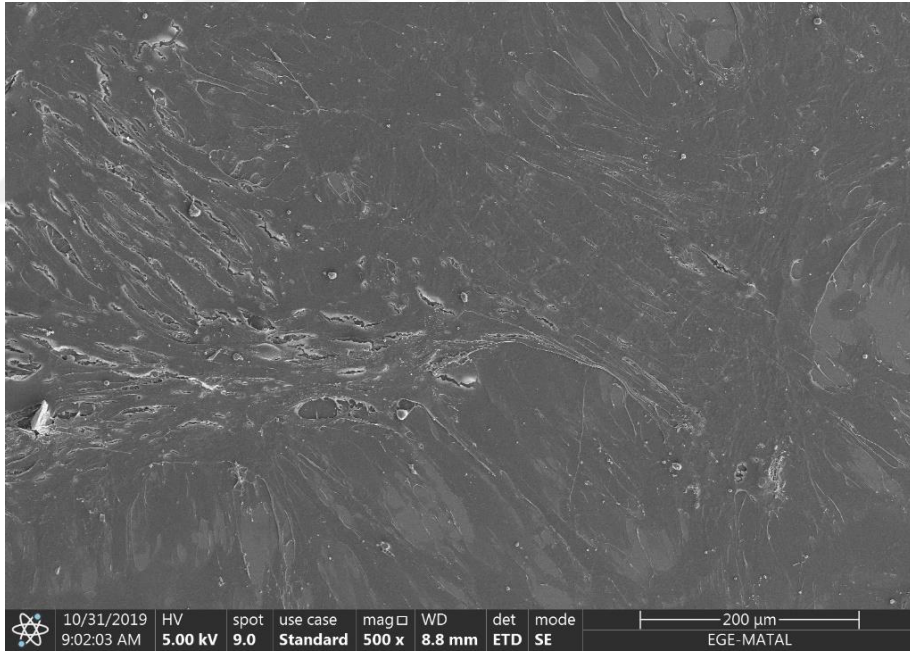
Şekil 44. İpek fibroin iskele üzerindeki DKH'nin 1500x büyütmedeki SEM görüntüsü. Hücrelerin rastgele iskele üzerinde yayılan bir morfoloji gösterdiği görülmüştür. Ölçek çizgisi 50 µm'ye denk gelmektedir.

Tablo 15. İpek fibroin iskele ve cam üzerindeki DKH'lerin SEM görüntüleri. Rastgele fiber yapıda ipek fibroin ve cam yüzeyler üzerinde kültüre edilen hücrelerin morfolojileri arasında fark görülmektedir.

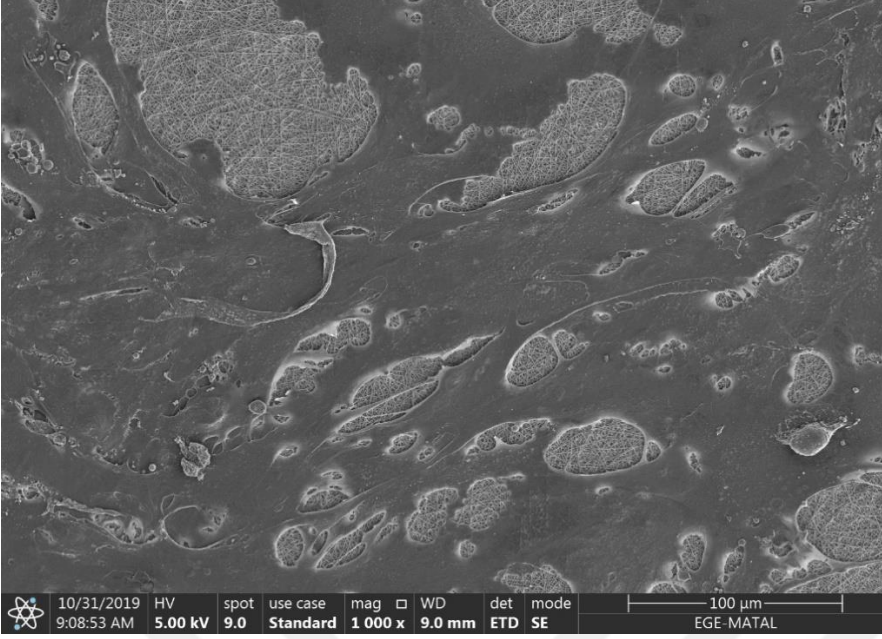
Eğrilmiş ipek fibroin Yüzeyi	Cam coverslip yüzeyi
1750x Büyütme. Ölçek çizgisi 50 μ m'ye denk gelmektedir.	
	
1500x Büyütme. Ölçek çizgisi 50 μ m'ye denk gelmektedir.	
	
	
250x Büyütme. Ölçek çizgisi 500 μ m'ye denk gelmektedir.	



Tablo 14'te de görülebildiği gibi DKH morfolojilerinin cam yüzey ve iskele yüzeyinde oldukça benzer olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, gene SEM analiziyle hücrelerin iskelenin yüzeyini kaplama miktarı da araştırılmıştır (Şekil 45 ve 46). Şekil 46'te görülebildiği gibi hücreler iskele yüzeyini çok büyük oranda kaplayabilmektedir.



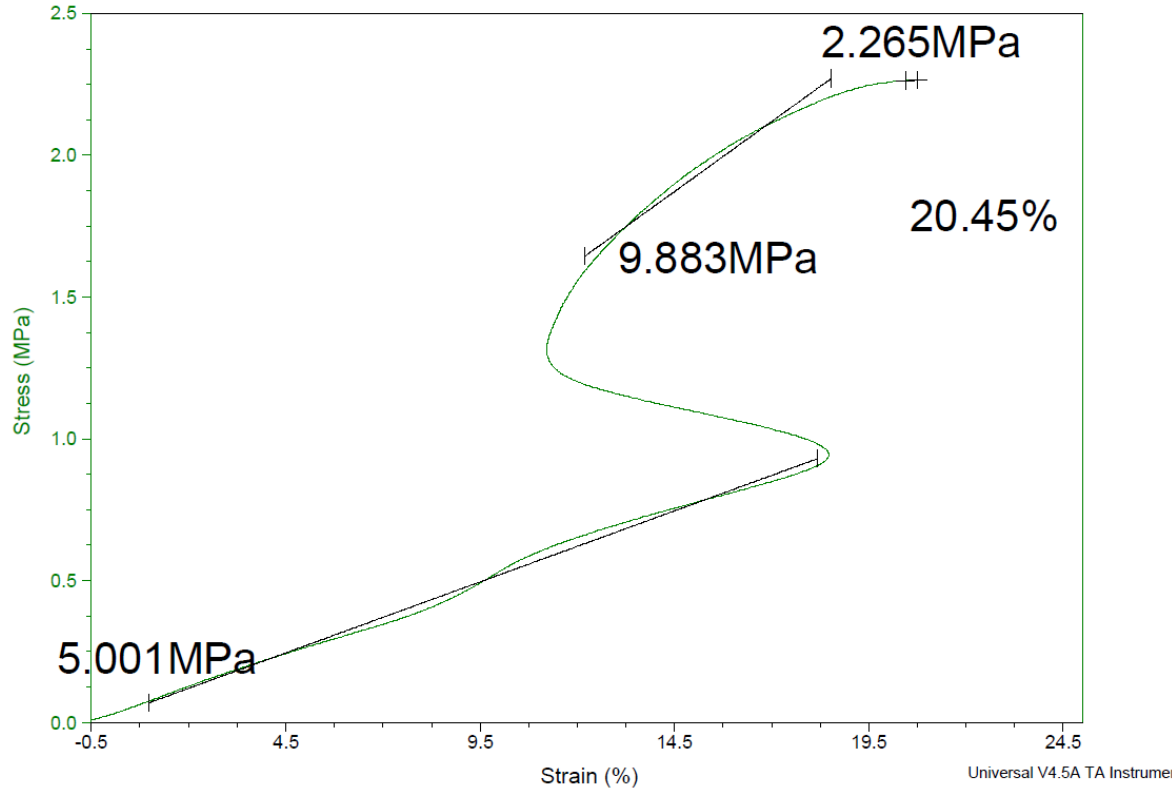
Şekil 45. DKH'lerin cam yüzeydeki morfolojisinin SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 200 µm'ye denk gelmektedir.



Şekil 46. DKH'lerin ipek fibroin iskele üzerindeki morfolojisinin SEM görüntüsü. Ölçek çizgisi 100 µm'ye denk gelmektedir.

4.13 DKH ekilmiş iskelelerin mekanik analizi

DKH ekilmiş rastgele fiber yapılu iskelenin elastik modülü, en yüksek çekme mukavemeti ve % uzama elde edilen gerilim/gerinim eğrilerinden hesaplanmıştır (Şekil 47). Elastik modül için gerilim/gerinim eğrisinin lineer kısımlarının eğiminden yazılım kullanılarak 9.883 ve 5 MPa olarak hesaplanmıştır. Bu iki farklı değer in iskelenin analiz sırasında kurduğu için iki farklı eğim göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. En yüksek çekme mukavemeti ise gene gerilim/gerinim eğrisinin en ulaştığı en yüksek stres değeri üzerinden 2.265 MPa olarak belirlenmiştir. % uzama ise maksimum gerinim değeri olan %20,45 olarak belirlenmiştir.

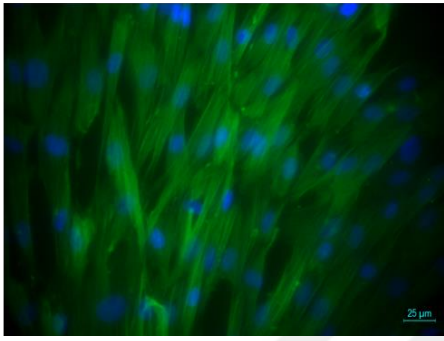


Şekil 47. DKH ekilmiş ipek fibroin iskelesinin gerilim/gerinim eğrisi.

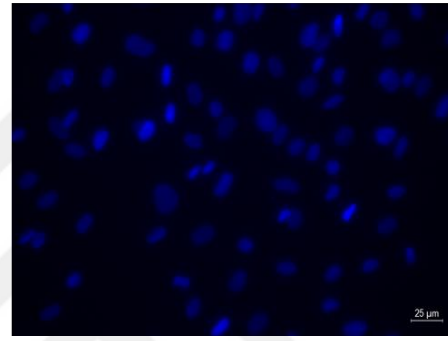
4.14 İmmünofloresans boyamalar

İmmünofloresans boyama için kullanılan yeşil renkli sekonder antikorunun spesifik olmayan bağlantılar yapmadığını göstermek için α -SMA primer antikorunu uygulanmış ve uygulanmamış örnekler sekonder antikor ile inkübe edilmiştir (Şekil 48). Düz kas hücrelerinin kendileri α -SMA antikorunu için pozitif kontrol niteliği taşıdığından ekstra bir pozitif kontrol denenmemiştir.

α -SMA ile inkübe edilmiş TDKH'ler



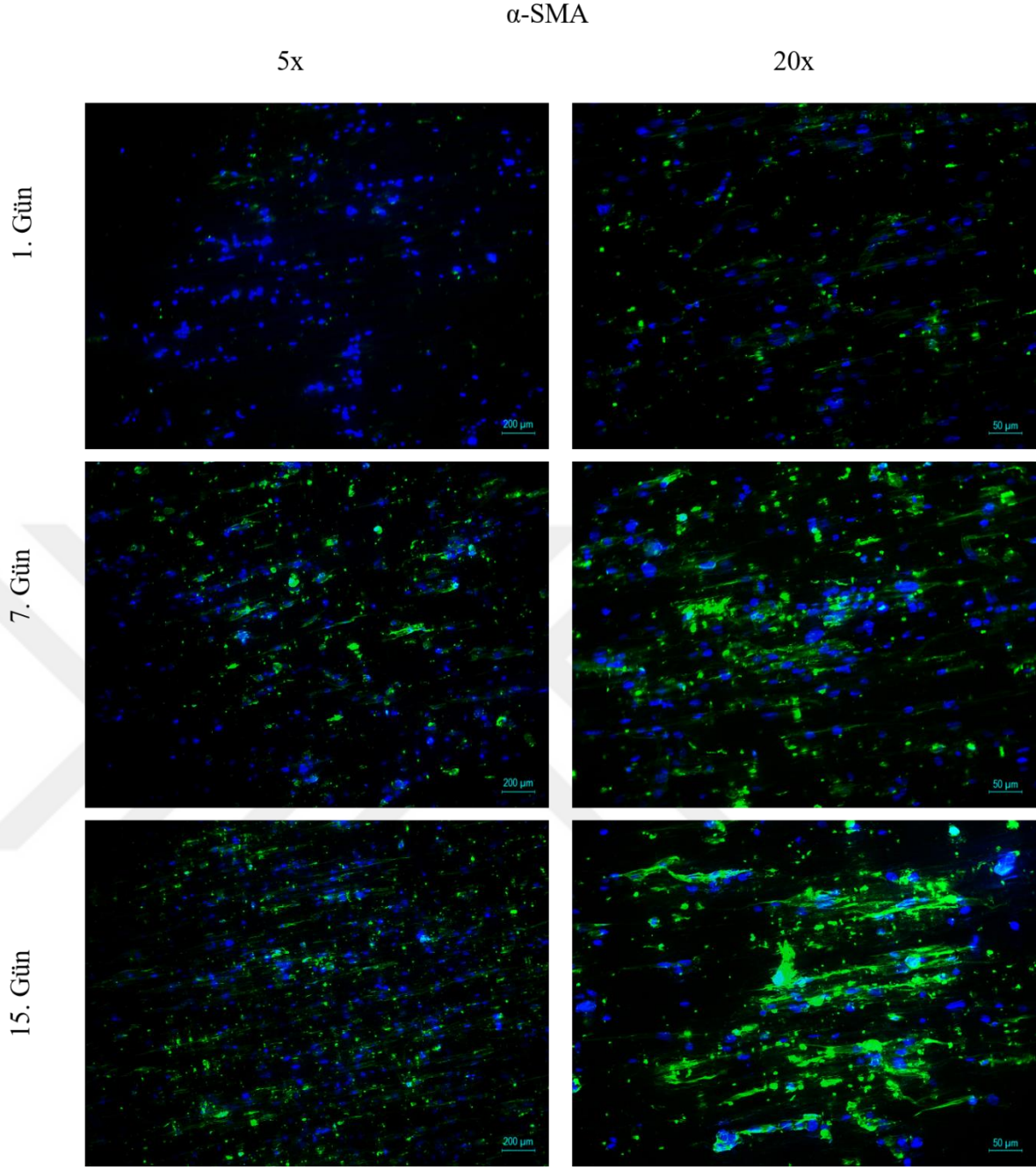
α -SMA ile inkübe edilmemiş TDKH'ler



Şekil 48. Sekonder antikorun doğru çalıştığını gösteren IF boyamaların sonuçları. Ölçek çizgileri 25 μ m'ye denk gelmektedir. Mavi renk DAPI ile işaretlenmiş çekirdeği, Yeşil renk ise α -SMA'yı ifade etmektedir.

