

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**PERİKARDİYAL SIVI KARAKTERİZASYONU VE DOKU
MÜHENDİSLİĞİ ÇALIŞMALARINDA
EKSTRASELLÜLER MATRİKS OLARAK
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Dilek SÖNMEZER**

**Danışman
Prof. Dr. Fatma LATİFOĞLU**

Doktora Tezi

**Aralık 2021
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**PERİKARDİYAL SIVI KARAKTERİZASYONU VE DOKU
MÜHENDİSLİĞİ ÇALIŞMALARINDA
EKSTRASELLÜLER MATRİKS OLARAK
KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

(Doktora Tezi)

**Hazırlayan
Dilek SÖNMEZER**

**Danışman
Prof. Dr. Fatma LATİFOĞLU**

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından FOA-2016-6692 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Aralık 2021
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Dilek SÖNMEZER



YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Perikardiyal Sıvı Karakterizasyonu ve Doku Mühendisliği Çalışmalarında Ekstrasellüler Matriks Olarak Kullanımının Araştırılması” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Dilek SÖNMEZER

Danışman

Prof. Dr. Fatma LATİFOĞLU

Biyomedikal Mühendisliği ABD Başkanı

Prof. Dr. Mahmut TOKMAKÇI

TEŞEKKÜR

Bana tez çalışmalarım süresince değerli desteği, güveni ve sabrı için danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fatma LATİFOĞLU'na tüm samimiyetim ve saygılarımla teşekkür ederim. Ayrıca, tez çalışmalarım ile ilgili bilgi ve becerilerini benimle paylaşarak yardım ve desteğini hiç esirgemeyen Öğr. Gör. Güler TOPRAK'a gönülden teşekkür ediyorum.

Tez İzleme Komitesi üyesi hocalarım Sayın Prof. Dr. Nurhan KARABOĞA ve Sayın Prof. Dr. Ayşegül GÜVEN'e destekleri ve değerli tavsiyeleri için teşekkür ederim.

Tez çalışmasında örnek alımı işlemlerinde katkılarından dolayı Prof. Dr. Ayhan DÜZLER'e ve tezin yöntem kısmında yönlendirmelerinden dolayı Dr. Öğr. Üyesi Tolga Tuğrul DEMİRTAŞ'a, perikardial sıvı hücreleri ve kalp ile ilgili bize hekim desteği sağlayan Dr. Burak AÇIKGÖZ'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca gösterdikleri anlayış ve destekleri için Çukurova Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölüm Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Erciyes Üniversitesi Betül–Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezi (GenKök) ve Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Merkezi (ERNAM) yönetimine, analizler süresince bana yardım ve desteklerini esirgemeyen akademik ve idari personele, sundukları imkânlar ve değerli destekleri sebebi ile gönülden teşekkür ederim.

Doktora boyunca, desteklerini ve dualarını esirgemeyen, değerli aileme, tüm dostlarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Dilek SÖNMEZER

Aralık 2021, KAYSERİ

PERİKARDİYAL SIVI KARAKTERİZASYONU VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ ÇALIŞMALARINDA EKSTRASELLÜLER MATRİKS OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Dilek SÖNMEZER

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Doktora Tezi, Aralık 2021
Danışman: Prof. Dr. Fatma LATİFOĞLU**

ÖZET

Hasarlı doku/organların onarımı ve rejenerasyonu için doku mühendisliği yaklaşımları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada sığır kalbinden alınan perikardiyal sıvının (PF) doku mühendisliği çalışmalarında kullanımı araştırılmıştır. Öncelikli olarak hücreleri uzaklaştırılmış olan PF (PFS); elektroegirme yöntemiyle hidrofobik özellik taşıyan polikaprolakton (PCL) kullanılarak üretilmiş olan PCL membranlarının yüzey kaplamasında kullanılmıştır. PFS'nin hücre tutunumu ve çoğalmasına olumlu etki oluşturması sonucu ile PFS'nin karakterizasyonu yapılmıştır. Karakterizasyon için Raman spektroskopisi, histolojik boyama ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; PFS'nin, doğal hücre dışı matris (ECM) bileşenleri olan kolajen tip I, III, IV, elastin, fibrin, fibrinojen, albumin, glikozaminoglikan (GAGs) ve proteoglikan içerdiği tespit edilmiştir. Tez çalışmasının son kısmında; PFS'nin hidrojel sistemlerde kullanılabilirliğini göstermek amacıyla dondurarak kurutulmuş PFS ve sıvı PFS Aljinat (A) çözeltisi ile karıştırılarak hidrojel yapılar üretilmiştir. PFS'nin hücre canlılığı ve farklılaşmasına etkisinin gösterilmesi için MC3T-3 fare osteoblast hücreleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PFS, biyoyumluluğu artırmaya yönelik çalışmalarda, çeşitli in-vitro/vivo hücre kültürü çalışmalarında, biyoyazıcılar ve hidrojel sistemler gibi tüm doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabileceği bu tez çalışmasıyla bir ilk olarak ortaya koyulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Doku mühendisliği, ECM, Perikardiyal sıvı, Aljinat, Raman spektroskopisi,

CHARACTERIZATION OF PERICARDIAL FLUID AND INVESTIGATION FOR USING AS EXTRACELLULAR MATRIX IN TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

Dilek SÖNMEZER

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

PhD Thesis, December 2021

Supervisor: Prof. Dr. Fatma LATİFOĞLU

ABSTRACT

Tissue engineering approaches are widely used for the repair and regeneration of damaged tissue/organs. This study investigated pericardial fluid (PF) from the bovine heart in tissue engineering studies. Firstly, decellularized PF called PFS has been used for surface modification of nanomembranes produced by the electrospinning method. The nanomembranes are produced by using polycaprolactone (PCL), which has hydrophobic properties. As a result of the positive effect on cell adhesion and proliferation with coating surface of PCL membranes with PFS. PFS is characterized with Raman spectroscopy, histological staining, and scanning electron microscopy (SEM) analyzes. According to the results obtained, PFS contains collagen types I, III, IV, elastin, fibrinogen, fibrin, albumin, glycosaminoglycan (GAGs), and proteoglycan, which are natural extracellular matrix (ECM) components. In the last part of the thesis, to demonstrate PFS usability in hydrogel systems, hydrogel structures were produced by mixing freeze-dried PFS and liquid PFS with Alginate (A) solution. MC3T-3 mouse osteoblast cells were used to demonstrate the effect of PFS on cell viability and differentiation. According to the results obtained, it has been demonstrated for the first time in this thesis that PFS can be used in studies to increase biocompatibility in various in-vitro/vivo cell culture studies and many tissue engineering studies.

Keywords: Tissue Engineering, ECM, Perikardiyal sıvı, Aljinat, Raman spektroskopisi

İÇİNDEKİLER

PERİKARDİYAL SIVI KARAKTERİZASYONU VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ ÇALIŞMALARINDA EKSTRASELLÜLER MATRİKS OLARAK KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
KABUL ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Perikardiyal Sıvı.....	2
1.2. Doku Mühendisliği.....	4
1.3. Ekstrasellüler Matriks (ECM) ve Bileşenleri	4
1.4. Kolajen	5
1.5. Elastin.....	7
1.6. Fibronektin	8
1.7. Laminin	9
1.8. İntegrinler	10
1.9. Glikozaminoglikan (GAGs).....	10
1.10. Sentetik Polimer Olan PCL Kullanılarak Skafold Üretimi	12
1.11. Elektroeğirme Yöntemi	13
1.12. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hidrojeller Sistemler	16

1.12.1. Kolajenin Hidrojel Sistemlerde Kullanımı	18
1.12.2. Aljinatın Hidrojel Sistemlerde Kullanımı	18
1.12.3. Kitosanın Hidrojel Sistemlerde Kullanımı	19
1.12.4. Hiyaluronik asit Hidrojel Sistemlerde Kullanımı	19
1.13. Moleküller Karakterizasyon Yöntemleri.....	20
1.13.1. Raman Spektroskopisi.....	20

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Sığırdan PF'nin Alımı ve PF Hücrelerinin İzolasyonu.....	24
2.2. Elektroegirme ile PCL Membranı Üretimi	26
2.3. PCL Membranların Sterilizasyonu	27
2.4. PCL Membranları Yüzey Kaplaması	27
2.5. PCL Membranı ile Hücre Kültürü.....	27
2.6. PCL Membranında Hücre Canlılık Analizi	28
2.7. PCL Membranı SEM Görüntüleme.....	28
2.8. PCL Membranı İstatistik Analizi	29
2.9. PFS'nin Karakterizasyonu.....	29
2.9.1. PFS'nin Dondurarak Kurutulması	29
2.9.2. SEM ile Morfolojik Analizi	30
2.9.3. PFS'nin Histolojik Boyama Analizi	30
2.9.4. PFS'nin Raman Spektroskobu ile Analizi	30
2.10. PFS'nin Hidrojel Sistemlerde Kullanımı.....	31
2.10.1. A-PFS (Aljinat-PFS) Hidrojellerinin Hazırlanması	31
2.10.2. A-PFS Hidrojelleri ile Hücre Kültürü	32
2.10.3. A-PFS Hidrojelleri Hücre Canlılık Analizi	32
2.10.4. A-PFS Hidrojellerinin Histolojik Analizi	33
2.10.4.1. A-PFS Hidrojellerinin H&E Boyama	33
2.10.4.2. A-PFS Hidrojellerinin AB Boyama.....	33
2.10.4.3. A-PFS Hidrojeli MT Boyama.....	34
2.10.4.4. A-PFS Hidrojeli AR Boyama.....	34
2.11. A-PFS Hidrojellerinin Raman Analizi.....	34
2.12. A-PFS Hidrojellerinin Morfolojik Analizi.....	35

2.13. A-PFS Hidrojellerinin İstatistiksel Analizi.....	35
--	----

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. PFS, Med ve FBS ile Yüzey Kaplaması Yapılmış PCL Membranlarına PFC Hücrelerinin in-vitro Kültürü Bulguları.....	36
3.2. PCL Membranlarında Kültürü Yapılan PFC Hücrelerinin Morfolojik Analizi	37
3.3. PCL Membranlarında Hücre Canlılığı Analizi Bulguları	42
3.4. PFS'nin Karakterizasyonu Bulguları.....	43
3.4.1. PFS Histolojik Analizi Bulguları	43
3.4.2. PFS SEM Analizi Bulguları	44
3.4.3. PFS Raman Analizi Bulguları.....	46
3.4.4. Sıvı PFS ve Dondurarak Kurutulmuş olan PFS'nin İstatistiksel Analizi	49
3.5. A-PFS Hidrojellerinin analizi bulguları	51
3.5.1. PFS-Alg hidrojellerinin Raman analizi bulguları.....	51
3.5.2. A-PFS Hidrojellerinin Hücre Kültürü Histolojik Analiz Bulguları.....	53
3.5.3. A-PFS Hidrojellerinin SEM Analizi Bulguları	56
3.5.3.1. A-PFS Hidrojelleri ile Hücre Kültürü SEM Analizi Bulguları...	56
3.5.3.2. A-PFS Hidrojellerinde Hücre Canlılık Testi Bulguları	58

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Tartışma	59
4.2. Sonuç ve Öneriler	62
KAYNAKÇA	69
ÖZGEÇMİŞ.....	85

KISALTMALAR

3B	: Üç boyutlu
A	: Aljinat
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
FACIT	: Fibril oluşumu ile ilişkili olan
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
G	: Glukuronik asitin
GAGs	: Glikozaminoglikan
GlcNAc	: N-asetil-D-glikozamin
GlcUA	: D-glucuronic acid
Gly	: Glisin
IdoUA	: L-iduronik asid
IR	: Infrared ışını
M	: Mannuronik asit
PAA	: poliakrilik asit
PCL	: Polikaprolakton
PEG	: Polietilen glikol
PEO	: Polietilenoksit
PF	: Perikardiyal sıvı
PFc	: Perikardiyal sıvı hücresi
PFS	: Hücreleri uzaklaştırılmış Perikardiyal sıvı
PGA	: Poliglikolik asit
PLA	: Polilaktik asit
PLGA	: Polilaktit-ko-glikolik asit
PU	: Poliüretan
PVA	: Polivinyilalkol
PVP	: Polivinilpropil
RGD	: Arginin, glisin, aspartik asit
Tg	: Camsı geçiş sıcaklığı

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Sıvı ve dondurarak kurutulmuş olan PFS'nin Raman spektrumları ve literatürde yeralan Raman spektrumları sonuçları.....	47
Tablo 2. Raman spektrumlarının TBA ile analizi sonuçları.	50



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	PF'nin biyokimyasal içeriği	3
Şekil 2.	PFS'de bulunan kolajen fiber ağının ışık mikroskobu görüntüsü	7
Şekil 3.	Kolajen ve elastin yapısal formu	8
Şekil 4.	Fibronektin yapısal formu ve içerdiği bileşenler.....	9
Şekil 5.	Fibronektin yapısal formu ve bileşenleri.....	10
Şekil 6.	Elektroeğirme yöntemi düzeneği	14
Şekil 7.	Raman kayması ve Raman spektrumu grafiği.....	21
Şekil 8.	Tez çalışması iş akış şeması.	24
Şekil 9.	Sığırdan PF'nin alımı	25
Şekil 10.	Elektro eğirme (Elektrospinning) cihazı	26
Şekil 11.	Elektro eğirme yöntemiyle üretilmiş olan PCL membranı	26
Şekil 12.	PCL membranı SEM görüntüsü (1.00 Kx)	27
Şekil 13.	Hücre ekimi yapılan PCL membranları	28
Şekil 14.	Jelleşmiş PFS'nin görüntüleri	29
Şekil 15.	A-PFS hidrojel yapılarının oluşturulması görüntüleri.....	31
Şekil 16.	Perikardiyal sıvı hücreleri (PFc) ışık mikroskobu görüntüleri.....	37
Şekil 17.	PCL membranı SEM görüntüsü	37
Şekil 18.	FBS, Med, PFS ve kaplama yapılmamış olan PCL membranlara PFc hücreleri ekiminden 24 saat sonraki 500x ve 2500x deki SEM görüntüleri	38
Şekil 19.	FBS, Med, PFS ve kaplama yapılmamış olan PCL skafoldlara PFc hücreleri ekiminden 3. gün (72 saat) sonraki 500x ve 2500x deki SEM görüntüleri.....	40
Şekil 20.	FBS, Med, PF ve kaplama yapılmamış olan PCL skafoldlara PFc hücreleri ekiminden 5. gün (120 saat) sonraki 500x and 2500x deki SEM görüntüleri.....	41
Şekil 21.	FBS, Med, PFS ile kaplanmış ve kaplama yapılmamış olan PCL membranların hücre canlılık testi grafiği	42

Şekil 22.	FBS, Med, PFS ile kaplanmış ve kaplama yapılmamış olan PCL membranlarında hücre canlılığı testi grafiği	43
Şekil 23.	PFS histolojik boyama görüntüleri.....	44
Şekil 24.	PFS'nin SEM görüntüleri (A-D).	45
Şekil 25.	PFS'de bulunan kolajen fiber yapısının görüldüğü SEM ve H&E boyama görüntüleri	45
Şekil 26.	Dondurarak kurutulmuş ve sıvı PFS'nin Raman analizi grafiği	49
Şekil 27.	Sıvı PFS ve dondurularak kurutulmuş PFS'nin ortalama Raman spektrumları.....	50
Şekil 28.	PFS ve dondurularak kurutulmuş PFS'nin tekli Raman spektrumunun TBA grafiği.	51
Şekil 29.	Aljinat ve PFS ile elde edilen hidrojellerin Raman spektrum grafiği.	52
Şekil 30.	Aljinat, A-PFS (1:1) hidrojelleri ve PFS'nin Raman spektrum grafiği.	52
Şekil 31.	A-PFS hidrojellerinde MC3T-3 hücrelerinin 7., 14. ve 21. günlerdeki, H&E ve Alcian blue histolojik boyama görüntüleri.	54
Şekil 32.	A-PFS hidrojellerinde MC3T-3 hücrelerinin 7., 14. ve 21. günlerdeki, MT ve Alizarin red histolojik boyama görüntüleri.	55
Şekil 33.	Aljinat ve artan oranlarda PFS eklenerek oluşturulan hidrojel yapıların SEM görüntüleri.....	56
Şekil 34.	A, A-150mg PFS ve A-PFS (1:1) hidrojelleri ve bu hidrojellerde kültüre edilen MC3T-3 hücrelerin 3., 7., 14. ve 21. günlerdeki SEM görüntüleri	57
Şekil 35.	A-PFS hidrojellerinde MC3T-3 hücrelerinin 1., 3., 7., 14. ve 21.günlerdeki hücre canlılığı grafiği	58

GİRİŞ

Problemin Tanımı ve Motivasyon

Travma veya çeşitli hastalıklar sonucu hasara uğrayan doku/organların fonksiyonunu tamamen veya kısmen yerine getirebilmek üzere gerçekleştirilen rejeneratif tıp ve doku mühendisliği çalışmaları biyomedikal mühendisliğinin önemli çalışma alanlarından. Hasarlı dokunun rejenerasyonunda yaygın olarak kullanılan doğal biyomalzemeler biyoyumlu olmalarından dolayı öncelikli olarak tercih edilmektedir. Yüksek biyoyumluluğa sahip olan doğal biyomalzemelerin kaynak yetersizliği yeni doğal biyomalzemelerin araştırılmasına yol açmıştır.

Tezin Amacı ve Katkıları

Bu tez çalışmasında şimdiye kadar sadece patolojik durumların analizi için biyokimyasal içeriği incelenmiş olan Perikardiyal sıvının karakterizasyonu yapılarak hidrojel sistemlerle birlikte doku mühendisliği çalışmalarında kullanımı araştırılmıştır.

Tezin Önemi

PF'nin şimdiye kadar farkedilmemiş bir özelliği olan doğal ECM bileşenleri içermesi ve yapısal olarak da ECM'ye benzerliği; Raman spektroskopisi, SEM ve histolojik boyama ile analiz edilerek bu tez çalışmasında bir ilk olarak keşfedilmiştir. PF ile ilgili şimdiye kadar yapılan çalışmalarda sadece kalp ile ilgili rahatsızlıkların tanı, teşhis ve tedavisinde PF biyokimyasal bileşenlerindeki değişiklikler incelenmiştir. Bu tez çalışması ile PF'nin doku mühendisliği çalışmalarında da kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu nedenle gerçekleştirilen çalışma PF'nin doğal ECM bileşenlerini içermesi ve yapısal olarak doğal ECM ye benzerliği ile üç boyutlu biyoyazıcı sistemlerde hidrojel olarak, ayrıca doğal biyomalzeme kaynağı gibi pek çok doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabilirliğini göstermesi açısından oldukça önem taşımaktadır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Perikardiyal Sıvı

Günümüzde en önemli sağlık sorunlarının başında kalp ve damar hastalıkları gelmektedir. Genetik ve çevresel faktörlerden kaynaklı olarak dolaşım sisteminin birinci elemanı olan kalbin hasara uğraması çeşitli hastalıkların oluşmasına sebep olacaktır. Bu yüzden kalp ve damar hastalıklarının tedavisi tüm dünyada ciddi önem taşımaktadır.

Kalbin etrafını çevreleyerek onu çevre dokulardan ayıran yapı olan perikardiyum iç ve dış tabaka olmak üzere iki tabakadan oluşmaktadır. İç tabaka seröz yapıdan oluştuğu için seröz perikardiyum, dış tabaka ise fibröz yapıdan oluştuğu için fibröz perikardiyum olarak adlandırılır. Seröz perikardiyumun kalbe daha yakın olan iç kısmı visseral hücrelerden oluşan ve miyokardiyumu kaplayan visseral perikardiyum, dış kısmı ise parietal perikardiyum olarak adlandırılır. Parietal ve visseral perikardiyum arasındaki boşlukta ise perikardiyal sıvı bulunmaktadır [1-5].

Bir plazma ultrafiltratı olan perikardiyal sıvı kalbi çevreleyen perikard zarı boşluğunu dolduruyor olması bu sıvıya önemli özellikler kazandırmaktadır. Kalp cerrahisi veya perikardiyosentez vesilesiyle perikardiyal sıvının incelenmesi kardiyovasküler hastalıkların belirlenmesinde ciddi önem taşımaktadır. Perikardiyal sıvının miktarı normal koşullarda, erişkin insanda yaklaşık olarak 15-50mL olup daha çok visseral perikardiyum orijinli olarak sentezlenmektedir [6-8].

PF miktarı farklı türden canlıların boyutuna ve çeşitli hastalıklara göre değişmektedir. Tavşanlardada bu miktar 0,4-1,9 mL iken bu tez çalışmasında sağlıklı sığırlardan alınan PF miktarı yaklaşık 50-100mL olmaktadır [1]. Normal koşullarda PF miktarı az olmakla birlikte görünüşü berrak ve soluk sarı renklidir. Bunun aksine PF görünüşü bulanık ise

enfeksiyon veya malignant bir durum olduğu, bulanık (bulutumsu) renkli ve kanlı ise sıklıkla tümör ve tüberküloz ile ilişkilendirilmektedir. PF miktarındaki artış patolojik bir durum olup perikardiyal efüzyona sebep olmaktadır [9]. Perikardiyumda meydana gelen iltihabi reaksiyon olan perikarditis hastalığı sadece insan için değil sığır gibi memeli canlılar için de tehlike arz etmektedir. Perikarditis olan sığırdan alınan PF sıvısı incelendiğinde yüksek oranda albumin, globulin, makroglobulin ve plazmaya göre daha az miktarda fibrinojen bulunduğu tespit edilmiştir [1, 10-13].

PF heterojen hücre topluluğundan oluştuğu için hangi hücreleri içerdiğinin belirlenmesi de zor olmaktadır. Sağlıklı bir insandan alınan PF içeriğinde başlıca mezoteliyal hücreler ve lökosit hücreleri bulunmaktadır. Lökosit hücrelerinden yüksek oranda lenfositler, granülositler, makrofaj, eozinofil ve bazofiller bulunmaktadır [1, 5, 14, 15].

Şekil 1’de doğuştan kalp hasarı olan, koroner arter veya kalp kapakçığı hasarı olan hastalardan alınan PF nin biyokimyasal içeriği görülmektedir. PF içinde K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{+2} , Mg^{+2} gibi plazmada bulunan iyonlar bulunmaktadır. Plazma ile kıyaslandığında PF içinde K^+ daha yüksek konsantrasyonda bulunurken, diğer iyonların konsantrasyonu PF içinde plazmaya göre daha düşüktür [1, 5,10].

Perikardiyal Sıvı Biyokimyası		
Rengi soluk-sarı	Hacmi 5-60mL	pH 7.57± 0.11
Toplam Protein 3.2 ± 0.7 g/dL	Albumin 2.4 ± 0.4 g/dL	Trigliserit 34 ± 23 mg/dL
Glikoz 133 ± 26 mg/dL	Üre 24 ± 14 mg/dL	Kolesterol 44 ± 14 mg/dL
Elektrolitler		
Na+ 138 ± 4 mM	K+ 5 ± 1 mM	Cl- 109 ± 5 mM
Ca+2 7.4 ± 0.5 mg/dL	HCO3- 21.7 ± 2.2 mM	P 3.4 ± 1.3 mg/dL

Şekil 1. PF’nin biyokimyasal içeriği [16].

PF içindeki kardiyak enzimleri ve troponin konsantrasyonu periferel kandakine göre daha yüksektir. Ayrıca, PF atrial ve beyin natriüretik peptitler ve endotelin-1 gibi biyolojik olarak aktif faktörleri içermektedir [18]. Gen ekspresyonu inhibitörü olan ve vasküler hasarın düzenlenmesinde görev alan miRNAs miktarı da PF de yüksek miktarda bulunmaktadır [18, 19].

1.2. Doku Mühendisliği

Travma, kanser gibi çeşitli sebeplerle hasara uğramış olan doku/organın rejenerasyonunu sağlamak, tamir etmek veya fonksiyonunu yerine getirmesini sağlamak amacıyla disiplinler arası bir alan olan doku mühendisliğine başvurulur. Hasarlı olan dokunun yenilenmesinde bu dokuyu oluşturacak hücelere ve hücreler için üç boyutlu bir destek malzemesi olan doku iskelesine (scaffold) ihtiyaç duyulmaktadır. Scaffold hücrelerin etrafını çevreleyen, hücreleri birarada tutarak doku ve organların oluşumuna olanak sağlayan doğal ekstrasellüler matriksi taklit etmek amacıyla kullanılmaktadır. Doğal ECM yi taklit eden scaffold üretimi için doğal ya da sentetik polimerler kullanılır. Doğal polimerler yüksek biyouyumluluğa sahip olmakla birlikte manipülasyonun zor olduğu durumlarda sentetik polimerler ile birlikte scaffold üretiminde kullanılır. ECM'yi oluşturan kolajen, fibrin, elastin, fibronectin, laminin gibi proteinler veya polisakkarit bileşenlerinden oluşan Glikozaminoglikan (GAGs) tek başına veya bir veya birkaçı biraraya getirilerek hücelere üç boyutlu destek sağlamak amacıyla scaffold üretiminde kullanılmaktadır [20].

1.3. Ekstrasellüler Matriks (ECM) ve Bileşenleri

Hücrelerin etrafını çevreleyerek hücreleri destekleyen kompleks bir yapıdır. ECM tüm dokuların yapılarında bulunmasına rağmen özellikle deri, kıkırdak, kemik ve tendonda yüksek oranda bulunur. ECM bulunduğu dokunun fonksiyonu ve yapısına göre farklı özellikler taşır. Kemik ve dişte kalsifiye halde, korneada şeffaf, tendonlarda ise lifli yapıda olup çok sağlamdır. Yüksek su tutma özelliği ile yumuşak dokuların gerginliğinin ayarlanmasını sağlar. İçerdiği mineraller ile iskelet dokusunun sağlam ve sert olmasına olanak sağlar. Ayrıca, hücrelerin ihtiyacı olan büyüme faktörlerini yapısında tutar ve hücrelerin yapışması, göç etmesi ve çoğalmasında düzenleyici olarak görev alır.

ECM genel olarak üç biyomolek lden oluşur. Bunlardan ilki yapısal proteinler olan kolajen ve elastin, ikincisi;  zellileşmiş proteinlerden olan fibronektin, laminin ve integrinler,          ise polisakkarit zincirlerden oluşan glikozaminoglikanlardır [21-29].

Doğal polimerler kullanılarak üretilen hidrojel oluşturabilen polimerler, doğal doku ECM'sinde bulunan veya benzer makromoleküllere sahip olduklarından, doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır [30,31].

Doğal polimerlerden olan kolajen, jelâtin, kitosan, hyaluronik asit, kondroitin sülfat, agaroz, aljinat ve fibrin doku mühendisliği yaklaşımlarında en sık kullanılan malzemelerdendir.

Dokuyu oluşturan her hücre tarafından sentezlenen ECM yapısal ve fonksiyonel moleküllerden oluşur. Doku  eşitine göre biyokimyasal bileşimi ve üç boyutlu (3B) organizasyonu değişkenlik göstermektedir. ECM bileşimi ve yapısını taklit için doğal ve sentetik polimerler kullanılarak hücelere vücut içindeki ortam oluşturulmaya çalışılmaktadır. [32].

1.4. Kolajen

Kolajen ECM'de en fazla bulunan bir fibröz protein olup, hücelere için önemli derecede biyouyumlu bir ortam sağlar. Bu yüksek biyouyumluk özelliği ile kolajen, implante edilebilir tıbbi ürünler ve *in vitro* test sistemleri için iskeleler için mükemmel bir biyomalzeme özelliği taşımaktadır. Dokularda bulunan kolajen fizyolojik olarak oldukça aktif özellikte olup hücelere ve hücresel bileşenler için en uygun ortamı sağlayan iskele malzemesidir. Bulunduğu dokulara dayanıklılık verir, doku şeklini korur, dokuya gerilme direnci sağlar ve hücre yapışması ve göçünde de önemlidir [33].

Omurgalılarda 28 farklı tip kolajen bulunmaktadır. Kolajen bağ dokunun başlıca yapısal proteinidir. Kolajen tip I neredeyse tüm dokularda bulunmasına rağmen özellikle tendon ve deride bulunmaktadır. Kolajen tip II kıkırdak ve korneada, tip III ise damar duvarında bulunmaktadır [34].

Kolajenin vücutta bulunduğu başlıca doku/organlar; deri, perikard, ince bağırsak, idrar torbası (mesane), tendon, kemik ve kalp kapak ıdır. Perikard zarlarından olan fibröz

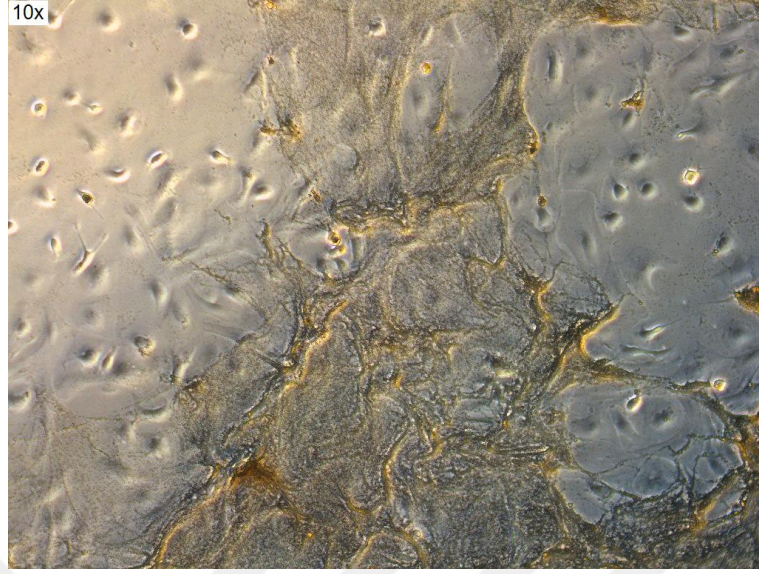
ve visseral perikardiyum kolajen ve elastik fiberlerden oluşur. Özellikle fibröz perikardiyumda kollajen lifleri oldukça yönlendirilmiş halde bulunur [35].

Deri, tendon ve kemikte yüksek oranda tip I kolajen ve az miktarda tip III and tip V bulunur. Kıkırdak doku esas olarak tip II kolajenden oluşur. Kolajen, olgun bir kolajen lifi haline gelmeden önce, bağ doku fibroblastlarında, endotel ve epitelial hücrelerinde intrasellüler prekürsör molekül halinde sentezlenir. Neredeyse tüm dokularda bulunan kolajen daha çok bir ağ veya inci kolye gibi düzenlenir. Fibril oluşumu ile ilişkili olan kolajen (FACIT) olarak adlandırılır. Tip IX ve XII kolajen çeşitleri, kolajen fibrilleri birbirine ve diğer ECM moleküllerini birbirine bağlar. Tip IV ve tip VII kolajenler ise ağ oluşturma özelliğine sahiptir [2]. Şekil 2’de PF’de bulunan kolajen fiber ağının ışık mikroskobu görüntüsü görülmektedir.

Tüm kolajenler, kısmen aynı veya çok benzer polipeptit zinciri ile homo/heterotrimerler şeklinde üçlü heliks (3 alfa heliks zinciri) yapısından oluşur. Kollajen molekülleri tekrarlayan en küçük aminoasit olan glisin (Gly) aminoasitinden oluşur. Gly’in 3’lü heliks merkezindeki konumu, yan zinciri her zaman kaplayan hidrojen atomu sayesinde korunur. Gly ile birlikte her biri 21 aminoasitten biri olan X ve Y aminositleri (Gly-X-Y)_n üçlü heliks yapısını oluşturur. Kolajenin yapısındaki amino asitlerin yaklaşık %35’i glisin, %21’i prolin ve hidroksiprolin, %11’i alanindir. Kollajen, triptofan aminoasiti içermediği için besin değeri düşüktür [34, 36,37].