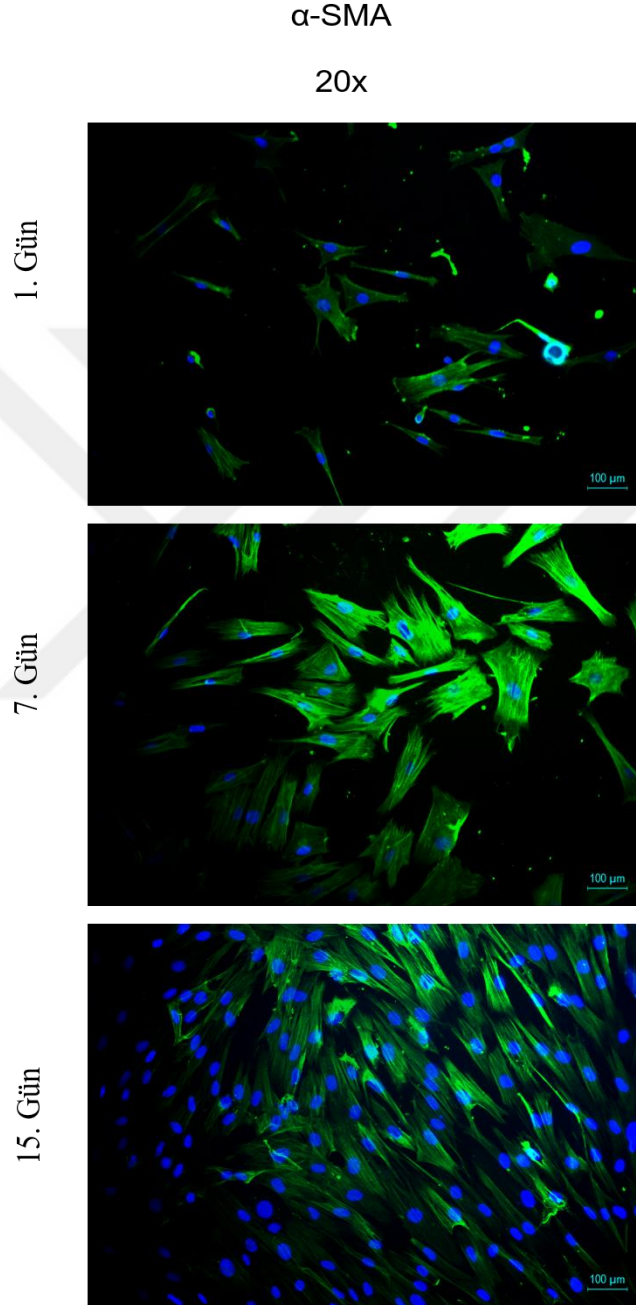
Şekil 48'deki fotoğraflarda görülebileceği gibi primer antikor ile inkübe edilmemiş örneklerde, primer antikora spesifik olan yeşil renkli sekonder antikorunun bağlanacağı bölge bulunmadığı için herhangi bir boyama görülmemiştir. Bu sebeple antikorların düzgün çalıştıkları sonucuna ulaşılmıştır.

Antikorların çalışması beklendiği şekilde çalıştığının görülmesinden sonra yönlendirilmiş iskelelerde kültürü yapılan DKH'lerin α -SMA ile yapılmış IF boyama sonuçları ise Şekil 49'da verilmiştir.



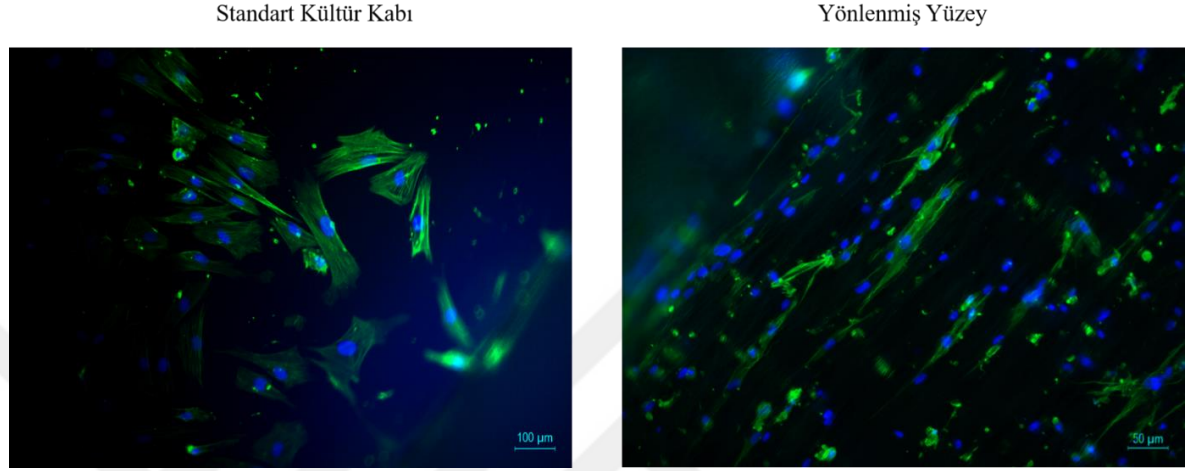
Şekil 49. Yönlendirilmiş yüzeylerde kültürü yapılan DKH'lerin α -SMA ifadelerinin fotoğrafları. Mavi renk DAPI ile işaretlenmiş çekirdeği, Yeşil renk ise α -SMA'yı ifade etmektedir. (Ölçek çizgileri 5x fotoğrafları için 200 μ m'ye, 20x fotoğrafları için ise 50 μ m'ye denk gelmektedir.)

Şekil 49’da da görülebildiği gibi 7. günden sonra α -SMA ifadesi artmış ve 15. günde fiber doğrultusunda yönlene hücrelerin α -SMA ifadeleri iyice belirginleşmiştir. Ayrıca, normal kültür kabında kültürü yapılan hücrelerin α -SMA ile yapılmış IF boyama sonuçları da Şekil 50’de verilmiştir.



Şekil 50. Plastik kültür kabında kültürü yapılan DKH’lerin α -SMA ifadelerinin fotoğrafları. Mavi renk DAPI ile işaretlenmiş çekirdeği, Yeşil renk ise α -SMA’ yı ifade etmektedir. Ölçek 100 μ m’ye denk gelmektedir.

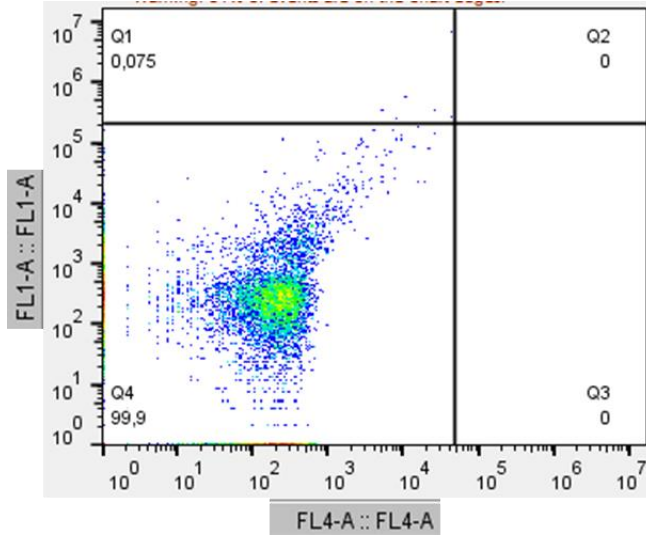
Şekil 50’de görülebileceği gibi aynı ipek fibroin iskele üzerinde olduğu gibi kültür kabında α -SMA ifadesi 7. günden sonra çok belirgin şekilde görülebilmektedir. Ayrıca, Şekil 51’de kültür kabında kültürü yapılan hücrelerin yönlenmiş yüzeylerde kültürü yapılan hücrelere göre yüzeye daha fazla yayılmış bir durumda tutundukları açıkça görülebilmektedir.



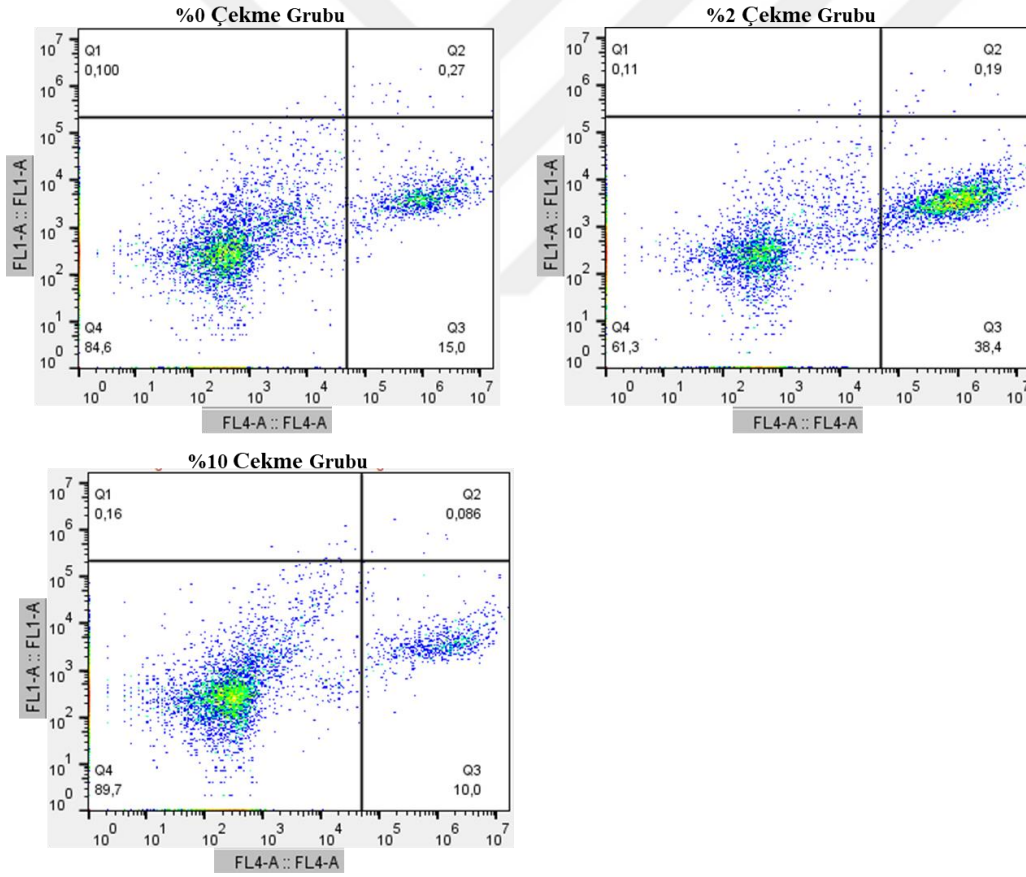
Şekil 51. Kültür kabı ve yönlenmiş yüzeyde kültürü yapılan hücrelerin α -SMA ifadelerinin fotoğrafları. (Ölçek çizgileri soldaki fotoğraf için 100 sağdaki fotoğraf için 50 μ m’yi ifade etmektedir.)

4.15 Akış sitometrisi analizleri

Öncelikle α -SMA ile işaretlenmemiş hücrelerin nokta alan grafiğindeki dağılımları incelenmiş ve bu hücre dağılımının tamamını içeri alacak şekilde grafik bölgelere ayrılmıştır (Şekil 52). Bu grafiğe uygulanan kriterler, %0, %2 ve %10 çekme miktarı uygulanmış iskelelerden kaldırılan ve α -SMA antikoru ve kırmızı ışığa veren sekonder antikor ile işaretlenen hücrelerin akış sitometri verilerine uygulanmıştır (Şekil 53). Şekil 52’de de görülebilen dağılımları Q4 bölgesinden Q3 bölgesine kayan hücrelerin ışığa verdiği kabul edilmiştir.

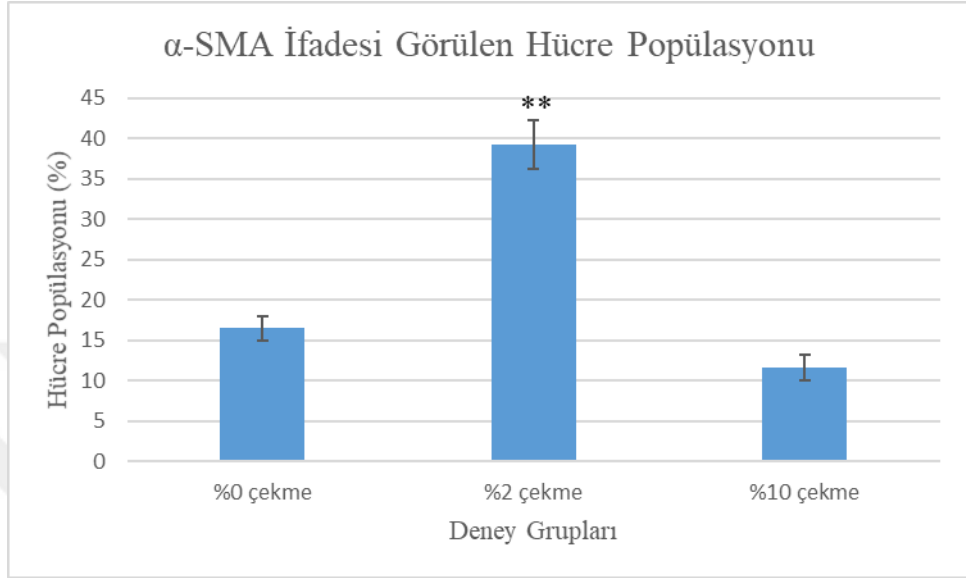


Şekil 52. Antikor ile işaretlenmemiş düz kas hücreleri ile yapılmış akış sitometri verisi



Şekil 53. İskele üzerinde farklı çekme miktarlarına maruz kalmış hücrelerin α -SMA antikoruna ile işaretlenmiş akış sitometrisi verileri

Şekil 53'teki grafiklerin Q3 bölgesinde görülebildiği gibi farklı çekme gruplarında α -SMA ifadesini gösteren farklı hücre popülasyon miktarları tespit edilmiştir. Bu tespit edilen hücre popülasyonları grafiğe dökülüp istatistiksel analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 54).