Kolajenin yarı ömrü birkaç gün kadar olup, metaloproteazlar ve özellikle kolajenaz ve serin proteazlar tarafından yavaş bir şekilde glisin-lösin veya glisin-izolösin bağlantılarından yıkılır. Kolajen midede pepsin enzimi ile de yavaş olarak parçalanır [38,39]. Kollajen, soğuk suda çözünmeyip, ancak sıcak su veya sulu asit ve alkalilerle kaynatmakla çözünerek jelâtime dönüşür. Kolajenin suda uzun süre veya asitte kısa süre kaynatılmasıyla oluşan jelâtin, kolajenin üçlü heliks yapısının hidrolizi ile tek sarmallı yapılara ayrılması ile oluşur. Jelâtin de suda kolaylıkla çözünerek kolloidal jel çözeltilerini oluşturur [40].

Kolajene kıyasla daha az immünojenik özellikte olan jelâtin arginin, glisin, aspartik asit (RGD) üçlü peptid yapısına ve çeşitli bilgi sinyallerine bağlanarak hücre yapışması, göç, farklılaşma ve çoğalmayı teşvik edici özelliğe sahiptir [41].



Şekil 2. PFS’de bulunan kolajen fiber ağının ışık mikroskobu görüntüsü (10x büyütme)

Kolajen ve jelatin, çok yönlü kimyasal reaksiyonlarla geniş çapta modifiye edilir ve stabilize edilir. Dokulardaki kolajenin çapraz bağı ve üçlü heliks oluşumu kovalent bağlar ile olmaktadır. Yaşa bağlı olarak da çapraz bağ sayısı artmaktadır.

Kolajen, kanın pıhtılaşmasında etkilidir; kan pıhtısı ile etkileşerek yara deliğini kapatır. Oluşan kolajen lif ağı, zedelenme yeri üzerinde yeni bir hücre tabakası gelişinceye kadar yarayı örter [42].

Kolajenin medikal alanda kullanımı ilaç salınım sisteminde, doku mühendisliğinde matriks olarak, yumuşak dokuların tamirinde, tıbbi ürün üretiminde hammadde olarak, dental uygulamalar gibi çeşitli alanlarda membran olarak, hücrelerle birleştirilerek üç boyutlu biyoyazıcılarda biyo-mürekkep (bio-ink) olarak kullanılmaktadır [2, 43,44].

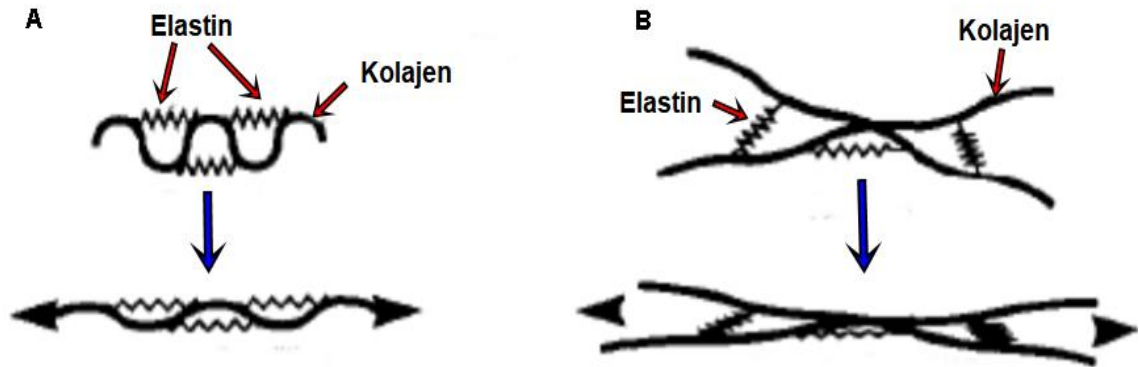
1.5. Elastin

Genellikle kolajen ile ilişkili olan fibriler bir protein çeşitidir. Vücudun çeşitli dokularında özellikle kan damarı, ligament ve deri dokusunda farklı konsantrasyonlarda elastin bulunur. Elastin, 72 kDa ağırlığında tropoelastin moleküllerinin bileşiminde oluşur [45-47]. Tropoelastinler blokkopolimerine benzer şekilde hidrofobik ve hidrofilik bloklardan oluşur. Hidrofobik ve hidrofilik bloklar çapraz bağ oluşturarak hidrolize karşı dayanımını artırır. Yapısında prolin ve glisin yüksek miktarda bulunurken nadiren hidroksiprolin de içerebilir. Elastin özellikle arterlerde en fazla bulunan ECM proteini çeşitidir. Tropoelastin lizin ve alanin kalıntıları içeren kısa bölgeler vasıtasıyla ayrılmış

glisin kalıntılarından zengin heliks parçalarından oluşmuştur. Heliks kısmı, kolajen heliksinden farklı olup, germe kuvveti uygulandığında uzarken, germe kuvveti kaldırıldığında tekrar eski haline döner (Şekil 3) [48,49].

Elastin, pepsin ile yavaş olarak hidroliz olurken tripsin ve kimotripsin ile parçalanmaz. Camsı özellikleri kaybedip viskoz özellik kazanmaya başladığı sıcaklık olan camsı geçiş sıcaklığı (T_g) 30°C 'dir. Elastince zengin dokulardaki elastinin izole edilmesi için 0.1N NaOH çözeltisinde 50dk bekletildiğinde elastin diğer proteinlerden ayrılmaktadır. Doğal biyomalzeme olarak anjiyogenezi artıran elastin içeren ticari ürünler de (Matriderm®) bulunmaktadır [21,34].

Elastin ile bağlanan kolajen fibrillerinin düzenlenişi deride paralel, tendon ve perikardda zig-zag şeklindedir. Kolajen, elastin ağının aşırı yüklenmesini önler ve enerjiyi kolajen liflerin elastik bölgeleri ile depolar [21,34].



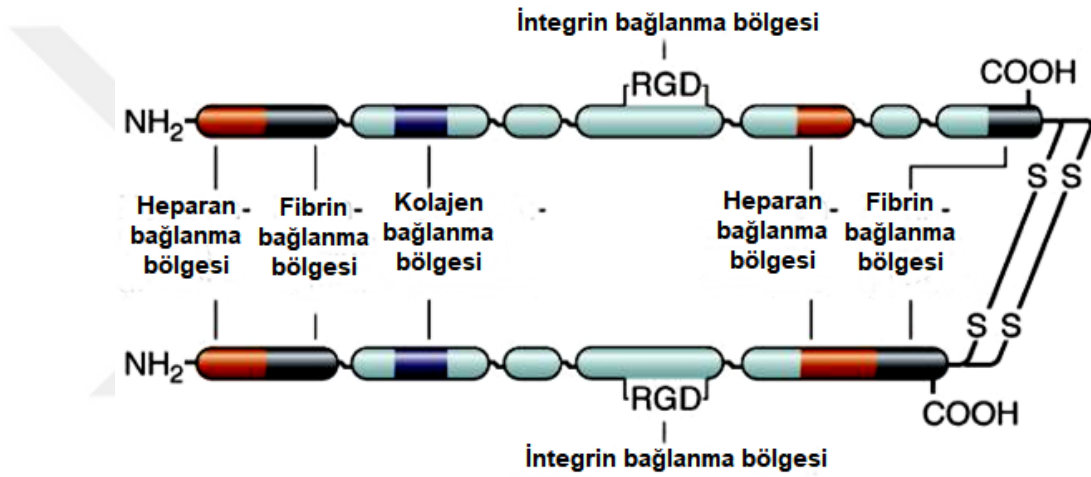
Şekil 3. Kolajen ve elastin yapısal formu. A; kolajen ve elastinin kuvvet uygulanmadan önceki yapısı, B; kolajen ve elastinin kuvvet uygulandığındaki yapısal formu [49].

1.6. Fibronektin

Fibronektin soğukta çözünmeyen globulin olarak da bilinen glikoprotein (MW: 450 kDa) yapılı bir ECM bileşenidir. Disülfid bağlarıyla bağlı iki alt birimden oluşur. Kollajenin de salgılandığı fibroblast hücrelerinden salgılanır. Özel bağlanma bölgeleri ile hücrelerin ECM'ye bağlanmasını sağlar. Ayrıca, kollajen proteoglikanlar gibi ECM'deki birçok madde, fibronektine bağlı olarak bulunur. Fibronektin kolajene benzeyen fibril ağı şeklindedir ve hücre yüzey reseptörü olan integrine bağlanarak hücrelerin ECM'ye tutunmasını sağlar. Fibronektinde bulunan 'RGD' yapısı üzerinden

integrine bağlanma olur (Şekil 4). İntegrin aktivitesi ile fibronektin matriks bağlanması aktin proteini içeren mikroflamentler sayesinde olur [50-52].

Hücre yüzeyindeki fibronektin, hücre-hücre ve hücre-substrat adhezyonu, hücre morfolojisi ve çoğalma, farklılaşma ve özellikle hücre göçü gibi birçok olayda etkindir. Diğer proteinlere göre başlıca özelliği yara iyileşmesi ve hücre yapışmasında önemli göreve sahiptir. Bazı hücrelerin büyüme faktörlerine duyarlılığını artırır. Fibronektinin çözünebilen bir tipi plazmada küre şeklinde bulunur ve yaralanma bölgesine kan plazmasından geçer [21,28,34,45].

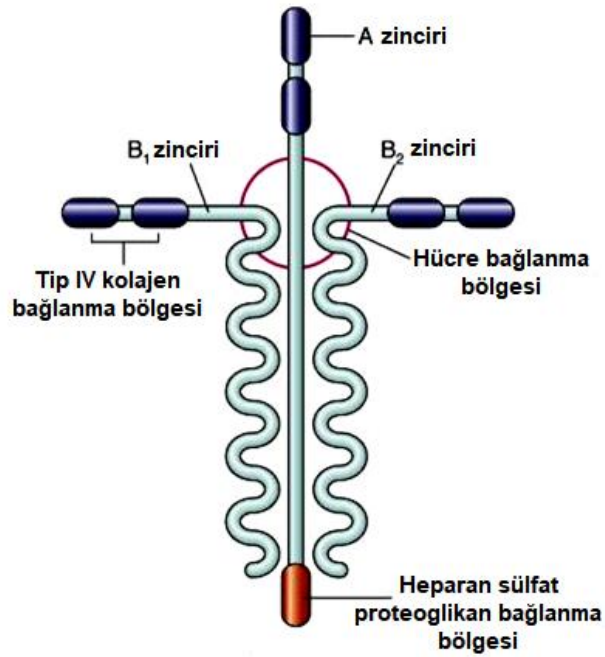


Şekil 4. Fibronektin yapısal formu ve içerdiği bileşenler [52].

1.7. Laminin

Üç uzun polipeptid zincirinin disülfid bağıyla heterotrimerik yapılı bir glikoproteindir (MW: 820 kDa). Şekil 5'de alfa, beta ve gama olmak üzere 3 farklı zincirden oluşan, hücre bağlanma, kolajen bağlanma ve heparan sülfat ile proteoglikan bağlanma bölgesi içeren fibronektin yapısal formu görülmektedir [53].

Kas ve epitel doku içeren çeşitli hücreler tarafından sentezlenerek hücre yapışmasında etkilidir. Laminin, hücre yüzey reseptörlerine ve diğer matriks proteinlerine (kolajen) bağlanır. Hücre adezyonu, farklılaşması ve göçünde önemli göreve sahiptir. Ayrıca hücreleri bazal laminaya bağlayan köprü gibi görev yapar [45].



Şekil 5. Fibronektin yapısal formu ve bileşenleri [52].

1.8. İntegrinler

Heterodimer yapılı hücre yüzey reseptörlerinin major ailesini oluşturur. Membran boyunca uzanarak hücreyi kolajen, laminin, fibroektin ve diğer ECM moleküllerine bağlayan bir glikoproteindir. RGD kısmından kollajen, fibronektin ve laminine bağlanır. ECM'ye hücrel yapışma integrinlerin hücre iskeleti elemanları ile ECM arasında bağlanma yapması ile düzenlenir. Lökosit ekstravazasyonu, trombosit agregasyonu, yara iyileşmesinde etkilidir. Ayrıca, ECM'den gelen uyarıların hücre içine iletiminden de sorumludur [21].

1.9. Glikozaminoglikan (GAGs)

Yapısında karbonil ve sülfat grupları içerdiği için negatif yüklüdür. Hücrelerdeki en anyonik molekül de GAGs'dır. GAGs yapısında dört tane sülfatlı grup bulur. Bunlar; kondrotin sülfat, dermatan sülfat, heparan sülfat, keratan sülfattır. Kondrotin sülfat veya dermatan sülfata göre ECM de miktar olarak daha az olan keratan sülfattır. Sülfatsız olan gruplar hiyaluronik asit ve heparindir [35].

Hiyaluran ya da hiyaluronik asit sülfat içermeyen tek GAGs bileşenidir. Hiyaluran modifiye edilmemiş N-asetil-D-glikozamin (GlcNAc) -D-glucuronic acid (GlcUA)

tekrarlayan birimlerinden oluşur. Hiyaluran (hiyalüronik asit veya hiyalüronat olarak da bilinir) basit bir kimyasal yapıya sahip olmasına rağmen uzun zincirli karmaşık polisakkarit zincirlerden oluşur. Hiyalüronan tekrarlayan dallanmamış disakkarit birimleri olan GlcUA veya L-iduronik asid (IdoUA) ile N-asetilglukozamin veya N-asetilgalaktozaminin bağlanmasından oluşur. Hidrate olmuş halde ECM'nin jel yapısının oluşmasını sağlar.

GAGs proteinlerle kovalent bağ yaparak proteoglikanları oluşturur. Proteoglikanlar hücre yüzeyinde de bulunabilirler. Büyüme faktörü gibi sinyal moleküllerini bağlama, bu moleküllerin aktivasyonu veya inhibisyonunda görev alarak hücreler arası kimyasal haberleşmeyi sağlar. Proteoglikanlar, bir glikozaminoglikan olan hiyalüronatın çok uzun ipliklerine yaklaşık 40nm aralıklarla ve nonkovalent olarak iç protein moleküllerinin bağlanması ve her iç proteine de kondroitin sülfat, keratan sülfat, heparan sülfat ve dermatan sülfat gibi birçok daha kısa glikozaminoglikan molekülü bağlanmasıyla oluşan makromoleküllerdir. Ekstrasellüler proteoglikanlar ile kollajen ve elastin gibi fibröz proteinler çapraz bağ yaparak ECM'nin ağısı yapısını oluştururlar. Böylece bu ağısı yapı sayesinde ECM dayanıklı ve elastiki özellik taşıır. Dokulardaki proteoglikanlar sürekli olarak farklı oranlarda parçalanmakta ve yeniden sentezlenmektedir. Bir proteaz olan katepsin D, proteoglikan yıkılımını başlatır; lizozomal sülfatazlar, endoglikozidazlar ve ekzoglikozidazlar da parçalanmayı sürdürürler [21].

Yeni bir doku/organın üretiminde yaygın olarak kullanılan yöntem, kontrollü kültür koşulları altında hastadan alınan biyopsi örneğinden izole edilen hücrelerin üç boyutlu doku iskelesinde kültüre edilmesidir. Hücreyi gerçek bir dokuya götürmek için taslak vazifesi görece doku iskelesi (scaffold) doğal ekstraselüler matriksi (ECM; hücre dışı madde) taklit edecek biçimde tasarlanan yapay bir hücre dışı matriks görevini üstlenecektir. Doku iskeleleri, hücreler için uygun yapışma yüzeyi oluşturmalarının yanı sıra, mekanik dayanım sağlamakta, fizyolojik ve biyolojik değişikliklere cevap vermek için çevre doku ile etkileşimin kurulmasına yardımcı olmakta; ayrıca gerçek hücre dışı matriksin yeniden oluşumuna da katkıda bulunmaktadır [54].

Doğal bir ECM glikozaminoglikan zincirinin bir hidratlanmış ağ içinde iç içe geçmiş lifler ve çeşitli protein fibrillerden oluşmaktadır. ECM'nin fibriller ve gözenekli yapısı

hücre yapışması ve göçü yani hücre işlevselliğinde ciddi etkisi olmaktadır [55]. ECM'nin yapısından yola çıkılarak biyo-benzetimin ile üretilen doku iskeleleri üç boyutlu bir doku oluşumunu destekleyici yapay bir yapıdır. Bu yapı hücrelerin tutunması ve göçüne izin verecek şekilde olmasının yanında hücre için gerekli besin alımı ve oluşan ürünlerin difüzyonunu sağlayan biyokimyasal faktörlerin iletimini sağlayacak şekilde geçirgen bir yapıya sahip olacak bir yapıda olmalıdır [20, 55].

Doku mühendisliğinde hücrelerin istenen dokuyu oluşturmak için vücut içindeki ECM'nin yerini tutabilecek doku iskelesi üretiminin sağlanması gerekmektedir. Doku mühendisliği ile yapay bir doku/organın üretilmesinde önemli olan canlı vücut yapısının iyi anlaşılması ile olacaktır. Canlı yapı incelendiğinde dokular hücrelerden ve ECM'den oluşmaktadır. Tez çalışmasının öncelikli amaçlarından biri ECM'yi taklit edecek bir doku iskelesi üretmektir. ECM yapısı incelendiğinde;

- Hücre-hücre etkileşimini organize eder,
- Hücrelere fiziksel destek sağlar,
- Hücre tutunması ve göçüne izin verir,
- Hücreler için 3B bir matris oluşturmaktadır. [56-58]

Doku iskelesi üretiminde kullanılacak yapı malzemeleri genel olarak doğal ve sentetik polimerlerden oluşmaktadır.

1.10. Sentetik Polimer Olan PCL Kullanılarak Skafold Üretimi

Polikaprolakton (PCL) biyoyumlu ve biyobozunur özellikte olan bir sentetik polimer çeşitidir. Kolay şekillenebilir ve farklı gözenek boyutunda üretilebilir olmasından dolayı doku mühendisliği çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, PCL Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onayı olduğu için her türlü *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kullanılabilir özellik taşımaktadır. PCL ϵ -kaprolakton monomerlerinin polimerleşmesiyle oluşan bir homopolimerdir. Hidrofobik, yarı kristalin özellikte olan PCL T_g sıcaklığı -60°C , erime noktası ise $59-64^\circ\text{C}$ arasındadır. Kristalin yapısı ve düşük erime sıcaklığı kolay şekil alabilir olmasına olanak sağlamaktadır. Molekül ağırlığı 3.000g/mol 'den 100.000 g/mol 'e kadar değişmektedir. PCL kloroform, diklorometan, karbon tetraklorür, benzen, toluen, aseton, 2-butanon, etil asetat,

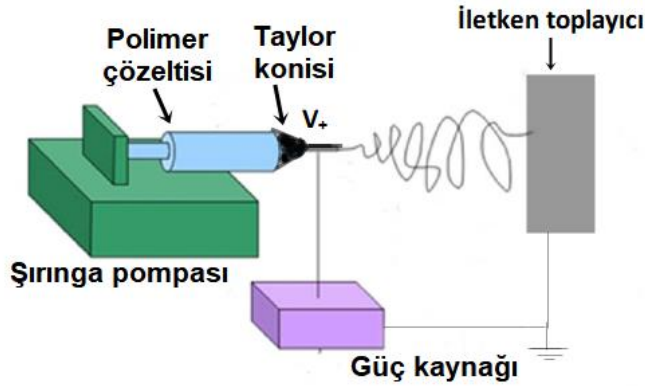
dimetilformamid, metanol ve asetonitril gibi çözücüler kullanılarak çözülebilmektedir [59]

PCL hidrofobik özelliğinden dolayı, diğer biyobozunur poliester grupları gibi hidrolizle değil enzimatik veya mikrobiyal faaliyetle bozunabilir. Hidrofobik özelliği ile özellikle yarayla temas etmeyerek açık yarayı dış ortamdan korumak amaçlı yara örtü malzemesi olarak kullanılmaktadır. PCL'den yapılmış yara örtü mazlemesine ilaç yerleştirilerek yaranın çabuk iyileşmesi sağlanabilmektedir [60,61]. PCL sentetik veya doğal polimerle harmanlama (blending) yapılması avantajı ile doku mühendisliğinde kullanımını yaygınlaştırmaktadır. PCL-polietilen glikol (PEG) kullanılarak üretilen anizotropik kompozit skafoldlar kalp kapakçığı hasarının giderilmesi için kullanılmaktadır [62]

PCL'den üretilen skafoldlara hücrelerin tutunumu hidrofobik özelliğinden dolayı iyi değildir. Bu yüzden PCL farklı polimerler ile birleştirilme ihtiyacı oluşmaktadır. PCL/Polivinilpropil (PVP) kopolimeri kullanılarak elektroegirme yöntemi ile üretilen skafoldlarda hücre tutunumunda artış gözlenmiştir [62,63].

1.11. Elektro eğirme Yöntemi

Elektro eğirme yöntemi polimer çözeltisine elektromanyetik alan uygulayarak çözeltinin başka bir noktaya doğru hareketi ile elektroegirme yöntemi ortaya çıkmıştır. Elektriksel kuvvetin etkisiyle damlacığa uygulanan yüzey gerilimi aşılarak önce koni (Taylor konisi) şekli alan damla ince jetlere (fiberlere) ayrılarak iletken toplayıcıya doğru akmaktadır. Genellikle kapiler bir besleme ünitesi olarak kullanılan şırıngada bulunan polimer çözeltisine yüksek voltaj (1-30 kV) uygulanır. Şırınga ucuna takılan iğnenin ucunda asılı durumda duran polimer çözeltisi damlası voltajın (DC voltaj) ilk uygulandığı anda kritik bir voltaj değerine kadar yüzey gerilimi ile damla şeklinde (küresel) bulunur. Potansiyel farkın belli bir eşik değerine ulaştığı anda, elektrostatik kuvvetler yüzey gerilimi kuvvetlerine eşitlenerek polimer damlası küre şeklinden Taylor konisi olarak adlandırılan koni şekline dönüşür (Şekil 6) [64,65]. Elektro eğirme yöntemi genel olarak üç önemli ana bileşenden oluşmaktadır (Şekil 6). Bu bileşenler 1. Yüksek voltaj güç kaynağı 2. Kapiller besleme ünitesi (şırınga, metal iğne) ve 3. Toplayıcı (iletken plaka, döner silindir) şeklinde sıralanabilir [66].



Şekil 6. Elektroeğirme yöntemi düzeneği [66].

Elektro eğirme düzeneğinin oluşturulmasında ilk olarak polimer çözeltisinin şırınga içine koyulması ve daha sonra şırıngadan belirli bir mesafe uzaklığa toplayıcı iletken plakanın yerleştirilmesidir. Güç kaynağının artı ucu şırınganın metal ucuna bağlanarak, toplayıcı plakanın da topraklanması gerekmektedir. Şırınga ve toplayıcı plaka arasında elektrik alan oluşması sayesinde güç kaynağından uygulanan gerilimin artması ile çözelti yüzey gerilimi aşılarak bir jet halinde şırıngadan toplayıcıya doğru hareket eder. Toplayıcı plakada rastgele ve üst üste biriken nano boyutta (40–2000 nm) fiberlerden bir nano membran oluşur [67,68].

Toplayıcı plaka mesafesi, uygulanan gerilimin büyüklüğü ya da çözeltinin akış hızı gibi değişkenler, hücre yapışması, çoğalma ve göç gibi hücre fonksiyonlarını etkilemek için değiştirilebilmektedir. Elektrik alan ile lif çekimi yapılmış polimer nanolifler protein adsorpsiyonu, yüksek yapısal bütünlük ve iyi mekanik özellikleri, biyo-benzer yapısı, geniş özgül yüzey alanları gibi birçok mükemmel özelliğe sahiptir [69,70].

Bu teknikle çok farklı doğal ve sentetik polimerden lif çekimi yapılmakta ve elde edilen nanolifler 3 boyutlu doku iskelelerinin üretiminde kullanılmaktadır. Bu amaçla çok çeşitli biyobozunur polimerler kullanılmaktadır. Elektrik alan ile lif çekim yöntemiyle; kolajen, kitosan, kitin, ipek fibroin ve polietilenoksit (PEO), PCL, polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), kopolimer polilaktit-ko-glikolik asit (PLGA), PLA ve PCL gibi doğal ve sentetik polimerden biyo-bozunur nanolif yapılı yüzeyler üretmek için kullanılır [20].

Elektro eğirme ile üretilen nanomembranlar ECM yapısal benzerliğinden dolayı doku mühendisliğine uygun nanoyapılı iskelelerin üretimi için umut veren, üretimi ve

uygulaması kolay ve ekonomik bir yöntemdir. Elektroeğirme yöntemi ile mikrometreden birkaç nanometre boyutlarında porlara sahip fiber yapıları skafold membran üretiminde işlem parametreleri değiştirilerek ve farklı polimerler kullanılarak birbirinden farklı hasarlı dokuları iyileştirmek için kullanılabilme özelliğine sahiptir. Elektro eğirmede genellikle sentetik ve doğal polimerler kullanılmasına rağmen seramik ve metal malzemelerde fiber yapıları nanomenranların üretiminde kullanılabilir. [69, 71, 72]

Ayrıca, hücreler arası iletişime olanak sağlaması, fiber yapısı ve gözenekli yapısı ile hücrelerin organize olarak dokuyu oluşturmasını sağlayan, polimer bozunma zamanının kontrol edilebilir olması açısından geniş kullanım alanına sahiptir. [69, 71, 72]

Elektro eğirme yöntemiyle üretilen skafold membranları doğal ECM yapılarına benzerliğinden dolayı implant, ilaç salınımı, ve hasarlı dokular için rejeneratif membran gibi doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır [63].

Poliüretan kullanılarak üretilen nanolifli membranlar yara örtü malzemesi üretiminde kullanılmaktadır [73].

PCL polimeri tek başına kullanılarak elektroeğirme ile nanofiberlerden oluşan membran üretildiği gibi ayrıca başka polimerlerle harmanlanarak da kullanılabilir. PCL'nin hidrofobik karakteri hücre iletişimi, çoğalma ve göç gibi hücresel faaliyetleri olumsuz etkilemesinden dolayı başka polimerler ile karışımı (PCL/PVP) kullanılarak bu olumsuz etki azaltılmaya çalışılmaktadır [63]. Hücre tutunumu, farklılaşması ve çoğalmasının sağlanması için PCL kolajenle harmanlanarak PCL/kolajen karışımından elektroeğirme ile skafold üretilmiştir [74].

Elektroeğirme yöntemi ile üretilen PCL skafolduna hücre tutunumu sağlamak veya hücre tutunumunu artırmak için yüzey kaplaması işlemleri uygulanmaktadır. NaOH çözeltisi ile muamele, lazer ve kimyasal uygulamalar, protein veya biyoaktif bileşenler ile kaplama, sıcak ve soğuk termal plazma uygulaması gibi çeşitli yöntemler PCL skafoldu yüzey kaplaması için kullanılmaktadır [75-77]. Elektroeğirme ile üretilen PCL skafoldları yüzey modifikasyonu işlemi NaOH çözeltisi kullanılarak yapılmış ve keratinosit ve fibroblast hücrelerinin skafold membranlarına tutunmasını artırmıştır [76].

PCL skafoldlarının yüzey modifikasyonuna yönelik yapılan başka bir çalışmada soğuk plazma tekniği yüzey modifikasyonu için kullanılarak modifiye edilmiş skafoldlara fibroblast hücrelerinin tutunması ve çoğalmasında artış gözlenmiştir. [77].

Doğal polimerlerin mekanik etkilerinin yetersizliği ile sentetik polimerlerin biyouyumluluk problemlerini ortadan kaldırmak için doğal ve sentetik polimerler birlikte kullanılarak skafold üretilmektedir. Jelâtin/PCL hibrit polimerinden üretilen skafoldlara hücre tutunumu ve çoğalması artırılmış ve kardiyak doku mühendisliği gibi diğer doku mühendisliği uygulamalarında da kullanılabileceği ortaya koyulmuştur. [78].

1.12. Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hidrojeller

Hidrojeller, yüksek oranda su içeren, polimer zincirleri arasındaki fiziksel ve kimyasal çapraz bağlarla yapısal bütünlüğü koruyan üç boyutlu polimer malzemeler olarak tanımlanır. Hidrojellerin su tutma kapasitesi hidrofilik yapısı ve yapısında bulunan çapraz bağlar sayesinde [36].

Hidrojellerin şişme-büzülme, uyarılara cevap verme, sıvı-jel geçişleri, şekil hafızası gibi özellikleriyle birlikte biyomolekülleri veya ilaçları dış çevreden korumaları, medikal alanda geniş uygulama alanına sahip olmalarını sağlamıştır [79]. Ayrıca, doğal ECM ye benzerlikleri ve hücrelere üç boyutlu ortam oluşturmaları ile 3B biyoyazıcılar için biyomürekkep olarak kullanılmaktadır [32,36,79].

Hidrojellerin üretilmesinde aljinat, kitosan, kolajen, fibrin, hiyaluronik asit gibi doğal polimerler ve PEO, PEG, polivinil alkol (PVA) ve poliakrilik asit (PAA) gibi sentetik polimerler kullanılabilmektedir. Sentetik ve doğal polimerden üretilmiş olan hidrojeller; biyobozunma, biyoabsorbsiyon, mekanik özellikleri ve yüksek biyouyumluluğu ile ilaç salınımı, yara örtü malzemesi, biyoyazıcılar için mürekkep ve skafold olarak doku mühendisliğinde yaygın kullanım alanına sahiptir [36,80,81].

Genellikle hidrojeller kolajen, hiyaluronik asit, elastin, fibrin gibi doğal ECM bileşenleri ya da fare tümör hücreleri tarafından sentezlenen bir protein kaynağından üretilen Matrigel ticari ürünü kullanılarak üretilmektedir. Ayrıca, hücreleri uzaklaştırılmış (desellürize) dokularının enzimatik olarak parçalanması, uygun pH ve

sıcaklık değerlerinde jelleştirilmesi ile üretilen doğal ECM kaynaklı hidrojeller üretilmektedir [82,83].

ECM'nin çözünebilir hidrojel formu *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarda kollajen veya Matrigel ile karşılaştırılabilir kültür substratları olarak ve enjekte edilebilir malzemeler olarak kullanılabilir. Hüresizleştirilmiş dokulardan elde edilen hidrojeller doğal ECM biyokimyasal yapısının korunması ve biyoyumlu olması açısından da matrigelden daha üstün özelliğe sahiptir [82-84].

Enjekte edilebilir ECM hidrojel için doku kaynağı olarak; nispeten kolay hüresizleştirme protokolü ve daha güvenilir jelleşme özelliğinden dolayı domuz miyokardiyumu kullanılmaktadır. Ayrıca; insan kalp dokusunun yaş, diyet, hastalık durumlarına göre kişiden kişiye değişkenlik göstermesine rağmen domuz kalp dokusunun bu faktörlere bağlı olmadan homojen özellik göstermesinden dolayı domuz kalp dokusu da ECM hidrojel için kullanılmaktadır [44-82,85].

Doğal polimerlerden olan kolajen, jelâtin, fibrin, elastin, kitosan ve aljinat biyoyumlu olmalarından dolayı doku mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal polimerler üretim aşamasında yapılarının bozulması, bozunmalarının hızlı olması ve mekanik olarak zayıf polimerler oldukları için sentetik polimerler ile birlikte kullanılmaktadır. Sentetik polimerler yüksek mekanik dayanım, manupilasyonunun kolaylığı ve yavaş bozunmalarından dolayı tercih edilirler. Poliüretan (PU), PEG, PGA, PLGA, polivinyilalkol (PVA), PLA ve PCL doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan sentetik polimer çeşitleridir. Özellikle damar doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan PCL bu tez çalışmasında doğal polimere destek amaçlı kullanılmıştır. Doğal ya da sentetik polimerleri kullanarak doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabilecek yapıları (doku iskelesi) üretmek amacıyla elektro eğirme yöntemi kullanılmaktadır [86,87].