Şekil 54. Farklı çekme miktarları ile α -SMA ifadesi gösteren hücre popülasyonu ilişkisi grafiği. %2 çekme grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılık görülmüştür. (** $p < 0.01$)

Şekil 54'te de görülebileceği gibi biyoreaktör kullanılarak %2 çekme uygulanan grupta, %0 ve %10 çekme uygulanan gruba göre α -SMA ifadesi gösteren hücre popülasyonu miktarında anlamlı bir artış görülmüştür. Hiç çekme yapılmayan grup ile %10 çekmeye maruz bırakılan grup arasında ise α -SMA ifadesinde anlamlı bir fark görülmemiştir.

5. TARTIŞMA

5.1 İpek fibroin ve eldesi

Farklı kaynaklardan elde edilebilmesine rağmen genelde *Bombyx mori* kozalarından ekstrakt edilen fibroin, mekanik olarak dayanımı yüksek, biyoyumluluğu ve biyobozunurluğu bakımından biyomedikal uygulamalar için uygun bir doğal polimerdir (Nisal et al., 2018). Bu kozalardan ekstraksiyonu gerçekleştirilen ve rejenerasyonu sağlanan ipek fibroinlerden üretilmiş iskeleler üzerinde kök hücreler, fibroblastlar, kondrositler, keranositler, nöranlar veya kas hücreleri gibi pek çok farklı hücre tipinin kültürü farklı amaçlarla gerçekleştirilebilmiştir (Hou et al., 2016; Kundu et al., 2013; W. Zhang et al., 2014).

Hücre kültüründe kullanılan ipek fibroinlerin, kozadan iskele üretmeye uygun hale getirilmesini kaplayan serisinden uzaklaştırma, çözünme ve diyaliz işlemlerinin bütününe ipek fibroin'in rejenerasyonu adı verilir. Bu rejenere edilmiş ipek fibroin daha sonra farklı üretim yöntemleri ile istenen fiziksel özelliklerde doku iskelelerine dönüştürülebilir. Serisinden uzaklaştırma işlemi, ipeğin yapısında bulunan iki ana proteinden biri olan serisinin ipek fibroinden ayrılması işlemidir ve genelde kozaların hafif alkali suda kaynatılması ile gerçekleştirilir. Suyu alkali hale getirmek için seçilen ajan ve kaynatma süresi gibi parametreler sonucu farklı oranlarda serisinden uzaklaştırma verimi yüzdesi elde edilebilir. Serisin, vücutta çeşitli immün yanıtlar oluşturabildiğinden ipek fibroinden ayrılması son ürünün biyoyumluluğu açısından oldukça önemlidir (Correa et al., 2020; Yongzhong Wang et al., 2006). **Bu çalışmada kozaların NaHCO_3 kullanılarak alkali hale getirilen suyun 100 C°'de 30'ar dakikadan 3 kere işlenmesi sonucu %29'luk bir serisinden uzaklaştırma yüzdesi elde edilmiş ve serisin başarılı bir şekilde ipek fibroinden ayrılabilmiştir.** Bu oran, serisinden uzaklaştırma işlemi sonrası ipekte gözlenen kütle kaybının yüzdesini ifade etmektedir. Bu elde edilen yüzde değeri literatürde geniş bir aralıkta, %10 ve %33 değerinin arasında rapor edilmiştir (Cengiz et al., 2019; Kundu et al., 2013; Teuschl et al., 2015; H. Y. Wang & Zhang, 2013). Ayrıca, kozalardaki serisin miktarının yaklaşık % 20 ile 30 arası olduğu rapor edildiğinden bu çalışmada elde edilen %29 oranı serisinin başarıyla uzaklaştırıldığını belirtmektedir (Kishimoto et al., 2017; Yoon et al., 2013).

Serisinden uzaklaştırma işleminden sonra elde edilen ipek fibroin fiberleri suda çözünemedikleri için bu fiberlerin çözünebileceği bir solüsyon hazırlamak için, proteinleri destabilize edip çözünmesini sağlayan konsantre haldeki doğal tuz solüsyonları kullanılmalıdır. İpek fibroinin film, jel, fiber gibi farklı formlara işlenebilmesini sağlamak için pek çok farklı çözücü sistemi kullanılabilmesine rağmen bu işlem için en sık kullanılan ajanlar LiBr:su çözücü sistemi ve CaCl₂:su:etanol üçlü çözücü sistemidir (Catto et al., 2015; Rockwood et al., 2011; van Uden et al., 2019; F. Zhang et al., 2011). Sıvıda çözülmüş ipek fibroin fiberlerini doku mühendisliği uygulamalarında kullanmak üzere işlemek için solüsyondaki yüksek tuz miktarının elimine edilmesi gereklidir. Bu işlem genelde diyaliz membranları veya kasetleri kullanılarak rahatlıkla yapılabilmektedir (Ferraz, 2014). **Bu çalışmada da ipek fibroinler bahsedilen iki çözücü sistemi kullanılarak çözülmüş ve daha sonra elektroğirme işleminde kullanılmak üzere başarıyla diyalizi gerçekleştirilip liyofilize edilmiş ve köpük formunda ipek fibroin elde edilebilmiştir. Ayrıca, LiBr:su çözücü sisteminde çözülmeden önce ve çözüldükten sonra yapılan tartımlara göre solüsyondaki ipek fibroin konsantrasyonunun %5 (w/v) olduğu belirlenmiştir.** Bu değer literatürde genelde rapor edilmiş % 4 ile 8 (w/v) arasında olduğu görülmüştür (Ferraz, 2014; Rockwood et al., 2011; Zheng et al., 2016).

Diyaliz işlemi sonrası liyofilize edilmiş köpük haldeki ipek fibroin'lerin karakterizasyonu FTIR yöntemi ile yapılmıştır. Bulgular kısmındaki şekil 22 ve 23'de de görülebileceği gibi hem LiBr hem de üçlü çözücü sisteminin kullanıldığı ipek fibroin köpüklerinde literatürdeki diğer çalışmalarda da görülebilen **1640 – 1670 cm⁻¹ arası C-O gerilmesi, 1520 –1540 cm⁻¹ arası N-H deformasyonları, 1265 – 1313 cm⁻¹ arası C-N gerilmesi ve N-H bükülmesi olmak üzere tüm karakteristik pikler çok rahat bir biçimde gözlemlenmiştir** (Kamalha et al., 2013). Her iki çözücü sistemi ile elde edilen ipek fibroin'lerin bu karakteristik pikleri arasında 2 ile 5 cm⁻¹ arasında değişen pik kaymaları gözlemlenmesine rağmen bu kaymaların bir anlam ifade ettiği düşünülmemektedir. Bu gözlemlenen piklere göre elektroğirme işlemine hazır ipek fibroin'lerin başarıyla elde edildiğine karar verilmiştir (Chen et al., 2001).

5.2 Rastgele ve yönlendirilmiş ipek fibroin fiber yapılı iskele üretimi

Liyofilize haldeki rejenere edilmiş ipek fibroin köpüklerinden rastgele ve yönlendirilmiş fiber yapılı doku iskeleleri üretmek için elektroğirme yöntemi kullanılmıştır.

Elektroğirme yönteminde, sonuçta oluşacak fiberlerin fiziksel özelliklerini etkileyebilecek pek çok solüsyon ve proses parametresi olmasına rağmen polimer konsantrasyonu ilk karar verilmesi gereken en önemli parametredir. Polimer konsantrasyonunun çok düşük olduğu durumlarda sadece damlacıklar oluşur. Konsantrasyonun çok yüksek olduğu durumlarda ise artan viskozitenin yüzey gerilim kuvvetini arttırması sonucu fiberleri oluşturacak jet iğne ucunda oluşamaz. Bu çalışmada ipek fibroin elektroğirilmesi için literatürde rapor edilen %8 ile %20 (w/v) arası farklı konsantrasyonlardan %15 (w/v) oranı seçilmiş ve eğirme işlemleri bu konsantrasyon üzerinden yapılmıştır. Hali hazırda literatürde çok düşük ve çok yüksek konsantrasyondaki eğirme işlemlerinde fiberlerde oluşan damla yapısı, kesikli fiber veya s harfi şeklinde oluşan kıvrılmış fiber yapısı gibi istenmeyen durumlar raporlanmıştır (Z. Liu et al., 2015; Min et al., 2004; Yi et al., 2018; Yoon et al., 2013). Ayrıca, eğirme solüsyonu içindeki polimer konsantrasyonu doğrudan viskoziteyi etkilediği için göz ile yapılan ön denemeler sonucunda elektroğirmeye en uygun viskozitenin %15 (w/v) ipek fibroin konsantrasyonunda elde edildiğine karar verilmiştir.

LiBr çözücü sistemi kullanılarak üretilmiş ipek fibroinden rastgele dizili fiber yapılarının elde edilebilmesi için farklı voltaj, uzaklık ve akış hızı parametreleri denenmiştir. Polimerden polimere değişebilse de genel kural olarak voltaj değeri kritik noktaya kadar arttıkça fiber oluşma ihtimali ve fiber çapı artar, akış hızı kritik noktaya kadar arttıkça fiber çapı artar ve mesafe arttıkça fiber çapı azalır. Bilindiği gibi metalik iğne ucuna uygulanan yüksek voltaj değeri, iğne ucundaki polimer damlasını “Taylor konisi” haline getirmektedir (Haider et al., 2018). Öncelikle denenecek voltaj aralığına iğne ucunda Taylor konisi oluşup oluşmadığı kontrol edilerek karar verilmiştir. Taylor konisi 12 ile 15 kV voltaj değerleri arasında gözlemlenebilmiştir. Daha sonra akış hızı değiştirilerek belirlenen voltaj değerleri arasında oluşan Taylor konisinin devamlılığının sağlanabildiği 0.15 ile 2 mL/saat

akış hızı aralığının incelenmesine karar verilmiştir. Bu belirlenen voltaj ve akış hızı değerleri aralığında farklı uzaklıklar denenmiştir. Oluşan fiberlerden ışık mikroskobu altında, çapları, homojenliği, morfolojileri gibi kriterler göz önünde bulundurulmuş ve seçim yapılmıştır. Örnek olarak Tablo 8' deki fotoğraflarda da görülebileceği gibi 0.550 mL/saat hızında ve 14.5 kV voltaj değerinde mesafe 10 cm iken fiber yapısı herhangi bir kıvrıma sahip değilken mesafe 8 cm'ye düşürüldüğünde de 15 cm'ye çıkarıldığında da fiber yapısında kıvrılmalar ve kırılmalar görülmüştür. Bu morfolojik farklılıkların büyük çoğunlukla solüsyonun buharlaşma süresinin değişmesinden olduğu düşünülmektedir (Matabola & Moutloali, 2013). **Bu çalışmada denenilen pek çok parametrede LiBr çözücü sistemi kullanılarak üretilmiş ipek fibroinden fiber oluşumu görülmüştür. Fakat, fiber morfolojisinin homojenliği, fiberlerdeki oluşan deformasyonların ve fiberlerde oluşan kıvrılmanın azlığı sebebiyle 0.35 mL/saat akış hızı 14.5 kV voltaj değeri ve 10 cm uzaklık mesafesi parametrelerinin rastgele fiber yapılı iskelelerin üretimi için kullanılmaya karar verilmiştir.** Fakat, bu denen parametreler üçlü çözücü sistemi kullanılarak üretilen ipek fibroinler için doku iskelesinde istenmeyen şekil 34 ve 35'te de görülebileceği gibi boncuk oluşumu, kesikli ve kıvrık morfolojiye sahip fiber oluşumuna yol açmıştır. İki çözücü sistemden elde edilmiş ipek fibroinlerin elektroğirilmesi sırasında karşılaşılan bu farkın, saflaştırılmış ipek fibroin'in farklı molekül ağırlıklarına sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Üçlü çözücü sisteminde elde edilen ipek fibroin'lerin LiBr çözücü sisteminde elde edilenlere göre daha düşük molekül ağırlığına sahip oldukları bilgisi literatürde mevcuttur (Q. Wang et al., 2013). Ayrıca, ipek fibroin, koza aşamasından elektroğirme aşamasına kadar serisinden uzaklaştırma, çözücü sistemi içinde çözülme, diyaliz ve tekrar eğirme amacı ile çözücü içinde çözülme aşamalarından geçmektedir. Bu sebepten dolayı üretilmiş farklı parti ipek fibroinleri eğilmesi sonucu farklı fiber morfolojileri görülebilmektedir. **Bu sebeple, her ne kadar LiBr çözücü sistemi ile üretilen ipek fibroin'den fiber yapılı iskele üretmek için parametreler optimize edilmiş olsa bile, farklı üretim partilerinden elde edilmiş ipek fibroin'ler için bu parametrelerde ufak değişiklikler yapılması gerekebilmektedir. Bu parametrelerde ufak değişiklikler eğirme işlemi optimizasyonu için belirlenen sınır değerler içinde kalmaktadır.** Literatürde de LiBr çözücü sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiş birçok çalışmada elektroğirme işlemi için farklı

parametreler rapor edilmiştir (Catto et al., 2015; Cengiz et al., 2019; Millán-Rivero et al., 2019; Nisal et al., 2018). Üretim partileri arasında oluşabilecek farklılıklar, bu durumda olduğu gibi, doğal polimerlerin kullanımındaki en önemli sorunların başında gelmektedir; çünkü bireysel, dönemsel, iklimsel farklılıkların polimerin elde edildiği kaynağa göre farklı elde edilmiş partilerinde farklı fiziko-kimyasal özelliklere sahip olabilmesi mümkündür (Aznar-Cervantes et al., 2019; Boffito et al., 2018).