Lineer alifatik poliester grubundan olan PCL FDA onaylı biyobozunur bir polimer çeşitidir. PCL biyoyumlu olması, yapısal dayanım, biyobozunurluk ve mekanik özelliklerinin iyi olması yanında biyoaktivitesinin düşüklüğü ve hücre tutunumunu engelleyen hidrofobik yapısından dolayı doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabilmesi için yüzey kaplama işlemlerinin yapılması gerekmektedir [63,75-77,87].

1.12.1. Kolajenin Hidrojel Sistemlerde Kullanımı

ECM nin başlıca önemli proteini olan ve neredeyse tüm dokuların yapısında yer alan, vücuttaki toplam proteinlerin yaklaşık %30 unu oluşturan kolajen proteini hidrojel üretiminde de kullanılmaktadır. Doğal ECM yapısında bulunmasından dolayı yüksek biyouyumluluğa sahip olması doku iskelesi ve özellikle biyoyazıcılar için mürekkep/hidrojel üretiminde kullanılarak doku mühendisliği uygulamalarında kullanımı yaygın halde gelmiştir [21,34,37,49].

Jelatin, ECM'nin ana bileşenlerinden biri olan kolajenin denatürasyonu ile oluşan, ısıya duyarlı bir proteindir [88]. Kolajen doğal dokudaki antijenlerin varlığı nedeniyle immünojenik problemler taşımaktadır. Jelâtin, glisin içeriği yüksek ($\approx$ %25), uzun α heliks yapısında bir protein maddesidir [89]. Proses yöntemine göre jelâtin genelde, tip A (asit proses) ve tip B (alkalin proses) jelatin olmak üzere iki türdür. Farklı yöntem ile elde edilen jelâtinlerin, izoelektrik noktaları ve pH'ları farklıdır. Ayrıca jelâtin, mükemmel biyouyumluluk, biyobozunurluk ve biyoadeziv özellik gösteren, immün sistemi uymayan, hücreye bağlanma ve çoğalma kapasitesi yüksek polimerlerdendir [90-92]. Ancak insan vücut ısısında jelatinin sıvı formda olması, mekanik sağlamlığının ve stabilizasyonun zayıf olması, jelatin içeren hidrojellerin kullanım alanlarını sınırlamaktadır [93]. Bu problemleri ortadan kaldırmak üzere kullanılan yöntemlerden bazıları kimyasal çapraz bağlayıcı ya da foto çapraz bağlayıcı ajanlar varlığında jelatinin kimyasal modifikasyonun gerçekleştirilmesidir [94,95]. Doğal ECM ile olan benzerliğinden dolayı kitosan-jelâtin, fibrin-jelatin, aljinat-jelatin, dekstran-gelatin gibi jelatin içeren hidrojel yapılar doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır [96-98].

1.12.2. Aljinatın Hidrojel Sistemlerde Kullanımı

Aljinat hidrofilik, anyonik lineer bir polimer olan aljinat kahverengi deniz yosunundan elde edilen bir polisakkarittir. Aljinat, mannuronik asit (M) ve glukuronik asitin (G) alt birimlerinden oluşur [99-101]. Aljinat yapısındaki G monomer blokları iki değerlikli kasyonlar (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} veya Sr^{2+}) ile reaksiyona girerek çapraz bağ oluşumu ile jelleşme meydana gelir [36, 102-107]

Aljinatın jel oluşturma yeteneği sayesinde; hidrofilik yapısı, düşük toksisite, immünolojik etki göstermemesi ve kaynak sıkıntısı olmaması nedeniyle hücre kapsüllemesi, doku mühendisliği ve ilaç taşınımı gibi birçok biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır [108,109].

Aljinatın hücre büyümesini desteklemesi ve yüksek biyouyumluluğu ile 3B doku iskeletleri oluşturmak için üretilecek olan bir kompozit malzeme üretiminde ve biyo baskı çalışmalarında da kullanılmaktadır [101,110].

Aljinatın hücre büyümesi ve çoğalmasını artırmak amacıyla kolajen, kitosan ve fibrin gibi diğer biyouyumlu malzemelerle birlikte doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabilmektedir [111-115]

1.12.3. Kitosanın Hidrojel Sistemlerde Kullanımı

Kitosan $\beta(1-4)$ bağlı glukozamin ve N-asetil-glukozamin bloklarından oluşna lineer bir polisakkarittir. Kabuklu canlılarda (yengeç ve karides kabukları) bulunan kitinin alkali ortamda kısmen deasetilasyonu sonucu elde edilen katyonik doğal bir polimerdir. Antimikrobiyal özelliği, toksik özellikte olmaması, çevreye zarar vermeden biyolojik olarak parçalanabilmesi ve vücut içerisinde, tamamen zararsız ürünlere (amino şekeri) parçalanması, jelleşme özelliği ile biyomalzeme olarak yaygın kullanım alanına sahiptir. Yapısında bulunan glukozamin ve N-asetilglukozamin içeriği ECM de bulunan GAG birimlerine benzerlik gösterdiği için yüksek biyouyumluluğa sahip bir polimerdir [116-120].

1.12.4. Hiyaluronik Asitin Hidrojel Sistemlerde Kullanımı

Doğal ECM yapısındaki glikozaminoglikan yapısını oluşturan bir polisakkarittir. Farklı moleküler ağırlıklara sahip olan hiyaluronik, birbirine zıt hücre davranışlarına sebep olmaktadır [121]. Anti-enflamatuar etki göstermesi, immünoşüpresif ve anjiyojenezi bloke etme özelliği ile biyomalzeme olarak kullanılmaktadır. [122, 123]. Hiyaluronik vücut içinde biyolojik olarak parçalanabilmektedir. Isıya duyarlı polimerler ile hibrit edilerek hidrojeller oluşturulabilmektedir. [124].

1.13. Moleküler Karakterizasyon Yöntemleri

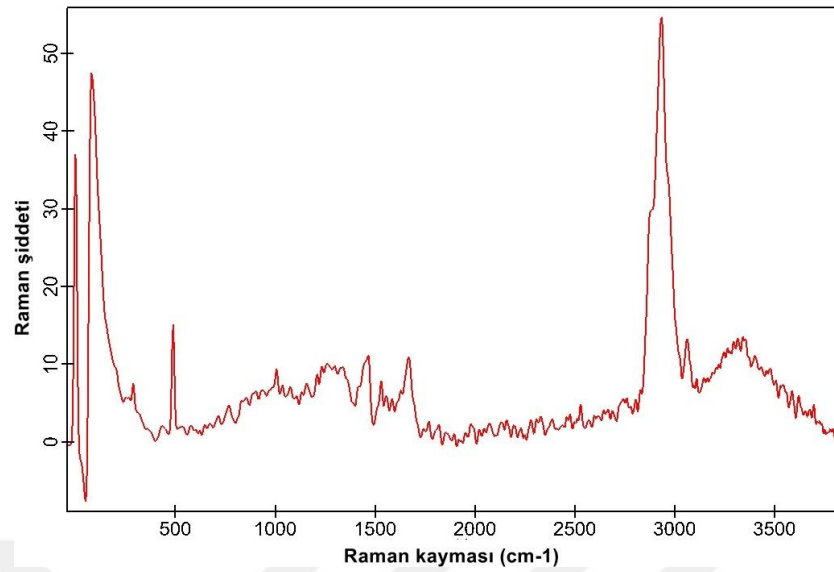
1.13.1. Raman Spektroskopisi

Spektroskopik yöntemler kromatografik ve floresans bazlı klasik yöntemlere alternatif olarak proteinler gibi biyolojik moleküllerin tanısı ve tayini için son zamanlarda ilgi odağı haline gelmiştir. Spektroskopide kullanılan ışının fotonları moleküller tarafından absorblanarak yayılır veya saçılırlar.

Raman spektroskopisi, elektromanyetik ışının moleküller ile etkileşimine girerek titreşim enerjilerinin ölçülmesi mantığına dayanır. Raman saçılması elektromanyetik ışın olarak genellikle lazer ışınları (monokromatik ışık) kullanılması ve lazer ışığı uyarımı ile molekülün polarizasyonunda meydana gelen değişim olarak da ifade edilebilir. Küçük dalga boyuna sahip olan ışınların enerjileri yüksek olduğu için molekül iç yörünge elektronlarını uyarır. Dalga boyu büyük olan kızılötesi (infrared) (IR) ışınlarının enerjisi düşük olduğu için bu enerji dış yörünge elektronlarını uyarmak için yeterli olmayıp ışın uyarısı ile moleküllerde sadece titreşim ve dönme hareketleri oluşur. Oluşan raman saçılması fotonun etkileştiği bağ hakkında titreşim bilgisi vererek oluşan titreşim spektrumu her bir molekül için spesifik olduğundan ramam spektrumları da moleküle özgü olup moleküllerin yapısı ve kimliği hakkında bilgiye ulaşılır [125-127].

Molekül veya atomlarda çoğu foton uyarılan ışın ile aynı enerjili (dalga boyu) olarak saçılır ve bu saçılma elastik (Rayleigh) saçılması olarak adlandırılır. Uyarılan ışın ile saçılan ışın enerjisinin büyük veya küçük olması gibi enerjilerin eşit olmadığı durumda inelastik saçılım olan Raman saçılması (raman kayması/shift) oluşur [128].

Raman kayması, dalga sayısı (Δ) olarak adlandırılabilir. Raman kayması aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanabilir. Raman spektrumunun verildiği grafikte Şekil 7’de görüldüğü gibi yatay eksen, dalga kayması/sayısı Δ olup, gözlenen ışının ve kaynağın dalga sayıları (cm^{-1}) arasındaki fark olarak tanımlanır (Eşitlik 2.1).



Şekil 7. Raman kayması ve Raman şiddeti grafiği

$$\Delta = (1/\lambda \text{ kullanılan ışın}) - (1/\lambda \text{ saçılan ışın})$$

Eşitlik 2.1

Titreşimsel spektroskopi çeşitleri olan IR ve RS Raman moleküllerin biyokimyasal yapısı ve karakterizasyonunda kullanılır. Raman spektreskobu IR'ye göre sudan çok az etkilendiği için katı ve sıvı örneklerdeki moleküllerin karakterizasyonu için öncelikli olarak tercih edilen analiz tekniğidir [129].

RS molekül içerisindeki kimyasal bağların çeşidi ve moleküldeki fonksiyonel grupların belirlenmesi, sulu örneklerin de incelenabilir olması, moleküllerin konformasyonu ve moleküllerin kimyasal yapısı hakkında bilgi vermesinden dolayı biyolojik moleküllerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılır. Ayrıca, analiz öncesi işlem gerektirmemesi, moleküler etiketleme veya kontrast ajan gerektirmeden kolaylıkla biyolojik moleküllerin analizi ve karakterizasyonuna olanak sağlayan moleküler parmak izi olarak da adlandırılabilen non-invasiv bir yöntemdir. Bazı dezavantajları elektronca fakir olan molekülleri polarize (kutuplaşma) etmek için düşük dalga boylarında ışıma yapan lazerler kullanılmalıdır. Fakat düşük dalga boylu lazerler kullanıldığında saçılmanın zayıf olması ve floresans spektrumunun da alınabilme ihtimali durumları ortaya çıkmaktadır. Bu dezavantaja düşük enerjili uzun dalga boylu lazerler kullanılarak çözüm sunulmaya çalışılmasına rağmen polarize olmayan moleküllerden raman saçılımı alınması mümkün olmamaktadır [130].

ECM'nin karakterizasyonu için Raman spektroskopisi kullanımı ise yeni bir analiz yöntemi olmaktadır. Raman spektroskopisi ile ECM nin biyokimyasal bileşenleri analiz edilebilmektedir. Bu non-invaziv yöntem diğer analiz yöntemleriyle birleştirilerek ECM'nin spesifik bileşenlerinin belirlenmesinde kullanılabilmektedir [128, 131].

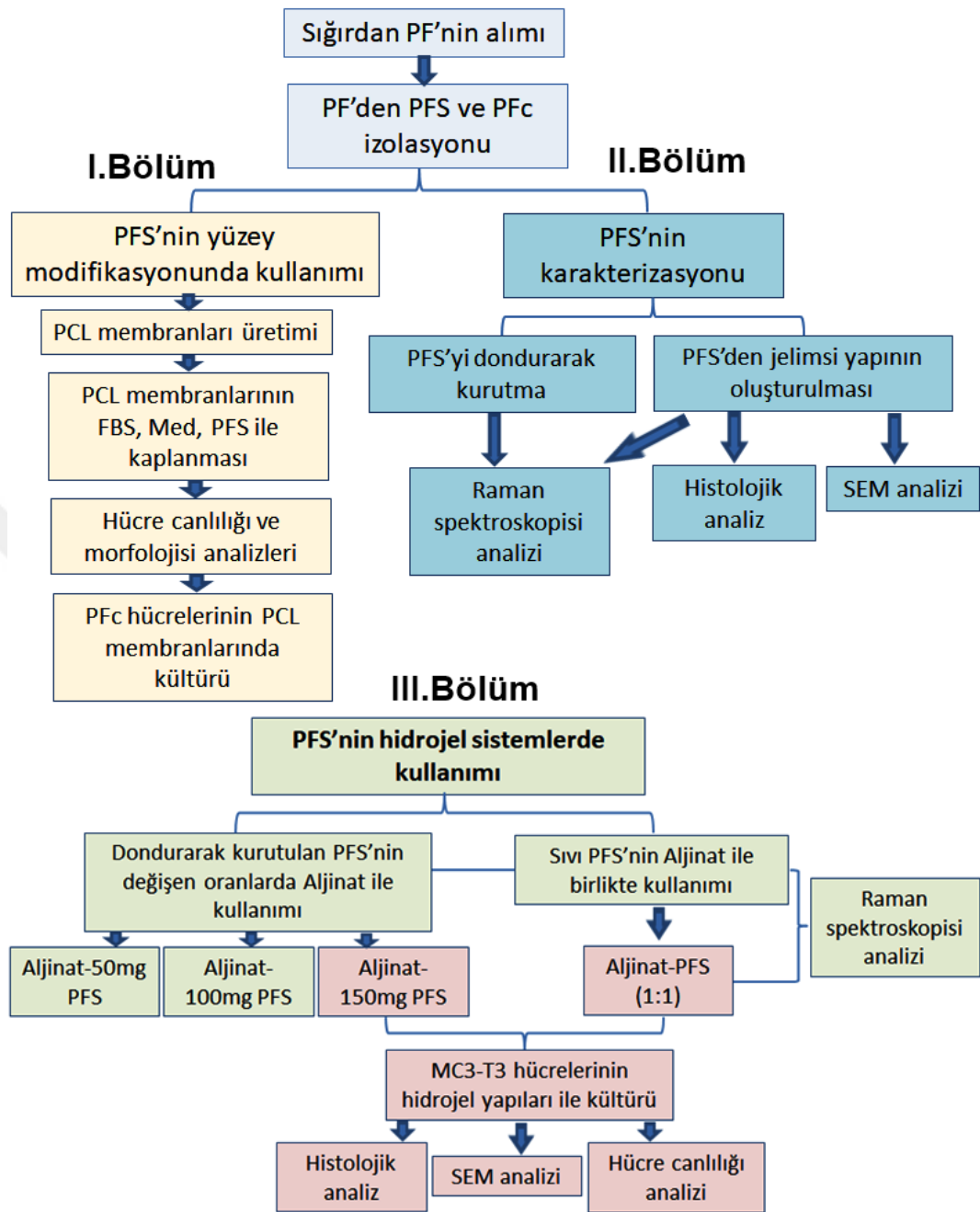


2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen tüm çalışmalar üç bölümden oluşmaktadır.

I.Bölümde; PF'nin sığırdan alınması ve PF'den elde edilen PFS'nin PCL membranlarının yüzey kaplamasında kullanımı ve PFc hücrelerinin invitro hücre kültürü işlemlerinden oluşmaktadır. **II. Bölümde;** PFS'nin Raman spektroskopisi, SEM ve histolojik analizler ile karakterizasyonundan oluşmaktadır. **III. Bölümde;** PFS'nin Aljinat ile birlikte hidrojel sistemlerde kullanımının araştırılması ve analizi işlemlerinden oluşmaktadır. Şekil 8'de üç bölümden oluşan tez çalışması işlem basamaklarından oluşan akış şeması görölmektedir.



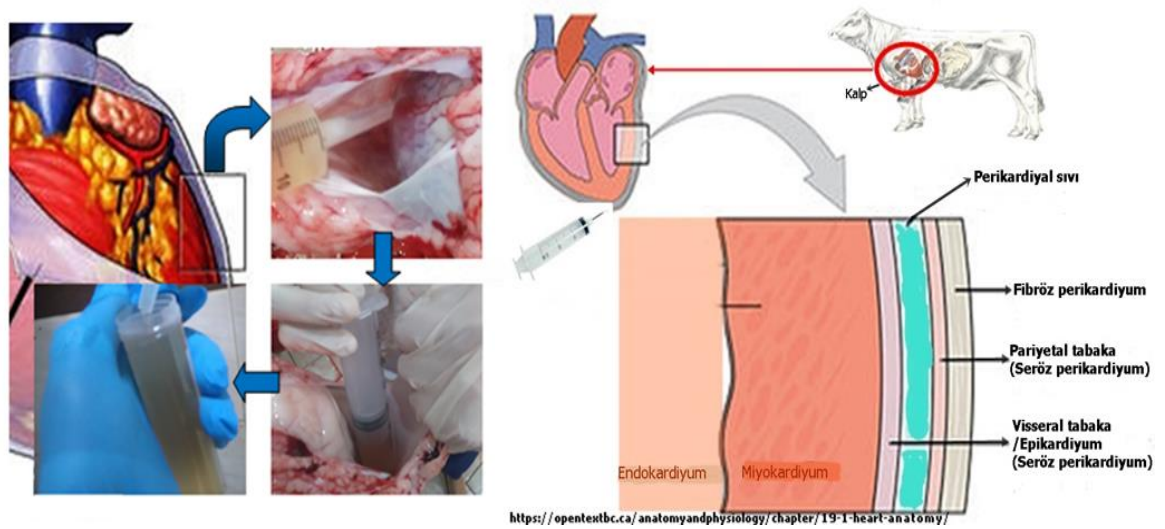
Şekil 8. Tez çalışması iş akış şeması.

I. Bölüm

2.1. Sığırdan PF'nin Alımı ve PF Hücrelerinin İzolasyonu

PF kesimhaneye getirilen sağlıklı, 2-3 yaşlarında ve 350-450 kg ağırlığındaki sığırlardan kesimden hemen sonra alınmıştır. Sığır göğüs kafesi açılarak ve

perikardiyumda hasar oluşturmada perikardiyal boşluğa steril enjektör (50mL) ile girilerek perikardiyal sıvı aspire edilmiştir (Şekil 9). Perikardiyal sıvı örnekleri yaklaşık 30 dk. içinde oda sıcaklığı koşullarında laboratuvara getirilerek 3500x rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda PFS olarak adlandırılan hücrelerden ayrılmış olan süpernatant 0.22µm'lik filtrelerden geçirilerek sterilizasyonu sağlanmıştır. Pelletdeki perikardiyal sıvı hücreleri (PFc) üzerine besi yeri eklenerek hücrelerin süspanse hale gelmesi sağlandı. PFc hücrelerini kültürde büyütmek için çalışma grubumuzun ortaya koyduğu yöntemle PFc hücreleri için en iyi besi yeri ortamı olarak belirlenmiş olan Alfa-Mem besi yeri kullanılmıştır. Bu besi yerine tamamlayıcı faktörler olan 10% sığır serumu (FBS), 250 U/mL penisilin, 250 µg/mL streptomisin, 25 mM glutamin, 20 µg/mL sığır insulin (Sigma Aldrich, Almanya), eklenerek, 37°C, 5% CO2 ve %95 nemli hava içeren inkübatörde hücreler kültüre edilmiştir [132-135]. Hücrelerin artışı %95 konfluense ulaştığında pasajlama işlemi yapıldı. Pasajlama işlemi için kültür kabına % 0.25 Trypsin-EDTA çözeltisi (Thermo Fisher Scientific) eklenerek 2-3 dk. 37°C olan inkübatörde bekletildi. Tripsin aktivitesi ile hücreler kültür kabında süspanse hale geldikten sonra tripsin aktivitesini durdurmak için mevcut solüsyonun yaklaşık 3 katı oranında besi yeri eklendi. Süspanse hücrelerin olduğu çözelti 3500x rpm'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra pelletteki hücreler Muse™ Count&Viability Assay (Merck-Millipore, Almanya) kiti kullanılarak Muse cihazında sayıldı.



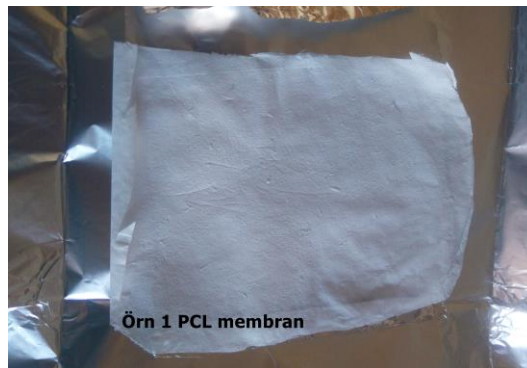
Şekil 9. Sığırdan PF'nin alımı [136].

2.2. Elektroeğirme ile PCL Membranı Üretimi

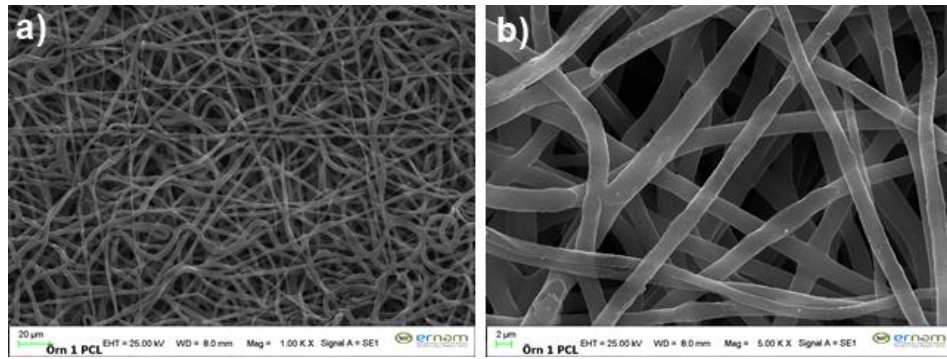
PCL polimer çözeltisi %20 oranında polimer ve %80 oranında çözücü olacak şekilde hazırlandı. 2gr PCL (80kDa, Sigma-Aldrich, Almanya) tartıldıktan sonra üzerine 2 ml metanol (CH_3OH ; 32,04 g/mol, Merck, Almanya) ve 8 ml kloroform (CHCl_3 ; 119,38 g/mol, Merck, Almanya) 4:1 (v/v) oranında eklenerek oda sıcaklığında 250 rpm hızda manyetik karıştırıcı ile 30-60 dk çözünmesi sağlandı. Hazırlanan PCL polimer çözeltisi enjektöre aktarılarak elektro eğirme cihazına yerleştirildi (Nanospinner, Inovenso, Türkiye). Şekil 10'da tez çalışmasında kullanılan elektroeğirme cihazının fotoğrafı görülmektedir. Elektroeğirme cihazında kullanılan parametreler; akış hızı oranı, düz toplayıcı uç ile olan mesafe ve voltaj sırasıyla 2 ml/h, 15 cm, and 20 kV olacak şekilde ayarlandı. Üretilen membranların taramalı elektron mikroskobu (SEM; ls-10 Life Science Zeiss, Almanya) görüntüleri ERNAM'da (Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi) görüntülenmek üzere etiketlenerek alüminyum folyo ile Şekil 11'te görüldüğü gibi paketiendi. Proje çalışmasında elde edilen örnek PCL skafolda ait SEM görüntüsü Şekil 12'de yer almaktadır.



Şekil 10. Elektro eğirme (Elektrospinning) cihazı



Şekil 11. Elektro eğirme yöntemiyle üretilmiş olan PCL membranı



Şekil 12. PCL membranı SEM görüntüsü. Mikroskop büyütmesi a) 1.00 Kx, b) 5.00 Kx

2.3. PCL Membranların Sterilizasyonu

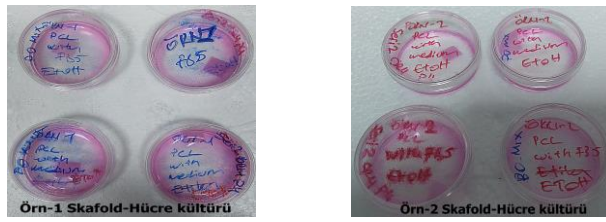
PCL membranı 0.5x0.5 cm² ebatlarında kesilerek membranların üzerine %70'lik (v/v) etil alkol eklenerek 30 dk bekletildi. Dulbecco's PBS (DPBS) (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile membranlar yıkanarak 2mL DPBS eklenerek 1 saat kabin içi UV ışığı altında bekletildi. PCL membranlar yeniden DPBS ile yıkanarak hücre kültüründe kullanıma hazır hale getirildi.

2.4. PCL Membranların Yüzey Kaplaması

Sterilize edilmiş olan PCL membranların yüzey kaplaması FBS, alfa-MEM medium ve PFS kullanılarak üç farklı şekilde yapılmıştır. PCL membranlar üzerine sırasıyla 500 µL FBS, Alfa-Mem (Med) besi yeri ve PFS eklenerek 1 saat inkübatörde bekletildi. Yüzey kaplamasının etkisinin belirlenmesi için yüzey kaplaması yapılmayan PCL membranı kontrol olarak kullanılmıştır.

2.5. PCL Membranı ile Hücre Kültürü

Muse cihazı ve Muse cell kit yardımıyla hücre sayısı ve canlılığı yüzdesi belirlendi. FBS, Med ve PFS ile kaplanmış olan PCL membranlarına 1x10⁵ cm² olacak şekilde besi yeri ile süspanse edilmiş hücrelerin ekimi yapıldı. Ekimi yapılan skafold membranlarına hücre tutunmasını sağlamak amacıyla inkübatörde 45dk. bekletildikten sonra PCL membranları bulunan petri kaplarına Alfa-mem mediumu eklenerek inkibatöre kaldırıldı. Şekil 13'te PCL membranların görüntüsü görülmektedir.



Şekil 13. Hücre ekimi yapılan PCL membranları

2.6. PCL Membranında Hücre Canlılık Analizi

MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) analizi mitokondriyal aktivite ile hücre canlılığının belirlendiği bir yöntemdir. Bu yöntemin temel mantığı metabolik faaliyete sahip hücrelerin MTT tuzu (Sigma-Aldrich, Almanya) içindeki tetrazolyum tuzunu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüştürmesi ile olmaktadır. Kaplaması yapılmış olan PCL membranlarına hücre ekimi yapıldıktan sonraki birinci, üçüncü ve beşinci günlerin her birinde MTT analizi yapılmıştır. Belirlenen günlerde kaplanmış PCL membranlarına ekilmiş olan hücrelerin besi yeri uzaklaştırılarak MTT çözeltisi (5mg/mL in PBS) her bir kültür kabına eklendi. 3 saat boyunca inkubatörde bekletildikten sonra mor renkli formazan kristallerinin oluştuğu gözlemlendi. MTT çözeltisi uzaklaştırılarak formazan kristallerinin çözünmesi için 96 kuyucuklu kültür kabına her kuyucukta 200µL olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO; Sigma-Aldrich, Almanya) eklendi. DMSO kör olarak kullanıldı. Her bir örnek üç tekrarlı olacak şekilde spektrofotometre cihazı (Glomax Elisa Reader, Promega, ABD) 560 nm dalga boyunda absorban ölçümü yapıldı.

2.7. PCL Membranının SEM Görüntülenmesi

PCL membranları üzerine ekimi yapılan PFSc hücrelerinin membran üzerindeki morfolojileri SEM ile görüntülenmiştir. Hücre kültürünün birinci, üçüncü ve beşinci günlerinde PCL membranları DPBS ile yıkandıktan sonra %2.5'lik (v/v) DPBS içerisinde hazırlanmış glutaraldehit ile 30 dk süresince (fiks) sabitlenmiştir. Ardından DPBS içerisinde 5 dk bekletilerek yapılarındaki suyun uzaklaştırılması için çeşitli etanol serilerinden sırasıyla (% 30, 50, 70, 90 ve 100) geçirildi. Bu işlemler sonrası örnekler, heksametildisilazan içerisinde 5 dk bekletilerek havada kurutulmuştur. SEM analizi öncesi örnekler ince bir altın tabakası ile kaplanarak görüntüleri alınmıştır.

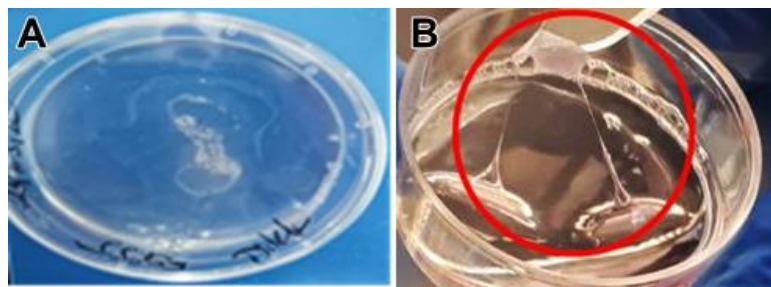
2.8. PCL Membranı İstatistik Analizi

İstatistik analizi SPSS programı (v.21.0; IBM) ile üçlü tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Tüm testler için anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Gruplar arası farklılığın karşılaştırılmasında parametrik analiz tekniklerinden bağımsız örneklem t-testi ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Analizler sonucunda gruplar arası anlamlı farklılığın ortaya çıkması durumunda, farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni testi kullanılmıştır. Anlamlı farklılığın kaynağını belirlemek ve daha detaylı karşılaştırma için Wilcoxon işaretli sıralar testi kullanılmıştır. Böylece, hücre canlılığının 1. günden 5.güne kadar her bir grup için karşılaştırma yapılmıştır.

II. Bölüm

2.9. PFS'nin Karakterizasyonu

PFS'nin karakterizasyonu için SEM, Histolojik ve Raman spektroskopisi kullanılarak analiz yapılmıştır. Analiz öncesi PFS 37°C, % 5 CO₂ ve % 95 nemli hava içeren inkübatörde yaklaşık 48saat bekletilerek jelleşmesi sağlanmıştır. Şekil 14'de PFS'nin jelimsi yapıya dönüşmesinin fotoğrafı görülmektedir. PFS jelimsi yapıya dönüştükten sonra analizler yapılarak PFS'nin içeriği hakkında bilgi edinilmiştir.



Şekil 14. Jelleşmiş PFS'nin görüntüleri

2.9.1. PFS'nin Dondurarak Kurutulması

PFS sıvıları öncelikle -80°C'de 1 gece bekletilip ardından liyofilizatör cihazı (Alpha 1-2 LD Plus, Martin. Christ, Almanya) ile dondurarak kurutuldu. PFS dondurarak kurutulduktan sonra miktar kaybının fazla olmadığı gözlemlendi. 1mL PFS sıvısından 53mg PFS tozu elde edilmiştir.

2.9.2. SEM ile Morfolojik Analizi

Jelimsi haldeki PFS % 2.5'lik (v/v) DPBS içerisinde hazırlanmış gluteraldehit ile 30 dk süresince sabitlenmiştir. Ardından DPBS içerisinde 5dk bekletilerek yapılarındaki suyun uzaklaştırılması için çeşitli etanol serilerinden sırasıyla (% 30, 50, 70, 90 ve 100) geçirildi. Bu işlemler sonrası jelimsi PFS hekzametildisilazan içerisinde 5dk bekletilerek havada kurutulmuştur. SEM analizi öncesi ince bir altın tabakası ile kaplanarak görüntüleri alınmıştır.