Bu sebeplerden dolayı bu çalışmada elektroğirme işleminde ipek LiBr çözücü sisteminden elde edilen ipek fibroinlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu ipek fibroinlerin belirlenen parametreler kullanılarak elektroğirilmesi sonucu elde edilen fiberlerin çapları 243 ($\pm 26,23$) nm olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu iskeleler hücre kültüründe kullanılmadan önce %70 etil alkol ile muamele edileceği için bu muamele sonrası fiber çapı da hesaplanmış ve 305,73 ($\pm 32,23$) nm olarak belirlenmiştir. Alkol uygulaması ve sonrasında yapılan yıkama işlemi sonucu gerçekleşen şişme sonucu fiber çapının arttığı düşünülmektedir. Literatürde etanol ile muamele edilen ipek fibroin iskelelerin yaklaşık %10 oranında şişmeye uğrayabileceği rapor edilmiştir (Siridamrong et al., 2019). Elektroğirilmiş ipek fibroin için literatürde 85 nm'den 500 nm'lere kadar pek çok farklı fiber çapı rapor edilmiştir (Catto et al., 2015; Yongzhong Wang et al., 2006; F. Zhang et al., 2011). Bu rapor edilen farklı çap büyüklükleri daha önce de bahsedildiği gibi doğal bir polimer olan ipek fibroin'in elde edilmesinde veya elektroğirme aşamasında kullanılan yöntem ve parametre değişikliklerinden kaynaklandığı söylenebilir.

Eğrilen bu rastgele fiber yapılı doku iskelelerine kuru olarak mekanik analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucu başlangıç elastik modülü, gerilim/gerinim eğrisinin lineer kısmının eğiminden yazılım kullanılarak 61.30 MPa olarak hesaplanmıştır. En yüksek çekme mukavemeti ise gene gerilim/gerinim eğrisinin ulaştığı en yüksek stres değeri üzerinden 1.934 MPa olarak belirlenmiştir. % uzama ise maksimum gerinim değeri olan %10,24 olarak belirlenmiştir. **Bu çalışmada elde edilen değerler literatürdeki diğer elektroğirilmiş ipek fibroin ile yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir.** İpek fibroin ile yapılan bir çalışmada elastik modülü 51.8 MPa, en yüksek çekme mukavemeti 1.4 MPa ve % uzama değeri %4,4 olarak rapor edilmiştir (Millán-Rivero et al., 2019). Bir başka

elektroğirime tekniği ile ipek fibroinden oluşturulmuş iskelenin en yüksek çekme mukavemeti 3 MPa ve % uzama değeri ise %12 olarak rapor edilmiştir (J. Zhou et al., 2009).

Literatürde rapor edilmiş farklı hayvan türlerine ait doğal özofagus dokularına ait mekanik test sonuçları mevcuttur. Örnek olarak, domuz özofagus dokusu ile yapılan bir çalışmada elastik modül 0,621 MPa, en yüksek çekme mukavemeti 0,28 MPa ve % uzama değeri ise %95 olarak rapor edilmiştir (Luc et al., 2018). Gene domuz özofagusu ile yapılan bir başka çalışma da ise elastik modülü 16.1 MPa, en yüksek çekme mukavemeti 2.9 MPa ve % uzama değeri ise %25 olarak rapor edilmiştir (Schleifenbaum et al., 2016). Domuz özofagusu içeren bir diğer çalışma ise elastik modülü 0,47 MPa olarak rapor etmiştir (Arakelian et al., 2019). Sıçan özofagusu içeren bir çalışma ise en yüksek çekme mukavemetini 2 MPa olarak rapor etmiştir. Literatürdeki domuz ve sıçan nativ özofagus dokusunun mekanik özelliklerine bakıldığında bizim elde ettiğimiz tavşan nativ özofagus dokusunun mekanik özellikleriyle benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bu sonuçlara göre elektroğirme yöntemi ile elde edilmiş alkol ile muamele edilmemiş ipek fibroin doku iskelesinin elastik modülünün nativ tavşan özofagusu dokusundan yaklaşık 20 kat daha yüksek olduğu, en yüksek çekme mukavemetinin yaklaşık 3,3 kat daha yüksek fakat % uzama değerinin ise yaklaşık 7 kat daha düşük olduğu görülmüştür. Fakat, % uzama değerinin ve diğer mekanik özelliklerin ipek fibroin doku iskelesi üzerinde düz kas hücrelerinin kültürasyonu sonrasında iskele üzerinde yoğunluğu artacak ekstrasellüler matrikslerden dolayı artması beklenmektedir (Abousleiman et al., 2009; Hadidi & Athanasiou, 2013). Fakat, üzerine hücre ekilmiş ve ıslak durumunda bulunan iskelelere yapılan mekanik analiz sonucu grafikte oluşan iki farklı eğimden dolayı 9.883 ve 5 MPa olarak iki farklı elastik modül hesaplanmıştır (Şekil 47). En yüksek çekme mukavemeti ise 2.265 MPa olarak % uzama ise %20,45 olarak hesaplanmıştır. Fakat, üzerine hücre ekilmiş doku iskeleleri %70 etanol ile muamele edildiklerinden dolayı mekanik test sırasında nem kaybı yaşamıştır. Bu nem kaybı gerilim/gerinim grafiğinin beklenenden farklı çıkmasına sebep olmuştur. Alkol ile muamele edilen fiber fibroinin yapısında bulunan α -heliks ve düzensiz sarmal yapıları β -plaka yapılarına dönüşür (Chelazzi et al., 2020). Bu dönüşüm ipek fibroin yapısındaki kristaliniteyi artırır; bunun sonucunda da ipek fibroin suda çözünmeyen ve daha dayanıklı bir

forma bürünür. Fakat, bu durum ipek fibroini sürekli nemli tutma gereksinimi de yanında getirir. Mekanik test, sıvı içinde gerçekleştirilemediği için analiz sırasında iskele nem kaybetmiş, nem kaybettikçe de büzüşmeye başlamıştır. Bu büzüşme cihazın uyguladığı kuvvete karşı bir kuvvet uyguladığından gerilim/gerinim grafiğinde iki farklı lineer kısmın ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu sebeple alkol ile muamele edilmiş ipek fibroin iskelelerin mekanik analiz sonuçları literatür ile karşılaştırılmamıştır.

Bu tez çalışmasının bir diğer amacı olan yönlenmiş fiber yapılı doku iskelelerini elde etmek için ise uygulaması hem ucuz hem de ekstra bir deney düzeneği gerektirmeyen paralel plaka eğirme yöntemi kullanılmıştır. Bu teknikte iki iletken plaka arasındaki yalıtkan boşluk elektrik alanı manipüle eder. Bu manipülasyon sonucu fiberler iki iletken plaka arasında gidip gelerek toplanır. Yüksek yönlenme dereceleri elde edilebilse de bu tekniği kullanarak kalın iskeleler üretmek oldukça zordur. Bu probleme, iki paralel plaka üzerinde zaman geçtikçe biriken polimerlerde yüklerin birikmesi ve bu yüklerin fiberlerin yönlenmesini sağlayan elektrik alanın bozulmasına sebep olduğu düşünülmektedir (Katta et al., 2004; Yuan et al., 2017). Rastgele fiber yapılı yüzey için optimize edilen parametreler kullanılıp sadece birbirine paralel iki toplayıcı arası farklı mesafeler denenmiştir. Plakalar arası boşluk 1,5 cm olduğunda da 2 cm olduğunda da kontrol grubu olarak kullanılan rastgele fiber yapılı yüzeye göre anlamlı derece yönlenme gözlemlenmiştir. Yönlenme analizi, Image J yazılımı içinde çalışan ve OrientationJ adı verilen ve literatürde pek çok çalışmada kullanılmış bir fotoğraf işleme eklentisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Clemons et al., 2018; Ding et al., 2017; Sampath et al., 2015; Sharabi et al., 2015). Yönlenme oranları bu yazılımdan elde edilen % coherency olarak rapor edilmiştir. Yazılım kısaca, fotoğraftaki fiber yapılarına ait her piksel 2x2'lik pozitif bir matrikse çevirip farklı interpolasyon ve türev tekniklerini kullanarak x ve y düzlemleri için matematiksel hesaplamalar yapmaktadır. Bu hesaplamalar sonucu her bir pikselin dominant yönü hesaplanarak 1 ile 0 arasında % coherency değerine dönüştürülür. Bu değer 1'e ne kadar yakınsa yapının o kadar anizotropik olduğunu gösterirken değer 0'a yaklaşması yapının tamamen rastgele izotropik olduğunu belirtir (Zajaczkowska, 2015). **Bu tez çalışmasında iki plaka arası boşluğun 1,5 cm olduğu durumdaki % coherency değeri 69, 2 cm olduğu durumda ise 71 olarak hesaplanmış ve başarıyla**

yönlendirilmiş fiber yapıları yüzeyler elde edilmiştir. Plakalar arası boşluk arttıkça yönlendirilen fiber uzunluğunun arttığı ve % coherency değerinin anlamlı olarak değişmediğinin gözlemlenmesine rağmen fiber yoğunluğunun ve kalınlığının değişmediği hatta azaldığı görülmüştür. Ayrıca, 2 cm boşluk bırakılan iskeleler paralel toplayıcılardan sökülmesinde fiber yoğunluğunun az olması dolayısıyla yırtılma, kıvrılma ve katlanma gibi problemler yaşanmıştır. Bu sebeple yönlendirilmiş yüzey üretilirken bahsedilen bu problemlerin yaşanmadığı, plakalar arası boşluğun 1,5 cm olduğu parametre kullanılmaya karar verilmiştir.

Bu çalışmada fiberleri yönlendirilmek için kullanılan bir diğer yöntem olan döner tambur ile yapılan eğirme sonucunda ise 27 % coherency değerine sahip fiberler elde edilebilmiştir. Her ne kadar bu teknik ile üretilen iskeleler rastgele yapıları fiber yüzeyden anlamlı olarak daha yüksek bir yönlendirme oranına sahip olsa da, paralel plaka yöntemi ile üretilen yüzeye göre anlamlı biçimde daha düşük bir yönlendirme oranına sahip olduğu görülmüştür. Bunun ana sebebinin, döner tambur sisteminin dönme hızının kontrol edilememesi olduğu düşünülmektedir. Döner tambur sistemlerinde yönlendirme Taylor konisinden çıkan polimer jetinin hızının tamburun yüzey hızı ile eşleşmesi sonucu oluşur. Bu eşleşme döner tamburun, tambura çarpan polimerleri mekanik olarak kendi etrafına sarması sonucu bir yönlendirilmeye sebep olur (Nitti et al., 2018; Yuan et al., 2017). Bu doğrultuda düşük orandaki yönlendirilmenin, bu çalışmada kullanılan tamburun dönme hızının Taylor konisinden çıkan jeti yakalayıp tambur etrafına sarmasına yetmediği düşünülmektedir.

5.3 Hücre kültürü çalışmaları

Doku iskelesi olarak kullanılacak yüzeylere doğal olarak hücreler tutunabilmeli ve iskeleyi kaplayabilmelidir. Bu çalışmada da düz kas hücrelerinin ipek fibroin iskeleler üzerindeki morfolojileri ışık mikroskobu ve SEM analiziyle incelenmiştir. **Bulgular kısmındaki Tablo 15 ve şekil 46'da görülebileceği gibi düz kas hücrelerinin ipek fibroin iskelelere tutunabildiği ve iskele yüzeyini kaplayabildiği kanıtlanmıştır.**

İskelelere ekilen bu hücrelerin tamamının iskeleye tutunma sürelerinin yaklaşık 4 saat sürdüğü belirlenmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunması, hücre membranında bulunan integrinler ile yüzeydeki proteinler arasında oluşan bağlantılar sonucu ortaya çıkan fokal adhezyon kompleksleri sonucu gerçekleşir. İpek fibroin iskelelere farklı hücre tipleri için farklı tutunma süreleri belirtilse de rapor edilen pek çok süre 2 ile 7 saat arasındadır (Courtenay et al., 2018; Mandal & Kundu, 2009; Varkey et al., 2015). Bu rapor edilen süre farkları kullanılan yöntemin hassasiyetine göre değişmektedir. Bu çalışmada kullanılan yöntemde iskele üzerindeki tutunmamış hücrelerin bulunduğu hücre süspansiyonundan örnek alınıp tripan mavisi ile hemasitometrede sayım yapılmıştır. Fakat, tripan mavisi ile yapılan testlerde hücre sayımı hemasitometre kullanılarak yapıldığı için yaklaşık %10 oranında sayım hataları yapılabildiği belirlenmiştir. Bu sayım hataları, hücrelerin zayıf dağılımına, hücre kaldırılması sırasında hücre kaybına, hücrelerin yanlış seyreltilmesine, hemasitometre bölmesinin yanlış doldurulmasına veya bölmede hava kabarcıklarının bulunmasına bağlı olabilmektedir (Aslantürk, 2018). Buna rağmen kullanılan bu teknik hücrelerin büyük çoğunluğunun iskele yüzeyine yaklaşık olarak hangi zaman aralığında tutunduğunun belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bu bilginin edinilmesi iskele üzerine hücre ekilmesi aşamasında gereksiz hücre kayıplarının önüne geçilebilmesi için gereklidir. Bunun dışında hücrelerin iskele üzerindeki büyüme kinetikleri belirlemek de hücreler üzerinde analiz yapılabilecek zaman aralıklarının belirlenmesi için gerekli bilgileri sağlar. Bu çalışmada düz kas hücreleri büyüme kinetikleri bakımından ipek iskele üzerinde aynı plastik kültür kabında davrandıkları gibi davranmış olup kültürün 9 ile 13. gününe kadar üremelerini arttırmış ve 15. günden sonra ölmeye başlamışlardır. Bu sebeple kullanılan düz kas hücrelerinin bu çalışmada kültürde tutulacağı maksimum süre 15 gün olarak belirlenmiştir.

Hücrelerin, rastgele ve yönlendirilmiş fiber yapıları yüzeylerdeki 15 günlük canlılık durumlarının takibi Live&Dead boyaması ile gerçekleştirilmiştir. Her iki yüzeyde de 15. güne kadar ciddi bir hücre ölümü gözlemlenmemiştir. Kullanılan Live&Dead boyama tekniğinde membran bütünlüğü bozulmuş hücreler, kit içinde bulunan Ethidium homodimer III bileşimini çekirdek içine alır. Bu bileşik de çekirdekte bulunan DNA ile etkileşime girerek çok kuvvetli kırmızı ışımaya yarar. Fakat, ipek fibroin'in kendi otofloresans özelliğinden dolayı ölü hücreleri belirten

kırmızı ışığa ile benzer bir ışığa yayar. Literatürde bulunan bazı çalışmalarda ipek fibroin iskelelerin bu otofloresans özellikleri rapor edilmiştir (Amirikia et al., 2017; Yongzhong Wang et al., 2006). Ayrıca, üretilen iskelelerden ışığın sınırlı miktarda geçebilmesi standart ışık mikroskopları ile çekilen fotoğrafların netliklerini sınırlamaktadır. Bu sebepten dolayı, membran bütünlüğü bozuk hücrelerin durumunu ipek fibroin iskelelerde takip etmek pek mümkün olmamıştır. Fakat, Tablo 13'deki 15. gün resimlerine bakıldığında membran bütünlüğü bozulmamış canlı hücrelerin yaydığı yeşil ışığa rahatlıkla gözlenebilmektedir. Ayrıca, yönlendirilmiş iskelenin birbirine paralel fiberleri arasından ışığın daha rahat geçebilmesi sonucu bu yüzeylerde kültürü yapılmış hücrelerden daha net görüntüler elde edilebilmiştir. **Bu fotoğraflara göre düz kas hücreleri hem rastgele hem de yönlendirilmiş fiber yapıları iskelelerde kültürü 15 gün boyunca başarıyla yapılabilmektedir.**

Üretilen yüzeylere ISO 10993-5'e göre literatürdeki diğer çalışmaların da uyguladığı MTT ile indirekt sitotoksikite testi de gerçekleştirilmiştir (W. Liu et al., 2016). MTT test sisteminde hücre aktivitesi ve absorbans arasında doğrusal bir ilişki olduğundan, hücrelerin büyüme veya ölüm hızı kantitatif ve daha hassas bir şekilde ölçülebildiği için bu test yönteminin ISO 10993 serisi gibi uluslararası standartlar tarafından kullanılması önerilmiştir (Caldas et al., 2019). MTT kısaca, canlı hücrelerin mitokondrisinde metabolik işlemler sonucu parçalanmasıyla ortaya çıkan mor renkli formazan kristallerinin kimyasal çözücüler yardımıyla çözülmesi ve spektrofotometreler yardımıyla çözünen kristallere ait absorbans değerlerinin belirlenmesi prensibine dayanır. İndirekt sitotoksikite testinin seçilmesinin amacı ise iskeleden ortama yayılabilecek maddelerin toksik etkisinin incelenebilmesidir. Doku iskelesi olarak kullanılacak malzemelerin üstündeki hücrelerin canlılığını düşürmediği gibi *in vivo* ortamda da etrafına toksik bir etki yaymaması beklenmektedir. Ayrıca, zaten bu iskeleler üzerinde 15 günlük kültür yapıp live and dead analiz yöntemi ile hücrelerin canlılığı kontrol edildiği için ekstra bir direkt sitotoksikite testi yapılmasına gerek duyulmamıştır.

Bu çalışmada yapılan indirekt teste göre 24 saat süreyle içinde ipek fibroin iskele bırakılan ortam ile 24 saat boyunca inkübe edilen kas hücrelerinin canlılık oranları normal ortam ile inkübe edilen hücrelerin canlılık oranına göre ufak bir

düşüş görülmüştür. Fakat, ISO 10993-5'e göre bir malzemenin toksik sayılabilmesi için canlılığın %70'in altına inmesi gerektiği belirtilmektedir. **Bu sebepten dolayı üretilen ipek fibroin iskelelerin uygulanan indirekt yöntemine göre toksik olmadığına karar verilmiştir.** Literatürde, ipek fibroin'in farklı formlarının farklı hücreler üzerinde kontrole göre canlılığı değiştirmedeği, arttırdığı veya azalttığı ile ilgili karışık sonuçlar rapor edilmiştir (Carrasco-Torres et al., 2019; Chae et al., 2014; W. Liu et al., 2016; Mohammadzadehmoghadam & Dong, 2019). Bu farklılıkların, doğal bir polimer olan ipek fibroin'in elde edilmesinde ve işlenmesinde kullanılmış olabilecek yöntem değişikliklerinden kaynaklanabileceği farklı kaynaklarda da bahsedilmektedir (Chae et al., 2014).

Üretilen yüzeyler üzerinde statik kültürü yapılan düz kas hücrelerinin kontraktıl özellikleri α -SMA belirteci ile yapılan IF boyamalar ile incelenmiştir. α -SMA, düz kas hücrelerindeki kontraktıl özellik ile ilişkilendirilen özel bir proteindir. Düz kas hücrelerinde kontraktıl fenotip ve proliferativ fenotip denen iki farklı fenotip olduğu rapor edilmiştir (Shinohara et al., 2012). Proliferativ fenotipteki hücreler yapılarında daha az miktarda miyofibril içerdikleri için kontraktıl özellikleri daha zayıftır. Buna karşın bu fenotipteki hücreler, daha yüksek bölünme, göç etme ve daha çok ECM üretme ve daha yüksek miktarda sitoplazmaya sahip özelliğine sahiptir. Bu yüzden bu fenotipteki hücreler yüzeylere tutunduğu zaman daha yaygın bir görüntü verirler. Kontraktıl fenotipteki hücreler ise genelde daha az miktarda sitoplazma içerir yüzeye tutunduğu zaman daha ince ve uzun bir görüntü verir. Bu fenotip farkı plastik kültür kabında ve yönlendirilmiş yüzeyde kültürü yapılan düz kas hücrelerinde görülebilir. Kültür kabında kültürü gerçekleştirilmiş ve anti- α -SMA ile boyanmış hücrelerde de bu proteinin ifade edildiği, fakat hücre morfolojisinin daha yaygın olduğu ve hücrelerin daha çok miktarda sitoplazmaya sahip olduğu görülebilmektedir. Diğer taraftan yönlendirilmiş yüzeydeki hücrelerin daha ince uzun ve az sitoplazma miktarına sahip olduğu görülebilmektedir. **Bu sunulan fotoğraflara göre düz kas hücreleri yönlendirilmiş fiberlere paralel doğrultuda yönlendirilmişlerdir. Genelde hücre yönlendirilmesi sonucu hücre uzaması ve gerilmesi gerçekleşir. Hücre morfolojisindeki bu değişimin hücre çekirdeğinin de uzamasını sağladığı ve bunun sonucunda da çeşitli proteinlerin ifade seviyelerinin değiştiği bilgisi literatürde mevcuttur (Nivison-Smith & Weiss, 2012). Buna göre hücrelere,**

kendi doğal ECM'lerine benzer bir ortamı sağlayacak doku iskelesi başarıyla üretilmiştir ve hücrelerin kendi doğal ortamındaki ECM'den aldığı fiziksel sinyalleri bu üretilen iskelelerden alabileceği sonucuna varılmıştır. Hücrelerin üzerinde buldukları anizotropik topografik özelliklere tepki vermesine hücrelerel kontak rehberliği adı verilir (Buskermolen et al., 2020). Hücrelerin neden anizotropik bir yüzeye tepki verdikleri tam olarak çözülememiş olsa da bu konuda kabul gören iki önemli hipotez bulunmaktadır. Bu çalışmada da olduğu gibi hücrelerin tutunabileceği substrat yüzeyleri arasında bulunan fiziksel boşluklar fokal adhezyon bölgelerinin yüzey ile temas alanını arttırmak isteyen hücreler için gibbs serbest enerjisi bakımından en kolay yolunun fiber doğrultusunda uzanmak olduğu bu hipotezlerden birisidir (Buskermolen et al., 2020; Kubow et al., 2017). Aynı zamanda, yönlendirilmiş fiberlerde de olduğu gibi iki fiber arasında oluşan devamsızlığı hücrelerin hissedebildiği düşünülmüştür. Hücrelerin bu devamsızlık noktalarında aktin yoğunlaşmasının ve bunun devamında da aynı bölgede fokal adhezyon moleküllerinin oluşabileceği rapor edilmiştir. Fakat hücrelerin bu devamsızlıkları hangi mekanizma ile hissettikleri hala araştırılan bir konudur (Netti et al., n.d.; Tamiello et al., 2016). Bu çalışmada yönlendirilmiş fiber yüzeylerde fiber doğrultusunda yönlendirmelerinin de literatürde bulunan bu iki hipotez doğrultusunda gerçekleştiği düşünülmektedir.

Farklı germe miktarları uygulanarak gerçekleştirilmiş dinamik kültür sonucunda ise silindik iskele üzerinde bulunan hücrelerde α -SMA ifadesini gösteren hücre popülasyonları arasında farklılıklar belirlenmiştir. Yapılan akış sitometrisi analizi sonucunda %2 germe uygulanan grupta α -SMA ifadesini gösteren hücre popülasyonu %0 ve %10 germe uygulanan gruplara göre anlamlı biçimde daha yüksektir. Uygulanan %2 germe miktarının düz kas hücrelerinin proliferatif fenotipten kontraktıl fenotipe geçmesine ve kontraktıl özellik ile ilişkilendirilen α -SMA belirtecini ifade etmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir. Literatürde farklı mekanik uyarıların düz kas hücreleri üzerinde çeşitli etkileri olduğu rapor edilmiştir. Bu etkilerin sebepleri tam olarak belirlenemese de Rho ailesinden bir GTPaz protein olan RhoA'nın mekanik uyarıları biyokimyasal yanıtlara çevirmede önemli role sahip olduğu düşünülmektedir. RhoA'nın en önemli görevi aktin stres fiberlerinin regülasyonunu sağlamaktır (Kushida et al., 2016). Fakat, hücre proliferasyonu, hareketi, polarizasyonu ve farklılaşması gibi

durumlar da aktin stres fiberlerini manipüle ederek değiştirir. Aktin stres fiberlerinin dağılım, dizilim ve yönlenmelerinin ROCK yolağı tarafından gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. ROCK, rho ile ilişkili sarmal bobin oluşturan protein kinaz olarak tanımlanan bir RhoA molekülüdür ve çeşitli substratların fosforolize edilmesini sağlar (Fukata et al., 2001). Buna göre de hücrelerin fiziksel deformasyonu ve davranışlarının, ECM'ye uygulanan dış sinyallere karşı uyum sağlayabilmesi için aktin stres fiberlerinin yeniden düzenlenmesinden dolayı olduğu sonucuna varılabilir. Hücrenin aktin stres fiberlerindeki bu değişim, bu proteinlerin bir kısmının hücre çekirdeğine doğrudan bağlı olmasından dolayı çekirdekte de değişimlere sebep olur (Burrige & Guilluy, 2016). Bu durumun sonucunda da çeşitli genlerin ifadesinde artışlar ve düşüşler görülebilir (Haase et al., 2016). **Buna göre hücrelere uygulanan %2 germe miktarının hücrelerin aktin stres fiberlerinde değişikliğe sebep olduğu, bunun da hücrenin çekirdeğinin şeklinde ve fonksiyonunda değişikliğe yol açtığını ve bu değişikliğin de bu gruptaki hücrelerin %0 ve %10 germe uygulanan hücrelere göre daha fazla α -SMA ifadesi göstermelerine sebep olduğu düşünülmektedir.**