2.9.3. PFS'nin Histolojik Boyama Analizi

Jelimsi haldeki PFS boyama işlemleri yapılmadan önce histolojik kasetlere alınarak %4'lük paraformaldehitde 30dk fikse edildi. Örnekler distile su ile yıkandıktan sonra dereceli olarak artan (%50, %70, %80, %90, %100) alkol serilerinde 5'er dk bekletildi. Ksilen ile 30dk muamele edildi sonra parafin içerisinde 1 gece bekletildi. Daha sonra gömme işlemi yapılarak bloklar elde edildi. Sonrasında ise mikrotom (Thermo Scientific) ile örneklerden 8µm kalınlığında kesitler alındı. Daha sonra boyama aşamalarına geçildi. Elde edilen kesitlere Hematoksilen-Eozin (H&E), Masson Trikrom (MT) ve Alcian Blue (AB) histokimyasal boyama işlemleri uygulanmıştır [137-139].

AB (1% w/v, pH = 2.5) GAGs bileşenleri için, MT ise kolajen fiberlerin görüntülenmesi için kullanılmıştır. Boyama işlemleri sonrasında dehidrasyon için alkol serilerinden geçirilen örnekler ksilen ile yıkandıktan sonra entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı. Yapılan histokimyasal boyamaların hepsinden elde edilen kesitler ışık mikroskobu (Leica, Almanya) ile incelenerek analizi yapılmıştır.

2.9.4. PFS'nin Raman Spektroskobu ile Analizi

PFS karakterizasyonu için raman spektroskobu analizinde PFS'nin hem sıvı hem de dondurarak kurutulan PFS kullanılmıştır. PFS karakterizasyonu için PFS hidrojenleri raman spektrumları (785nm, 60mW) Witec Alpha 300 M+ konfokal Raman spektrometresi ile ölçülmüştür. Elde edilen raman spektrumları MATLAB programı kullanılarak analiz edilmiştir.

III. Bölüm

2.10. PFS'nin Hidrojel Sistemlerde Kullanımı

PFS'nin hidrojel sistemlerde kullanımı için hem dondurarak kurutulmuş olan PFS hem de sıvı PFS kullanılmıştır. Dondurarak kurutulmuş olan PFS değişen oranlarda (50, 100, 150mg) DPBS içinde çözülerek hazırlanan %3'lük Aljinat (A) çözeltisi ile karıştırılarak homojen bir çözelti elde edilmiştir. Ayrıca, sıvı PFS ile %3'lük Aljinat çözeltisi eşit hacimde (1:1) karıştırılarak bir diğer çözelti oluşturulmuştur. Böylece, A-50mg PFS, A-100mg PFS, A-150mg PFS ve A-PFS (1:1) şeklinde dört farklı grup oluşturulmuştur.

2.10.1. A-PFS (Aljinat-PFS) Hidrojellerinin Hazırlanması

Aljinat (Aljinik Asid Sodyum tuzu, Sigma, Almanya) DPBS (ph:7.4) içinde % 3 (w/v) oranında olacak şekilde hazırlanarak 25⁰C'de manyetik karıştırıcıda 6 saat boyunca karıştırılarak çözelti hazırlanmıştır. Alginat çözeltisine sırasıyla 50, 100, 150mg dondurarak kurutulmuş PFS eklenerek 25⁰C'de manyetik karıştırıcıda 2 saat boyunca karıştırılarak homojen çözelti elde edilmiştir. Ayrıca, Aljinat çözeltisine sıvı PFS (1:1, v/v) eklenerek başka bir çözelti daha hazırlanmıştır. Bu polimer çözeltilerine çapraz bağ oluşumu ile hidrojel yapının oluşmasını sağlayan %2'lik (v/v) CaCl₂ eklenerek 20 dk bekletilmiştir. Jelleşme gerçekleşikten sonra CaCl₂ uzaklaştırılıp DPBS eklenmiştir. Şekil 15'de A-PFS çözeltilerinden elde edilen hidrojel yapısının oluşumunu gösteren akış görüntüleri görülmektedir.



Şekil 15. A-PFS hidrojel yapılarının oluşturulması görüntüleri

2.10.2. A-PFS Hidrojelleri ile Hücre Kültürü

PFS'nin hücre canlılığı ve çoğalmasına etkisi belirlenmek amacıyla steril olarak hazırlanan %3 (w/v)'lük Aljinat çözeltisine 150mg PFS eklenerek hazırlanan çözelti ve A-PFS (1:1) çözeltisi hidrojel yapımı için kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak %3 (w/v)'lük Aljinat ile oluşturulan hidrojel kullanılmıştır. MC3T-3 fare osteoblast hücresi %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren Alpha-Mem besi yeri kullanılarak çoğaltılmıştır. Çoğaltılan hücreler her bir grup için hücre sayısı 2×10^7 (hücre/mL) olacak şekilde; Aljinat (A), A- PFS 150mg ve A-PFS (1:1) çözeltilerine eklenerek karıştırılmıştır. MC3T-3 hücrelerini içeren çözeltilerden hidrojel yapıların oluşması için çapraz bağlayıcı olarak %2'lik CaCl_2 eklenerek hidrojel yapılar elde edilmiştir. Hidrojel yapılarda hücrelerin kültüre edilmesi için %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin ve % 0,25 (w/v) CaCl_2 içeren Alpha-Mem besi yeri kullanılmıştır. MC3T-3 osteoblast hücrelerinin osteositlere farklılaşması için kültürün 3.gününde %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin ve %0,25 (w/v) CaCl_2 10mM β -gliserol fosfat, 50 $\mu\text{g/mL}$ askorbik asit içeren Alpha-Mem besi yeri farklılaşma besi yeri eklenmiştir. Her iki günde bir besi yeri değiştirilerek hücreler hidrojel yapılar içinde 21 gün boyunca kültüre edilmiştir.

2.10.3. A-PFS Hidrojelleri Hücre Canlılık Analizi

A, A-150mg PFS ve A-PFS (1:1) hidrojel gruplarında MC3T-3 osteoblast hücrelerinin canlılığının test edilmesi için MTT testi yapılmıştır. Hücre kültürünün 1., 3., 7., 14. ve 21. günlerinde hücre canlılığı test edilerek analiz edilmiştir. Belirlenen günlerde hidrojel yapıların kültüre edildiği besi yeri uzaklaştırılarak, MTT çözeltisi (5mg/mL) her bir kültür kabına eklenir. Örnekler inkubatörde 3 saat bekletildikten sonra MTT vasatı uzaklaştırılarak formazan kristallerinin çözünmesi için 96 kuyucuklu kültür kabına her kuyucukta 200 μL olacak şekilde izopropanol (Sigma-Aldrich, Almanya) eklendi. İzopropanol kör olarak kullanıldı. Her bir örnek üç tekrarlı olacak şekilde spektrofotometre cihazı (Glomax Elisa Reader, Promega, ABD) 570 nm dalga boyunda absorban ölçümü yapıldı.

2.10.4. A-PFS Hidrojellerinin Histolojik Analizi

Gruplardaki örneklere ait hidrojeller boyama işlemleri yapılmadan önce histolojik kasetlere alınarak %4'lük paraformaldehit ile fıkse edildi. Ardından dereceli olarak artan alkol serilerinden ve ksilenden geçirildikten sonra parafin içerisinde 1 gece bekletildikten sonra gömme işlemi yapılarak bloklar elde edildi. Parafin içerisinde gömülü olan örnekler -20°C'de donması sağlandı. Sonrasında ise mikrotom ile örneklerden 5µm kalınlığında kesitler alındı. Daha sonra boyama aşamalarına geçildi. Elde edilen kesitlere H&E, MT, AB ve Alizeran Red (AR) histokimyasal boyama işlemleri uygulandı [137-139]. Yapılan histokimyasal boyamaların hepsinden elde edilen kesitler ışık mikroskopunda (Leica, Almanya) incelendi.

2.10.4.1. A-PFS Hidrojellerinin H&E Boyama

Hidrojel örnekleri Hematoksilen (Merck) ve Eosin (Merck) boyarmaddeleri kullanılarak boyanmıştır. PFS'den hücrelerin uzaklaştırıldığından emin olmak amacıyla A-PFS hidrojeli H&E ile histolojik boyama yapılmıştır. Hematoksilen, dokunun bazofilik bölgesi olan çekirdeğin mavi-mor renkte boyanmasını sağlarken; Eosin, asidofilik kısımları (sitoplâzma ve bağ dokusu) pembe renge boyanır. Böylece mikroskobik gözlemlerde bu bölgeler tespit edilebilmektedir. Hazırlanan kesitlerden parafin uzaklaştırıldıktan sonra dereceli alkol (%100, %96, %70) serilerinden geçirilip suda yıkandı. Ardından kesitler H&E ile boyanarak önce artan alkol serilerinden daha sonra ksilolden geçirildi ve entellan ile kapatıldıktan sonra mikroskobik olarak değerlendirildi [137-139].

2.10.4.2. A-PFS Hidrojellerinin AB Boyama

Özellikle PF içeriğindeki polisakkarit yapıda olan GAGs yapının gösterilmesinde hidrojeller AB ile boyama yapılmıştır. Preparat iki kez DPBS ile yıkandıktan sonra % 4 paraformaldehitde ile tespit edildi. Tespit edilen kesitler önce 3 defa 5'er dk. DPBS ile; sonra da çeşme suyu ile 5 dakika yıkandı. Kesitler ardından 15-20 dk. %1'lik AB boyasında bekletildi. Kesitlerdeki tüm boya kalıntısı uzaklaştırılana kadar DPBS ile yıkandıktan sonra kesitler musluk suyuna alındı. Bir dakika Harris Hematoksilen ile boyanan kesitler, tekrar musluk suyunda yıkandı. Dereceli alkol serisinden geçirilerek

dehidre edilen kesitler, ksilen ile şeffaflaştırıldı ve entellan kullanılarak kapatıldı [137-139].

2.10.4.3. A-PFS Hidrojeli MT Boyama

Kolajen fibriller içeren PFS'nin Aljinat içindeki dağılımını gözlemleyebilmek için hidrojel örnekleri MT boyası ile boyanmıştır. MT bağ ve destek dokularındaki, kolajenin ve hücreler arası keratin fibrillerinin görüntülenmesi için kullanılmaktadır. Hazırlanan kesitler parafinden arındırıldıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirilir. Ardından sıralı olarak H&E, Asit alkol, Fosfomolibdik asit, Anilin blue ve Asetik asit solüsyonlarından bekletilerek ve yıkama işlemleri ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Daha sonra artan alkol serilerinden geçirilerek ksilende bekletilip ve entellen ile kapama işlemi yapılmıştır. Kesitlerde kollajen mavi renkte, çekirdek siyah/mavi renkte, elastin kırmızı/pembe rengine boyanmaktadır [137-139].

2.10.4.4. A-PFS Hidrojeli AR Boyama

A-PFS hidrojellerine ekimi yapılan MC3T-3 fare osteoblast hücrelerinin osteositlere farklılaşması sonucunda oluşan kalsiyum, AR boyaması ile gözlenmiştir. Bu amaçla MC3T-3 osteoblast hücresi ekilmiş A, A-150mg PFS, A-PFS (1:1) hidrojelleri osteojenik farklılaşma ortamı içeren Alfa-Mem besi yerinde kültüre edilmiş ve kültürün 7., 14. ve 21. günlerde hücrelerinde %4'lük paraformaldehit ile fiske edilmiştir. Hücrelerin fiksasyon işleminden sonra her bir hidrojel üzerine 1 mL Alizarin Red boyası eklenerek 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kalsiyuma bağlanmayan Alizarin Red boyası 2 kez DPBS ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra artan alkol serilerinden geçirilerek ksilende bekletilip ve entellen ile kapama işlemi yapılmıştır.

2.11. A-PFS Hidrojellerinin Raman Analizi

PFS karakterizasyonu için raman spektrumu analizinde PFS'nin hem sıvı hem de dondurarak kurutulan PFS kullanılmıştır. A-PFS karakterizasyonu için A-PFS hidrojelleri raman spektrumları (785nm, 60mW) Witec Alpha 300 M+ konfokal Raman spektrometresi ile ölçülmüştür.

2.12. A-PFS Hidrojellerinin Morfolojik Analizi

Hidrojel gruplarında hücre kültürü yapılmadan önce, Aljinat çözeltisine değişen oranlarda PFS eklenerek üretilen hidrojeller liyofilizatörde dondurarak kurutuduktan sonra hidrojel örnekleri ince bir altın tabakası ile kaplanarak SEM ile morfolojileri incelenmiştir.

A, A-150mg PFS ve A-PFS (1:1) hidrojellerinde kültüre edilen MC3T-3 osteoblast hücrelerinin morfolojileri SEM ile analiz edilmiştir. Hücre kültürünün 3., 7. ve 14. ve 21. günlerinde DPBS ile yıkanan hidrojel yapılar % 2.5'lik (v/v) DPBS içerisinde hazırlanmış glutaraldehit ile 30 dk süresince (fikse) sabitlenmiştir. Ardından DPBS içerisinde 5 dk bekletilerek hidrojel yapılarındaki suyun uzaklaştırılması için çeşitli etanol serilerinden (% 30, 50, 70, 90 ve 100) geçirildi. Bu işlemler sonrası örnekler, heksametildisilazan içerisinde 5 dk bekletilerek havada kurutulmuştur. SEM analizi öncesi örnekler ince bir altın tabakası ile kaplanarak görüntüleri alınmıştır.

2.13. A-PFS Hidrojellerinin İstatistiksel Analizi

İstatistik analizi SPSS programı (v.21.0; IBM) ile üçlü tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Tüm testler için anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi. Gruplar arası farklılığın karşılaştırılmasında parametrik analiz tekniklerinden bağımsız örneklem için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Analizler sonucunda gruplar arası anlamlı farklılığın belirlenmesi için farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için bağımsız örneklem t-testi yapılmıştır.

3. BÖLÜM

BULGULAR

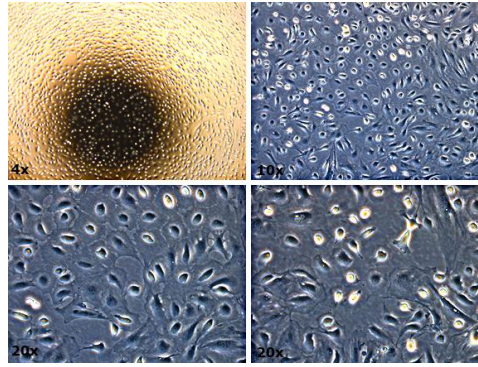
Tez çalışmasının **ilk bölümü**; PFS'nin PCL membranlarının yüzey kaplamasında kullanıldığı işlem adımlarından oluşmaktadır. PFS ile birlikte, FBS ve Med yüzey kaplama için kullanılmıştır. Yüzey kaplama işleminin etkisinin belirlenmesi için kontrol olarak yüzey kaplaması yapılmayan PCL membranları kullanılmıştır. PCL membranlarında hücre kültürünün 1, 3, ve 5. günlerinde SEM ve hücre canlılık testi analizleri yapılmıştır.

İkinci bölümü; PFS'nin karakterizasyonunun yapıldığı kısımdır. Ayrıca, dondurarak kurutma işleminin PFS'nin yapısında değişik oluşturup oluşturmadığı analiz edilmiştir. PFS karakterizasyonunda histolojik boyama, SEM ve Raman spektroskopu analizleri kullanılmıştır.

Üçüncü bölümü; PFS'nin Aljinat ile birlikte hidrojel üretiminde kullanıldığı bu bölümde öncelikli olarak PFS değişen konsantrasyonlarda (50, 100, 150mg PFS) % 3'lük (w/v) karıştırılarak en iyi hidrojel yapının 150mg PFS eklenen grup olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, PFS eklenerek elde edilen hidrojellerde MC3T-3 fare osteoblast hücreleri 21 gün boyunca kültüre edilerek analiz sonuçları aşağıda verilmiştir.