Diğer taraftan %10 germe miktarının ise hücrelere apoptotik bir etki oluşturduğu düşünülmektedir. Düz kas hücreleri, kontraktıl ve proliferativ fenotipleri arasında devamlı bir değişim döngüsü içerisindedirler. Herhangi bir hasar veya patolojik durumda bu hücreler kendilerini proliferativ fenotipe farklılaştırırlar. Bunun sebebi düz kas hücrelerinin proliferativ fenotipte daha yüksek miktar ECM üretebilmeleri ve daha yüksek proliferativ özelliğe sahip olmaları sebebiyle bölgede oluşan hasarı iyileştirebilmeleridir (Beamish et al., 2010). Bu sebeple %10 germe uygulanan deney grubunda söz konusu hücrelerin fiziksel olarak travmaya uğradığı ve oluşan hasarın tamiri için kendilerini proliferativ fenotipe farklılaştırdıkları düşünülmektedir. Bu bilgilerin ışığında da belirli bir miktar germe uygulamasının düz kas hücrelerinin kontraktıl özellikleri göstermelerine ve koruyabilmelerine yardımcı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çeşitli özofagus hastalıklarına yönelik bir doku mühendisliği yaklaşımı geliştirilebilmesi için doğal özofagus yapısında bulunan hücre türlerinin *in vitro* ortamda, kendi doğal *in vivo* ortamlarındakine benzer davranışlar sergilemesi gerekmektedir. Bunun da ilk adımı hücrelerin kültürünün üzerinde gerçekleştirilebileceği yüzeylerin üretilmesidir. Bu yüksek lisans çalışmasında doğal bir polimer olan ipek fibroin, *Bombyx mori* kozasından başarıyla izole edilmiş ve elektroçirme yöntemi ile hem rastgele yapılı hem de yönlendirilmiş yapılı nano fiberlerden oluşmuş doku iskeleleri elde edilmiştir. Elde edilen bu iskeleler üzerinde hücreler başarı ile 15 gün kültüre edilebilmiştir. Ayrıca, hücrelerin yönlendirilmiş yapılı fiber yüzeylerde fiberler doğrultusunda yönlendiği gösterilmiştir. Bu hücrelerin yönlendirilebilmesi, bu hücrelerin doğal özofagus dokusundaki görevlerini yerine getirebilmeleri için çok önemlidir. Bu sebeple bu çalışmanın, doğal dokunun geometrisine ve mekanik özelliklerine sahip, hücrelerin üzerinde canlı kalabileceği ve kontraktil fenotiple ilişkili proteinleri ifade edebileceği doku iskelelerinin üretilmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca, yapılan dinamik kültür çalışmaları sonucunda da düz kas hücrelerinin kontraktil özelliklerinin dışarıdan uygulanacak mekanik germe ile değiştirilebileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada %2 germe miktarının kontraktil özelliğe olumlu bir etkisi olduğu görülürken %10 germe miktarının olumsuz bir etki gösterdiği görülmüştür. Bu etkinin daha detaylı araştırılabilmesi için daha farklı germe miktarlarının farklı frekans ve döngülerde de gerçekleştirilmesi önerilmektedir. Aynı şekilde, yüksek germe miktarlarının hücrelerde oluşturduğu muhtemel olan apoptotik etkilerin de moleküler biyoloji teknikleri ile araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abousleiman, R. I., Reyes, Y., McFetridge, P., & Sikavitsas, V.**, 2009, Tendon tissue engineering using cell-seeded umbilical veins cultured in a mechanical stimulator, *Tissue Engineering - Part A*, 15(4): 787–795 pp.
- Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., & Kaplan, D. L.**, 2003, Silk-based biomaterials, *Biomaterials*, 24(3): 401–416 pp.
- Amiraliyan, N., Nouri, M., & Kish, M. H.**, 2010, Structural characterization and mechanical properties of electrospun silk fibroin nanofiber mats, *Polymer Science - Series A*, 52(4): 407–412 pp.
- Amirikia, M., Shariatzadeh, S. M. A., Jorsaraei, S. G. A., & Soleimani Mehranjani, M.**, 2017, Impact of pre-incubation time of silk fibroin scaffolds in culture medium on cell proliferation and attachment, *Tissue and Cell*, 49(6): 657–663 pp.
- Arakelian, L., Caille, C., Faivre, L., Corté, L., Bruneval, P., Shamdani, S., Flageollet, C., Albanese, P., Domet, T., Jarraya, M., Setterblad, N., Kellouche, S., Larghero, J., Cattan, P., & Vanneaux, V.**, 2019, A clinical-grade acellular matrix for esophageal replacement, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(12): 2191–2203 pp.
- Arakelian, L., Kanai, N., Dua, K., Durand, M., Cattan, P., & Ohki, T.**, 2018, Esophageal tissue engineering: from bench to bedside, *Annals of the New York Academy of Sciences*,.
- Armstrong, J. P. K., & Stevens, M. M.**, 2020, Using Remote Fields for Complex Tissue Engineering, In *Trends in Biotechnology* (Vol. 38, Issue 3, pp. 254–263), Elsevier Ltd.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Aslantürk, Ö. S.**, 2018, In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, In *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, InTech.
- Atala, A., Bauer, S. B., Soker, S., Yoo, J. J., & Retik, A. B.**, 2006, Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty, *Lancet*, 367(9518): 1241–1246 pp.
- Aubin, H., Nichol, J. W., Hutson, C. B., Bae, H., Sieminski, A. L., Cropek, D. M., Akhyari, P., & Khademhosseini, A.**, 2010, Directed 3D cell alignment and elongation in microengineered hydrogels, *Biomaterials*, 31(27): 6941–6951 pp.
- Aznar-Cervantes, S. D., Pagan, A., Monteagudo Santesteban, B., & Cenis, J. L.**, 2019, Effect of different cocoon stifling methods on the properties of silk fibroin biomaterials, *Scientific Reports*, 9(1):.
- Bayir, E., Sahinler, M., Celtikoglu, M. M., & Sendemir, A.**, 2020, Bioreactors in tissue engineering: mimicking the microenvironment, In *Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration* (pp. 709–752), Elsevier.
- Beamish, J. A., He, P., Kottke-Marchant, K., & Marchant, R. E.**, 2010, Molecular Regulation of Contractile Smooth Muscle Cell Phenotype: Implications for Vascular Tissue Engineering, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 16(5): 467–491 pp.
- Boffito, M., Tonda-Turo, C., & Ciardelli, G.**, 2018, Design of electrospun fibrous patches for myocardium regeneration, In *Electrofluidodynamic Technologies (EFDTs) for Biomaterials and Medical Devices: Principles and Advances* (pp. 221–250), Elsevier Inc.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Burridge, K., & Guilluy, C.**, 2016, Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension, In *Experimental Cell Research* (Vol. 343, Issue 1, pp. 14–20), Academic Press Inc.
- Buskermolen, A. B., Ristori, T., Mostert, D., van Turnhout, M. C., Shishvan, S. S., Loerakker, S., Kurniawan, N. A., Deshpande, V. S., & Bouten, C. V.**, 2020, Cellular Contact Guidance Emerges from Gap Avoidance, *Cell Reports Physical Science*, 1 100055 pp.
- Caldas, I. P., Alves, G. G., Barbosa, I. B., Scelza, P., de Noronha, F., & Scelza, M. Z.**, 2019, In vitro cytotoxicity of dental adhesives: A systematic review, In *Dental Materials* (Vol. 35, Issue 2, pp. 195–205), Elsevier Inc.
- Camarero-Espinosa, S., Calore, A., Wilbers, A., Harings, J., & Moroni, L.**, 2020, Additive manufacturing of an elastic poly(ester)urethane for cartilage tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 102 192–204 pp.
- Carrasco-Torres, G., Valdés-Madrigal, M. A., Vásquez-Garzón, V. R., Baltiérrez-Hoyos, R., De la Cruz-Burelo, E. D., Román-Doval, R., & Valencia-Lazcano, A. A.**, 2019, Effect of Silk Fibroin on cell viability in electrospun scaffolds of polyethylene oxide, *Polymers*, 11(3):.
- Castro, N., Fernandes, M. M., Ribeiro, C., Correia, V., Minguez, R., & Lanceros-Méndez, S.**, 2020, Magnetic Bioreactor for Magneto-, Mechano- and Electroactive Tissue Engineering Strategies, *Sensors*, 20(12): 3340 pp.
- Catto, V., Farè, S., Cattaneo, I., Figliuzzi, M., Alessandrino, A., Freddi, G., Remuzzi, A., & Tanzi, M. C.**, 2015, Small diameter electrospun silk fibroin vascular grafts: Mechanical properties, in vitro biodegradability, and in vivo biocompatibility, *Materials Science and Engineering C*, 54 101–111 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Cebotari, S., Lichtenberg, A., Tudorache, I., Hilfiker, A., Mertsching, H., Leyh, R., Breymann, T., Kallenbach, K., Maniuc, L., Batrinac, A., Repin, O., Maliga, O., Ciubotaru, A., & Haverich, A., 2006,** Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells, *Circulation*, 114(SUPPL. 1):
- Cengiz, I. F., Pereira, H., Espregueira-Mendes, J., Kwon, I. K., Reis, R. L., & Oliveira, J. M., 2019,** Suturable regenerated silk fibroin scaffold reinforced with 3D-printed polycaprolactone mesh: biomechanical performance and subcutaneous implantation, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(6): 63 pp.
- Chae, M. J., Kim, D. W., Kim, Y. J., Kweon, H. Y., Cho, Y. J., Choi, S. Y., & Lee, H. R., 2014,** Toxicity assessment of a novel silk fibroin and poly-methyl-methacrylate composite material, *Molecular and Cellular Toxicology*, 10(3): 277–283 pp.
- Chelazzi, D., Badillo-Sanchez, D., Giorgi, R., Cincinelli, A., & Baglioni, P., 2020,** Self-regenerated silk fibroin with controlled crystallinity for the reinforcement of silk, *Journal of Colloid and Interface Science*, 576 230–240 pp.
- Chen, X., Knight, D. P., Shao, Z., & Vollrath, F., 2001,** Regenerated Bombyx silk solutions studied with rheometry and FTIR, *Polymer*, 42(25): 09969–09974 pp.
- Cheng, W.-P., Wang, B.-W., Chen, S.-C., Chang, H., & Shyu, K.-G., 2012,** Mechanical stretch induces the apoptosis regulator PUMA in vascular smooth muscle cells, *Cardiovascular Research*, 93(1): 181–189 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Clemons, T. D., Bradshaw, M., Toshniwal, P., Chaudhari, N., Stevenson, A. W., Lynch, J., Fear, M. W., Wood, F. M., & Iyer, K. S., 2018, Coherency image analysis to quantify collagen architecture: Implications in scar assessment, *RSC Advances*, 8(18): 9661–9669 pp.

Correa, E. E., Lopera, D. O. G., Restrepo, S. G., & Ossa-Orozco, C. P., 2020, Effective sericin-fibroin separation from *Bombyx mori* silkworms fibers and low-cost salt removal from fibroin solution, *Revista Facultad de Ingenieria*, 94 97–101 pp.

Courtenay, J. C., Deneke, C., Lanzoni, E. M., Costa, C. A., Bae, Y., Scott, J. L., & Sharma, R. I., 2018, Modulating cell response on cellulose surfaces; tunable attachment and scaffold mechanics, *Cellulose*, 25(2): 925–940 pp.

Dang, M., Saunders, L., Niu, X., Fan, Y., & Ma, P. X., 2018, Biomimetic delivery of signals for bone tissue engineering, *Bone Research*, 6(1):

Declercq, H. A., Desmet, T., Dubruel, P., & Cornelissen, M. J., 2014, The role of scaffold architecture and composition on the bone formation by adipose-derived stem cells, *Tissue Engineering - Part A*, 20(1–2): 434–444 pp.

Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Kumar, D. S., 2011, Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review, In *International Journal of Polymer Science* (Vol. 2011), Hindawi Publishing Corporation.

Ding, C., Ulcickas, J. R. W., Deng, F., & Simpson, G. J., 2017, Second Harmonic Generation of Unpolarized Light, *Physical Review Letters*, 119(19): 193901 pp.

Dong, R., Ma, P. X., & Guo, B., 2020, Conductive biomaterials for muscle tissue engineering, In *Biomaterials* (Vol. 229, p. 119584), Elsevier Ltd.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Dyakonov, T., Yang, C. H., Bush, D., Gosangari, S., Majuru, S., & Fatmi, A.,** 2012, Design and Characterization of a Silk-Fibroin-Based Drug Delivery Platform Using Naproxen as a Model Drug, *Journal of Drug Delivery*, 2012 1–10 pp.
- Echave, M. C., Burgo, L. S., Pedraz, J. L., & Orive, G.,** 2017, Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering, *Current Pharmaceutical Design*, 23(24):.
- Eivazzadeh-Keihan, R., Chenab, K. K., Taheri-Ledari, R., Mosafer, J., Hashemi, S. M., Mokhtarzadeh, A., Maleki, A., & Hamblin, M. R.,** 2020, Recent advances in the application of mesoporous silica-based nanomaterials for bone tissue engineering, In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 107, p. 110267), Elsevier Ltd.
- Eltom, A., Zhong, G., & Muhammad, A.,** 2019, Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review, *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019.
- Ferraz, M. P.,** 2014, The role of dialysis and freezing on structural conformation, thermal properties and morphology of silk fibroin hydrogels, *Biomatter*, 4 e28536 pp.
- Fukata, Y., Kaibuchi, K., Amano, M., & Kaibuchi, K.,** 2001, Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells, In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 22, Issue 1, pp. 32–39), Trends Pharmacol Sci.
- Funakawa, K., Uto, H., Sasaki, F., Nasu, Y., Mawatari, S., Arima, S., Nakazawa, J., Taguchi, H., Hashimoto, S., Kanmura, S., Setoyama, H., Numata, M., Tsubouchi, H., & Ido, A.,** 2015, Effect of endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal neoplasms and risk factors for postoperative stricture, *Medicine (United States)*, 94(1): e373 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Grounds, M. D.**, 2018, Obstacles and challenges for tissue engineering and regenerative medicine: Australian nuances, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 45(4): 390–400 pp.
- Guha, S., Cullen, J. P., Morrow, D., Colombo, A., Lally, C., Walls, D., Redmond, E. M., & Cahill, P. A.**, 2011, Glycogen synthase kinase 3 beta positively regulates Notch signaling in vascular smooth muscle cells: Role in cell proliferation and survival, *Basic Research in Cardiology*, 106(5): 773–785 pp.
- Haase, K., MacAdangdang, J. K. L., Edrington, C. H., Cuerrier, C. M., Hadjiantoniou, S., Harden, J. L., Skerjanc, I. S., & Pelling, A. E.**, 2016, Extracellular Forces Cause the Nucleus to Deform in a Highly Controlled Anisotropic Manner, *Scientific Reports*, 6(1): 1–11 pp.
- Hadidi, P., & Athanasiou, K. A.**, 2013, Enhancing the mechanical properties of engineered tissue through matrix remodeling via the signaling phospholipid lysophosphatidic acid, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 433(1): 133–138 pp.
- Haider, A., Haider, S., & Kang, I. K.**, 2018, A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology, In *Arabian Journal of Chemistry* (Vol. 11, Issue 8, pp. 1165–1188), Elsevier B.V.
- Hauben, D. J., Baruchin, A., & Mahler, D.**, 1982, On the history of the free skin graft, *Annals of Plastic Surgery*, 9(3): 242–248 pp.
- Hou, L., Gong, C., & Zhu, Y.**, 2016, In vitro construction and in vivo regeneration of esophageal bilamellar muscle tissue, *Journal of Biomaterials Applications*, 30(9): 1373–1384 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Howlander, N.**, 2017, *Esophageal Cancer - Cancer Stat Facts*, SEER Cancer Statistics Review.
- Janoušková, O.**, 2018, Synthetic Polymer Scaffolds for Soft Tissue Engineering, *Physiol. Res*, 67 335–348 pp.
- Jha, B. S., Colello, R. J., Bowman, J. R., Sell, S. A., Lee, K. D., Bigbee, J. W., Bowlin, G. L., Chow, W. N., Mathern, B. E., & Simpson, D. G.**, 2011, Two pole air gap electrospinning: Fabrication of highly aligned, three-dimensional scaffolds for nerve reconstruction, *Acta Biomaterialia*, 7(1): 203–215 pp.
- Jia, L., Prabhakaran, M. P., Qin, X., & Ramakrishna, S.**, 2014, Guiding the orientation of smooth muscle cells on random and aligned polyurethane/collagen nanofibers, *Journal of Biomaterials Applications*, 29(3): 364–377 pp.
- Jones, E., Jensen, T., Sharma, I., Wanczyk, H., Mitchell, A., Foster, C., Sayej, W., & Finck, C.**, 2019, Scaffolds for esophageal tissue engineering, In *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume Two* (pp. 565–592), Elsevier.
- Jun, I., Han, H. S., Edwards, J. R., & Jeon, H.**, 2018, Electrospun fibrous scaffolds for tissue engineering: Viewpoints on architecture and fabrication, In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 3), MDPI AG.
- Kamalha, E., Zheng, Y., Zeng, Y., & Fredrick, M. N.**, 2013, FTIR and WAXD study of regenerated silk fibroin, *Advanced Materials Research*, 677 211–215 pp.
- Katta, P., Alessandro, M., Ramsier, R. D., & Chase, G. G.**, 2004, Continuous electrospinning of aligned polymer nanofibers onto a wire drum collector, *Nano Letters*, 4(11): 2215–2218 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kim, S. H., Nam, Y. S., Lee, T. S., & Park, W. H.**, 2003, Silk fibroin nanofiber. Electrospinning, properties, and structure, *Polymer Journal*, 35(2): 185–190 pp.
- Kishimoto, Y., Morikawa, H., Yamanaka, S., & Tamada, Y.**, 2017, Electrospinning of silk fibroin from all aqueous solution at low concentration, *Materials Science and Engineering C*, 73 498–506 pp.
- Kubow, K. E., Shuklis, V. D., Sales, D. J., & Horwitz, A. R.**, 2017, Contact guidance persists under myosin inhibition due to the local alignment of adhesions and individual protrusions, *Scientific Reports*, 7(1):.
- Kundu, B., Kurland, N. E., Yadavalli, V. K., & Kundu, S. C.**, 2014, Isolation and processing of silk proteins for biomedical applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 70 70–77 pp.
- Kundu, B., Rajkhowa, R., Kundu, S. C., & Wang, X.**, 2013, Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations, In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 65, Issue 4, pp. 457–470), Elsevier.
- Kushida, N., Yamaguchi, O., Kawashima, Y., Akaihata, H., Hata, J., Ishibashi, K., Aikawa, K., & Kojima, Y.**, 2016, Uni-axial stretch induces actin stress fiber reorganization and activates c-Jun NH2 terminal kinase via RhoA and Rho kinase in human bladder smooth muscle cells, *BMC Urology*, 16(1): 9 pp.
- Langer, R., & Vacanti, J. P.**, 1993, Tissue engineering, *Science*, 260(5110): 920–926 pp.
- Lee, E., Milan, A., Urbani, L., De Coppi, P., & Lowdell, M. W.**, 2017, Decellularized material as scaffolds for tissue engineering studies in long gap esophageal atresia, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(5): 573–584 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Lee, S. J., Choi, J. S., Park, K. S., Khang, G., Lee, Y. M., & Lee, H. B.,** 2004, Response of MG63 osteoblast-like cells onto polycarbonate membrane surfaces with different micropore sizes, *Biomaterials*, 25(19): 4699–4707 pp.
- Lei, T., Xu, Z., Cai, X., Xu, L., & Sun, D.,** 2018, New Insight into Gap Electrospinning: Toward Meter-long Aligned Nanofibers, *Langmuir*, 34 13788–13793 pp.
- Li, Yawen, & Bou-Akl, T.,** 2016, Electrospinning in Tissue Engineering, In *Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications*, InTech.
- Li, Yuhui, Huang, G., Zhang, X., Wang, L., Du, Y., Lu, T. J., & Xu, F.,** 2014, Engineering cell alignment in vitro, In *Biotechnology Advances* (Vol. 32, Issue 2, pp. 347–365), Elsevier Inc.
- Linder, H. R., Glass, A. A., Day, D. E., & Sell, S. A.,** 2020, Manipulating Air-Gap Electrospinning to Create Aligned Polymer Nanofiber-Wrapped Glass Microfibers for Cortical Bone Tissue Engineering, *Bioengineering*, 7(4): 165 pp.
- Liu, H., Ding, X., Zhou, G., Li, P., Wei, X., & Fan, Y.,** 2013, Electrospinning of nanofibers for tissue engineering applications, In *Journal of Nanomaterials* (Vol. 2013).
- Liu, W., Li, Z., Zheng, L., Zhang, X., Liu, P., Yang, T., & Han, B.,** 2016, Electrospun fibrous silk fibroin/poly(L-lactic acid) scaffold for cartilage tissue engineering, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(5): 516–526 pp.
- Liu, Z., Zhang, F., Ming, J., Bie, S., Li, J., & Zuo, B.,** 2015, Preparation of electrospun silk fibroin nanofibers from solutions containing native silk fibrils, *Journal of Applied Polymer Science*, 132(1):.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Long, Y. Z., Yu, M., Sun, B., Gu, C. Z., & Fan, Z.,** 2012, Recent advances in large-scale assembly of semiconducting inorganic nanowires and nanofibers for electronics, sensors and photovoltaics, *Chemical Society Reviews*, 41(12): 4560–4580 pp.
- Luc, G., Charles, G., Gronnier, C., Cabau, M., Kalisky, C., Meulle, M., Bareille, R., Roques, S., Couraud, L., Rannou, J., Bordenave, L., Collet, D., & Durand, M.,** 2018, Decellularized and matured esophageal scaffold for circumferential esophagus replacement: Proof of concept in a pig model, *Biomaterials*, 175 1–18 pp.
- Luo, K., Yang, Y., & Shao, Z.,** 2016, Physically Crosslinked Biocompatible Silk-Fibroin-Based Hydrogels with High Mechanical Performance, *Advanced Functional Materials*, 26(6): 872–880 pp.
- Madhusudanan, P., Raju, G., & Shankarappa, S.,** 2020, Hydrogel systems and their role in neural tissue engineering, In *Journal of the Royal Society Interface* (Vol. 17, Issue 162), Royal Society Publishing.
- Mandal, B. B., & Kundu, S. C.,** 2009, Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds, *Biomaterials*, 30(15): 2956–2965 pp.
- Martino, F., Perestrelo, A. R., Vinarský, V., Pagliari, S., & Forte, G.,** 2018, Cellular mechanotransduction: From tension to function, *Frontiers in Physiology*, 9(JUL):
- Matabola, K. P., & Moutloali, R. M.,** 2013, The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly(vinylidene fluoride) nanofibers- Effect of sodium chloride, *Journal of Materials Science*, 48(16): 5475–5482 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Menezes, M. de A., de Godoy dos Santos, G., & Herbella, F. A. M.,** 2020, Esophageal Anatomy, In *Thoracic Surgery* (pp. 171–179), Springer International Publishing.
- Millán-Rivero, J. E., Martínez, C. M., Romecín, P. A., Aznar-Cervantes, S. D., Carpes-Ruiz, M., Cenis, J. L., Moraleda, J. M., Atucha, N. M., & García-Bernal, D.,** 2019, Silk fibroin scaffolds seeded with Wharton's jelly mesenchymal stem cells enhance re-epithelialization and reduce formation of scar tissue after cutaneous wound healing, *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1): 126 pp.
- Min, B. M., Lee, G., Kim, S. H., Nam, Y. S., Lee, T. S., & Park, W. H.,** 2004, Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro, *Biomaterials*, 25(7–8): 1289–1297 pp.
- Mina, M.,** 2014, Growth Factors: Biochemical Signals for Tissue Engineering. Biochemical Signals for Tissue Engineering, In *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*, Elsevier Inc.
- Mohammadzadehmoghadam, S., & Dong, Y.,** 2019, Fabrication and Characterization of Electrospun Silk Fibroin/Gelatin Scaffolds Crosslinked With Glutaraldehyde Vapor, *Frontiers in Materials*, 6 91 pp.
- Nair, L. S., & Laurencin, C. T.,** 2007, Biodegradable polymers as biomaterials, In *Progress in Polymer Science (Oxford)* (Vol. 32, Issues 8–9, pp. 762–798), Pergamon.
- Nerem, R. M., & Schutte, S. C.,** 2013, The Challenge of Imitating Nature, In *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition* (pp. 9–24), Elsevier Inc.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Netti, P. A., Ventre, M., Natale, C. F., & Rianna, C., n.d., *Topographic cell instructive patterns to control cell adhesion, polarization and migration.*

Retrieved March 28, 2021, from

Nisal, A., Sayyad, R., Dhavale, P., Khude, B., Deshpande, R., Mapare, V., Shukla, S., & Venugopalan, P., 2018, Silk fibroin micro-particle scaffolds with superior compression modulus and slow bioresorption for effective bone regeneration, *Scientific Reports*, 8(1): 1–10 pp.

Nitti, P., Gallo, N., Natta, L., Scalera, F., Palazzo, B., Sannino, A., & Gervaso, F., 2018, Influence of nanofiber orientation on morphological and mechanical properties of electrospun chitosan mats, *Journal of Healthcare Engineering*, 2018.

Nivison-Smith, L., & Weiss, A. S., 2012, Alignment of human vascular smooth muscle cells on parallel electrospun synthetic elastin fibers, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 100 A(1): 155–161 pp.

O'Brien, F. J., 2011, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today*, 14(3): 88–95 pp.

Okamoto, M., 2019, The role of scaffolds in tissue engineering, In *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One*, Elsevier.

Orr, A. W., Helmke, B. P., Blackman, B. R., & Schwartz, M. A., 2006, Mechanisms of mechanotransduction, *Developmental Cell*, 10(1): 11–20 pp.

Poghosyan, T., Catry, J., Luong-Nguyen, M., Bruneval, P., Domet, T., Arakelian, L., Sfeir, R., Michaud, L., Vanneaux, V., Gottrand, F., Larghero, J., & Cattan, P., 2016, Esophageal tissue engineering: Current status and perspectives, In *Journal of visceral surgery* (Vol. 153, Issue 1, pp. 21–29).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Rahmati, M., Mills, D. K., Urbanska, A. M., Saeb, M. R., Venugopal, J. R., Ramakrishna, S., & Mozafari, M., 2020, Electrospinning for tissue engineering applications, In *Progress in Materials Science* (p. 100721), Elsevier Ltd.

Raya-Rivera, A., Esquiliano, D. R., Yoo, J. J., Lopez-Bayghen, E., Soker, S., & Atala, A., 2011, Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: An observational study, *The Lancet*, 377(9772): 1175–1182 pp.

Raya-Rivera, A. M., Esquiliano, D., Fierro-Pastrana, R., López-Bayghen, E., Valencia, P., Ordorica-Flores, R., Soker, S., Yoo, J. J., & Atala, A., 2014, Tissue-engineered autologous vaginal organs in patients: A pilot cohort study, *The Lancet*, 384(9940): 329–336 pp.

Rezakhaniha, R., Agianniotis, A., Schrauwen, J. T. C., Griffa, A., Sage, D., Bouten, C. V. C., Van De Vosse, F. N., Unser, M., & Stergiopoulos, N., 2012, Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 11(3–4): 461–473 pp.

Ritchie, A. C., Wijaya, S., Ong, W. F., Zhong, S. P., & Chian, K. S., 2009, Dependence of alignment direction on magnitude of strain in esophageal smooth muscle cells, *Biotechnology and Bioengineering*, 102(6): 1703–1711 pp.

Rockwood, D. N., Preda, R. C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M. L., & Kaplan, D. L., 2011, Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin, *Nature Protocols*, 6(10): 1612–1631 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Rodríguez, A. I., Csányi, G., Ranayhossaini, D. J., Feck, D. M., Blose, K. J., Assatourian, L., Vorp, D. A., & Pagano, P. J.,** 2015, MEF2B-Nox1 signaling is critical for stretch-induced phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(2): 430–438 pp.
- Romanazzo, S., Nemec, S., & Roohani, I.,** 2019, iPSC bioprinting: Where are we at?, *Materials*, 12(15):.
- Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., & Grigolo, B.,** 2017, Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives, In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 78, pp. 1246–1262), Elsevier Ltd.
- Sampath, S. A., Lewis, S., Fosco, M., & Tigani, D.,** 2015, Trabecular orientation in the human femur and tibia and the relationship with lower-limb alignment for patients with osteoarthritis of the knee, *Journal of Biomechanics*, 48(6): 1214–1218 pp.
- Scherer, C., Pfisterer, L., Wagner, A. H., Hödebeck, M., Cattaruzza, M., Hecker, M., & Korff, T.,** 2014, Arterial wall stress controls NFAT5 activity in vascular smooth muscle cells., *Journal of the American Heart Association*, 3(2):.
- Schizas, D., Frountzas, M., Sgouromallis, E., Spartalis, E., Mylonas, K. S., Papaioannou, T. G., Dimitroulis, D., & Nikiteas, N.,** 2020, Esophageal defect repair by artificial scaffolds: a systematic review of experimental studies and proportional meta-analysis, *Diseases of the Esophagus*,.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Schleifenbaum, S., Prietzel, T., Aust, G., Boldt, A., Fritsch, S., Keil, I., Koch, H., Möbius, R., Scheidt, H. A., Wagner, M. F. X., & Hammer, N., 2016, Acellularization-Induced changes in tensile properties are organ specific - An In-Vitro mechanical and structural analysis of porcine soft tissues, PLoS ONE, 11(3):.

Sharabi, M., Benayahu, D., Benayahu, Y., Isaacs, J., & Haj-Ali, R., 2015, Laminated collagen-fiber bio-composites for soft-tissue bio-mimetics, Composites Science and Technology, 117 268–276 pp.

Shi, Q., Ju, H., Yao, L. Q., Zhou, P. H., Xu, M. D., Chen, T., Zhou, J. M., Chen, T. Y., & Zhong, Y. S., 2014, Risk factors for postoperative stricture after endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal carcinoma, Endoscopy, 46(8): 640–644 pp.

Shinohara, S., Shinohara, S., Kihara, T., & Miyake, J., 2012, Regulation of Differentiated Phenotypes of Vascular Smooth Muscle Cells, In *Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues - From Molecules to Humans*, InTech.

Siridamrong, P., Lumbikananda, N., Swasdison, S., Okhawilai, M., & Thamrongananskul, N., 2019, Effects of crosslinking agent and biological properties of silk fibroin/gelatin/chitosan ternary system electrospun nanofiber mats., Journal of Metals, Materials and Minerals, 29(4):.

Sladkova, M., & de Peppo, G., 2014, Bioreactor Systems for Human Bone Tissue Engineering, Processes, 2(2): 494–525 pp.

Song, J. tao, Hu, B., Qu, H. yan, Bi, C. long, Huang, X. zhen, & Zhang, M., 2012, Mechanical Stretch Modulates MicroRNA 21 Expression, Participating in Proliferation and Apoptosis in Cultured Human Aortic Smooth Muscle Cells, PLoS ONE, 7(10): 30728025 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Stegemann, J. P., & Nerem, R. M.**, 2003, Altered response of vascular smooth muscle cells to exogenous biochemical stimulation in two- and three-dimensional culture, *Experimental Cell Research*, 283(2): 146–155 pp.
- Stratton, S., Shelke, N. B., Hoshino, K., Rudraiah, S., & Kumbar, S. G.**, 2016, Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering, *Bioactive Materials*, 1(2): 93–108 pp.
- Sun, Z., Guo, S. S., & Fässler, R.**, 2016, Integrin-mediated mechanotransduction, In *Journal of Cell Biology* (Vol. 215, Issue 4, pp. 445–456).
- Tamiello, C., Buskermolen, A. B. C., Baaijens, F. P. T., Broers, J. L. V., & Bouten, C. V. C.**, 2016, Heading in the Right Direction: Understanding Cellular Orientation Responses to Complex Biophysical Environments, In *Cellular and Molecular Bioengineering* (Vol. 9, Issue 1, pp. 12–37), Springer New York LLC.
- Tan, J. Y., Chua, C. K., Leong, K. F., Chian, K. S., Leong, W. S., & Tan, L. P.**, 2012, Esophageal tissue engineering: An in-depth review on scaffold design, In *Biotechnology and Bioengineering* (Vol. 109, Issue 1, pp. 1–15).
- Tang, X., Thankappan, S. K., Lee, P., Fard, S. E., Harmon, M. D., Tran, K., & Yu, X.**, 2014, Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine, In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* (pp. 351–371), Elsevier Inc.
- Taylor, G.**, 1964, Disintegration of water drops in an electric field, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 280(1382): 383–397 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Teuschl, A. H., Schuh, C., Halbweis, R., Pajer, K., Márton, G., Hopf, R., Mosia, S., Rünzler, D., Redl, H., Nógrádi, A., & Hausner, T.,** 2015, A New Preparation Method for Anisotropic Silk Fibroin Nerve Guidance Conduits and Its Evaluation in Vitro and in a Rat Sciatic Nerve Defect Model, *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 21(9): 945–957 pp.
- Thakar, R. G., Cheng, Q., Patel, S., Chu, J., Nasir, M., Liepmann, D., Komvopoulos, K., & Li, S.,** 2009, Cell-shape regulation of smooth muscle cell proliferation, *Biophysical Journal*, 96(8): 3423–3432 pp.
- Urrutia, C. O., Dominguez-García, M. V., Flores-Estrada, J., Laguna-Camacho, A., Castillo-Cadena, J., & Flores-Merino, M. V.,** 2017, Mechanical Stimulation of Cells Through Scaffold Design for Tissue Engineering, In *Scaffolds in Tissue Engineering - Materials, Technologies and Clinical Applications*, InTech.
- Vacanti, J. P., & Vacanti, C. A.,** 2013, The History and Scope of Tissue Engineering, In *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition* (pp. 3–8), Elsevier Inc.
- van Uden, S., Catto, V., Perotto, G., Athanassiou, A., Redaelli, A. C. L., Greco, F. G., & Riboldi, S. A.,** 2019, Electrospun fibroin/polyurethane hybrid meshes: Manufacturing, characterization, and potentialities as substrates for haemodialysis arteriovenous grafts, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 107(3): 807–817 pp.
- Varkey, A., Venugopal, E., Sugumaran, P., Janarthanan, G., Pillai, M. M., Rajendran, S., & Bhattacharyya, A.,** 2015, Impact of silk fibroin-based scaffold structures on human osteoblast MG63 cell attachment and proliferation, *International Journal of Nanomedicine*, 10(Suppl 1): 43–51 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Vincent, L. G., Choi, Y. S., Alonso-Latorre, B., Del Álamo, J. C., & Engler, A. J.,** 2013, Mesenchymal stem cell durotaxis depends on substrate stiffness gradient strength, *Biotechnology Journal*, 8(4): 472–484 pp.
- Wang, H. Y., & Zhang, Y. Q.,** 2013, Effect of regeneration of liquid silk fibroin on its structure and characterization, *Soft Matter*, 9(1): 138–145 pp.
- Wang, Q., Chen, Q., Yang, Y., & Shao, Z.,** 2013, Effect of various dissolution systems on the molecular weight of regenerated silk fibroin, *Biomacromolecules*, 14(1): 285–289 pp.
- Wang, Yanming, Shi, H., Qiao, J., Tian, Y., Wu, M., Zhang, W., Lin, Y., Niu, Z., & Huang, Y.,** 2014, Electrospun Tubular Scaffold with Circumferentially Aligned Nanofibers for Regulating Smooth Muscle Cell Growth, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6(4): 2958–2962 pp.
- Wang, Yongzhong, Kim, H. J., Vunjak-Novakovic, G., & Kaplan, D. L.,** 2006, Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials, In *Biomaterials* (Vol. 27, Issue 36, pp. 6064–6082), Elsevier.
- Yi, B., Zhang, H., Yu, Z., Yuan, H., Wang, X., & Zhang, Y.,** 2018, Fabrication of high performance silk fibroin fibers: Via stable jet electrospinning for potential use in anisotropic tissue regeneration, *Journal of Materials Chemistry B*, 6(23): 3934–3945 pp.
- Yoon, K., Lee, H. N., Ki, C. S., Fang, D., Hsiao, B. S., Chu, B., & Um, I. C.,** 2013, Effects of degumming conditions on electro-spinning rate of regenerated silk, *International Journal of Biological Macromolecules*, 61 50–57 pp.
- Yuan, H., Zhou, Q., & Zhang, Y.,** 2017, Improving fiber alignment during electrospinning, In *Electrospun Nanofibers*, Elsevier Inc.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Zajczkowska, U.**, 2015, Ordering of the cellular arrangement and xylogenesis in wounded shoots of willow, *IAWA Journal*, 36(4): 387–399 pp.
- Zani, A., Pierro, A., Elvassore, N., & De Coppi, P.**, 2009, Tissue engineering: an option for esophageal replacement?, *Seminars in Pediatric Surgery*, 18(1): 57–62 pp.
- Zhang, F., Zhang, H., Zuo, B., & Zhang, X.**, 2011, Preparation and characterization of electrospun silk fibroin nanofiber with addition of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, *Polymer Science - Series A*, 53(5): 397–402 pp.
- Zhang, H., Zhou, L., & Zhang, W.**, 2014, Control of scaffold degradation in tissue engineering: A review, In *Tissue Engineering - Part B: Reviews* (Vol. 20, Issue 5, pp. 492–502), Mary Ann Liebert Inc.
- Zhang, W., Zhu, C., Ye, D., Xu, L., Zhang, X., Wu, Q., Zhang, X., Kaplan, D. L., & Jiang, X.**, 2014, Porous Silk Scaffolds for Delivery of Growth Factors and Stem Cells to Enhance Bone Regeneration, *PLoS ONE*, 9(7): e102371 pp.
- Zhao, P., Gu, H., Mi, H., Rao, C., Fu, J., & Turng, L. sheng**, 2018, Fabrication of scaffolds in tissue engineering: A review, *Frontiers of Mechanical Engineering*, 13(1): 107–119 pp.
- Zheng, Z., Guo, S., Liu, Y., Wu, J., Li, G., Liu, M., Wang, X., & Kaplan, D.**, 2016, Lithium-free processing of silk fibroin, *Journal of Biomaterials Applications*, 31(3): 450–463 pp.
- Zhou, J., Cao, C., & Ma, X.**, 2009, A novel three-dimensional tubular scaffold prepared from silk fibroin by electrospinning, *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(5): 504–510 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Zhou, J., Zhang, B., Shi, L., Zhong, J., Zhu, J., Yan, J., Wang, P., Cao, C., & He, D., 2014, Regenerated silk fibroin films with controllable nanostructure size and secondary structure for drug delivery, In *ACS Applied Materials and Interfaces* (Vol. 6, Issue 24, pp. 21813–21821), American Chemical Society.

Zhou, Q., Xie, J., Bao, M., Yuan, H., Ye, Z., Lou, X., & Zhang, Y., 2015, Engineering aligned electrospun PLLA microfibers with nano-porous surface nanotopography for modulating the responses of vascular smooth muscle cells, *Journal of Materials Chemistry B*, 3(21): 4439–4450 pp.

Zhu, Y., Zhou, M., & Hou, R., 2017, Tissue Engineering of Esophagus, In *Esophageal Abnormalities*, InTech.

TEŞEKKÜR

Beni öğrencisi olarak kabul eden, akademik hayata dair pek çok şey öğreten ve çalışmalarım sırasında, geniş bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bana destek olup yol gösteren değerli tez danışmanım Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR'e başta olmak üzere tezimi okuyup, değerlendirip değerli geri bildirimlerde bulunan tez savunma jüri üyelerim Prof. Dr. Sinan AKGÖL'e ve Doç. Dr. Aylin ZİYLAN'a en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tüm yüksek lisans eğitimim süresince tüm bilgi birikimlerini benle paylaşan ve her başım sıkıştığında rahatlıkla arayabildiğim çok değerli hocalarım ve yakın arkadaşlarım Dr. Şeyma TAŞDEMİR, Dr. Ece BAYIR, Cem TÜRKAY ve M. Mert ÇELTIKOĞLU'na, beraber çalışmaktan çok keyif aldığım ve her yardım istediğimde desteklerini hissettiğim çok değerli çalışma arkadaşlarım Zehra Gül MOÇİMEN, Barış GÜLİÇLİ, Dilara Lal LAL, Buse KAYHAN, Pelin ÇORUK İLHAN ve Özgün Selim GERMİYAN başta olmak üzere bütün Ege Biyomalzemeler ve 3B Biyoarafazlar Laboratuvar'ında beraber çalışmış olduğum arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca, akış sitometrisi deneylerinin yapılabilmesi için Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.B.D'de bulunan cihazı kullanabilmemi sağlayan Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ hocama teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımı şekillendirirken yapmış olduğum tüm seçimleri ve beni hem maddi hem de manevi olarak destekleyen, kendi mesleki başarılarından motivasyon aldığım annem Derya ŞAHİNLER'e, babam Yaşar Adnan ŞAHİNLER'e, ve çok sevdiğim kardeşim Ece ŞAHİNLER'e çok teşekkür ederim.

118S349 'nolu proje ile bu çalışmayı finanse eden ve gerçekleşmesini sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Mert ŞAHİNLER

ARAŞTIRMA ALANLARI

Biyomalzemeler, Doku mühendisliği, Mekanatransdüksiyon, Biyosensörler

EĞİTİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans, Ege Üniversitesi, FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ,
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI, (TEZLİ), 2021

Lisans, Celal Bayar Üniversitesi, MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ,
BİYOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ, 2013-2017

YAPTIĞI TEZLER

Lisans, "Spectrophotometric Detection Of Pesticide By Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates", Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 2017

Yüksek Lisans, "Düz Kas Hücrelerinin Yönlendirilmiş Yüzeylerde Doku Mühendisliği Amaçlı Dinamik Kültürü", Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, 2021

YAYINLAR/ESERLER

SCI, SSCI, AHCI İNDEKSLERİNE GİREN DERGİLERDE YAYINLANAN
MAKALELER

1. Asal, M., Özen, Ö., Şahinler, M., & Polatoğlu, İ. (2018). Recent Developments in Enzyme, DNA and Immuno-Based Biosensors. *Sensors* (Basel, Switzerland), 18(6), 1924.
2. Asal, M., Özen, Ö., Şahinler, M., Baysal, H. T., & Polatoğlu, İ. (2018). An Overview of biomolecules, immobilization methods and support materials of biosensors. *Sensor Review*.

DİĞER İNDEKSLERE GİREN DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALALELER

1. Seven, F., Gölcez, T., Şahinler, M., Şendemir, A., Karaman, O., Şen, M. (2019). Prolonged Electrical Stimulation of Neuronal PC12 Cells Using a Microchip. 2019 Medical Technologies Congress (TIPTEKNO)

KİTAP VEYA KİTAP BÖLÜMÜ

1. Bayır, E., Şahinler, M., Celtikoglu, M. M., Sendemir, A., (2020). Bioreactors in tissue engineering: mimicking the microenvironment. *Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration*. Woodhead Publishing.

BİLİMSEL KONGRELERDE ÖZET KİTABINDA YAYIMLANAN ÇALIŞMALAR

1. Sönmez Kılıçarslan P., Toros P., Asal M., Şahinler M., Tuğlu., İ. M. “Deneyisel Yara Oluşturulmuş Sıçanlarda Kök Hücre ve Kekik Yağının Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi” II. Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi, 12-14 Mayıs 2017, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa
2. Şahinler M., Polatoğlu İ. “Preparation Of Novel Magnetite Nanoparticle Cross-Linked Tyrosinase Aggregates” 13th Nanoscience And Nanotechnology Conference, 22-25 Ekim 2017, Antalya.
3. Şahinler M., Polatoğlu İ. “Detection of Food Additives by Magnetite Cross-Linked Tyrosinase Enzyme Aggregates“ EastWest Chemistry Conference 2018, 10-12 Ekim 2018, Lviv.

4. Özen Ö., Baysal H.T., Şahinler M., Asal M. “İn vitro ortamda L929 hücre hattında oluşturulan yara modelinde kök hücre ve kekik yağının iyileşme sürecine etkileri” II. Yaşam Bilimleri Kongresi, 23-25 Şubat 2017, Abdullah Gül Üniversitesi, Kayseri
5. Şahinler M., Gül A., Şendemir A. “Effects Of Regenerated Sılk Fıbron Prepared With Different Solvent Systems On Electro-Spun Nanofibers” 24th Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED2019), 17-20 Ekim 2019, İzmir.