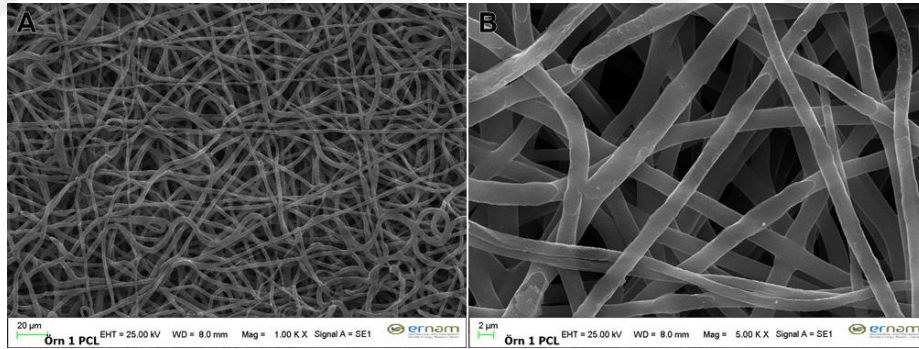
3.1. PFS, Med ve FBS ile Yüzey Kaplaması Yapılmış PCL Membranlarına PFC Hücrelerinin in-vitro Kültürü Bulguları

Hücre canlılığı ve çoğalması açısından değerlendirildiğinde perikardiyal sıvı hücreleri için en iyi besi yerinin Alfa-Mem (Med) besi yeri olduğu çalışma grubumuz tarafından ortaya konmuştur. PFC hücrelerinin petri kablarındaki iki boyutlu (2B) kültürünün 24 saat sonraki ışık mikroskopu görüntüleri Şekil 16'da görülmektedir [132,133].



Şekil 16. Perikardiyal sıvı hücreleri (PFC) ışık mikroskobu görüntüleri (4x, 10x ve 20x büyütme)

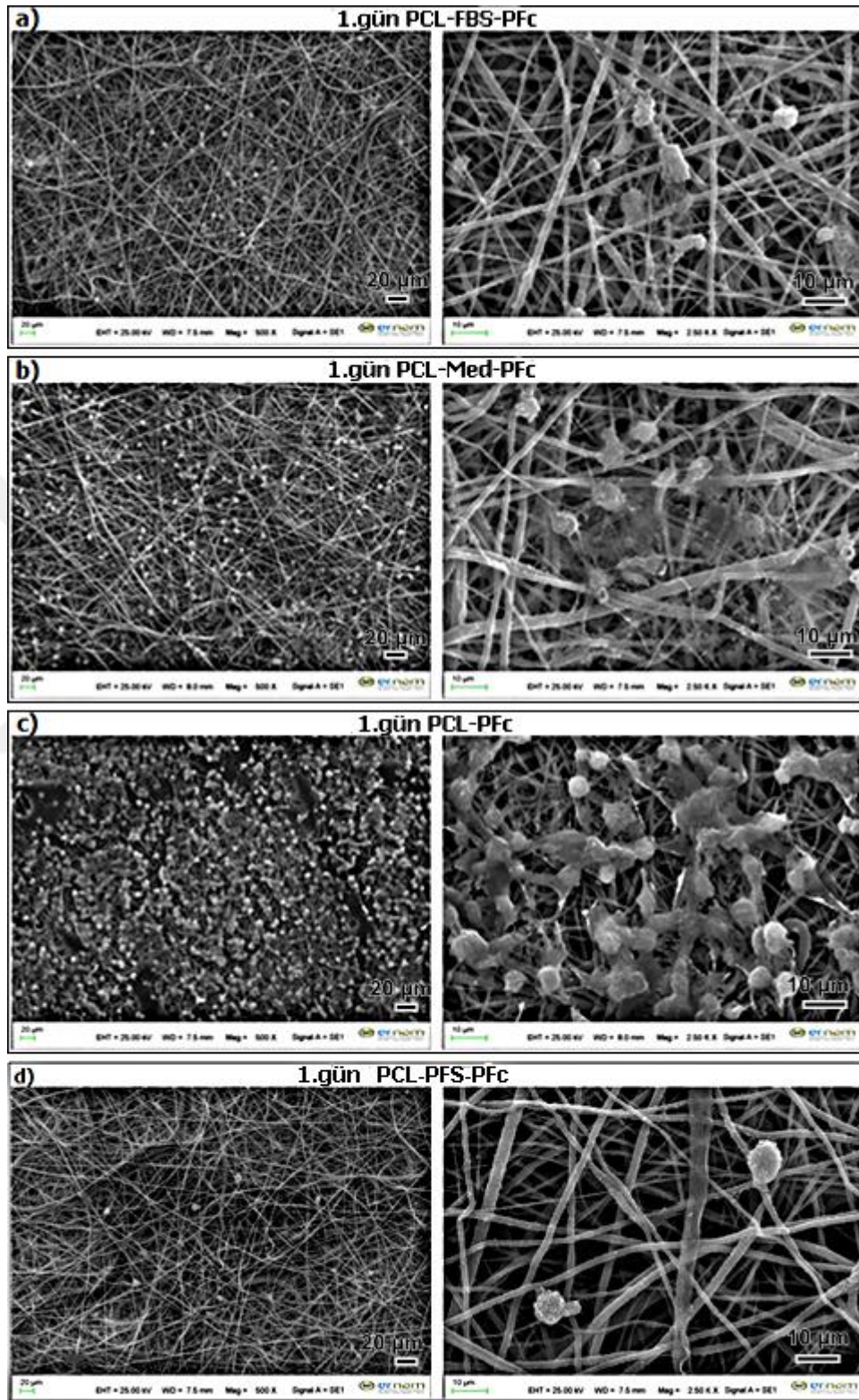
Elektro-eğirme yöntemiyle üretilmiş olan PCL membranlarına perikardiyal sıvıdan izole edilmiş olan PFC hücrelerinin kültürü yapılmıştır. PCL polimeri hidrofobik özellikte olmasından dolayı hücre tutunumunun sağlanması için yüzey kaplama işlemleri yapılmıştır. Yüzey kaplama işlemi için FBS, Med ve PFS kullanılmıştır. Kontrol olarak da yüzey kaplaması yapılmamış olan PCL membran kullanılmıştır. Şekil 17’de PCL membranlarının SEM görüntüleri görülmektedir



Şekil 17. PCL membranı SEM görüntüsü (A;1.00 Kx ve B;5.00 Kx büyütme)

3.2. PCL Membranlarında Kültürü Yapılan PFC Hücrelerinin Morfolojik Analizi

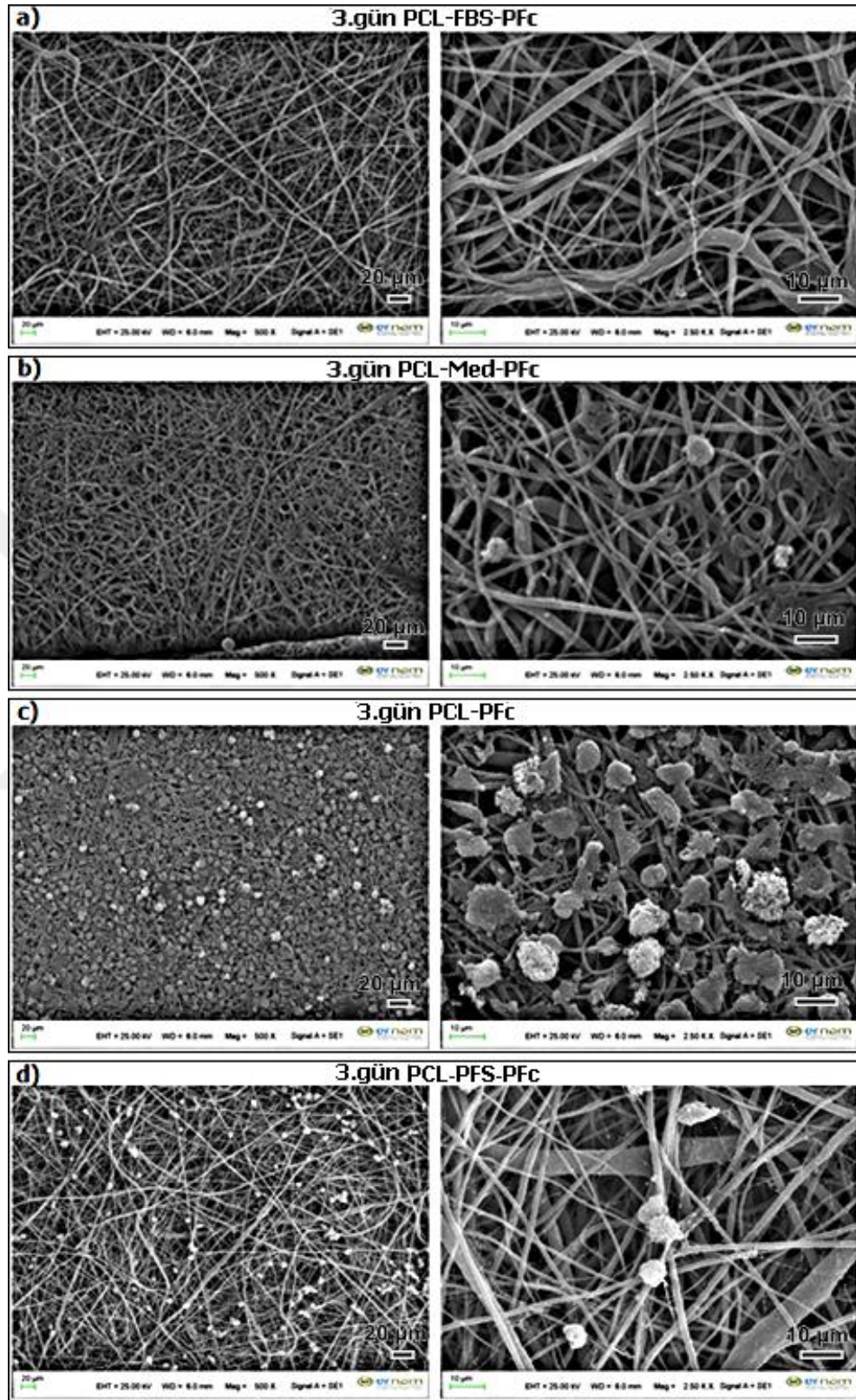
Şekil 18’de FBS, Med ve PFS ile yüzey kaplaması yapılmış olan PCL membranı ve kaplama yapılmamış olan PCL membranlarının hücre ekimi yapıldıktan 24 saat sonraki (1. gün) SEM görüntüleri görülmektedir. 1. günde yüzey kaplama yapılmamış olan PCL membranı dışında tüm kaplama yapılmış olan PCL membranlarına hücrelerin tutunduğu görülmektedir.



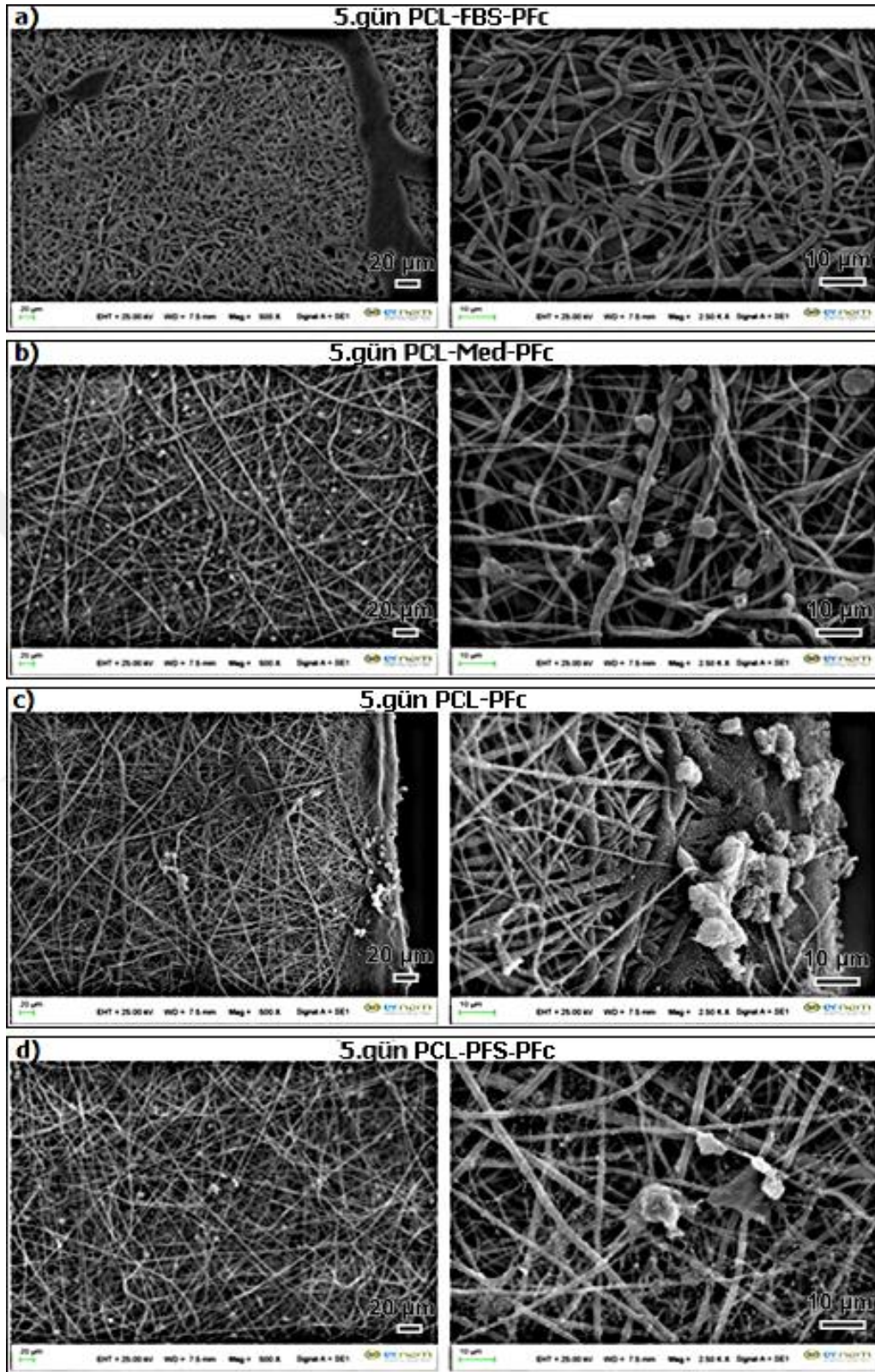
Şekil 18. FBS, Med, PFS ve kaplama yapılmamış olan PCL membranlara PFC hücreleri ekiminden **24 saat sonraki** 500x ve 2500x deki SEM görüntüleri.(a) FBS ile kaplanmış (b) Med ile kaplanmış (c) kaplama yapılmamış (d) PFS ile kaplanmış PCL membran.

Şekil 19 ve Şekil 20’de FBS, Med, PFS ile kaplanmış PCL membranları ve kaplama yapılmamış olan PCL mebranlarının 3. ve 5. günlere ait SEM görüntüleri görülmektedir. Üçüncü ve beşinci günlerde PFS ile yüzey kaplaması yapılmış olan membranlara hücre tutunumu görülmesine rağmen FBS ve medium ile kaplanmış olanlarda hücre sayısında azalma görülmektedir. PFS ile kaplanmış olan PCL membranlarının 1., 3. ve 5. günlerde hücre tutunumu ve hücre sayısının diğer membranlara göre daha iyi olduğu görülmektedir. PFS ile kaplanmış olan PCL membranlarında hücre sayısında artış olmakla birlikte hücre canlılığı da korunmuştur.

PCL membranlarına hücre ekimi yapıldıktan sonra 1., 3., ve 5. günlerdeki hücre tutunumunun SEM görüntülerine göre yüzey kaplama işlemi yapılmış ve hiç kaplama yapılmamış olanlar arasında belirgin bir farklılık görülmemektedir. Bununla birlikte PFS ile kaplanmış olan PCL skafoldlarda 5. güne kadar hücre proliferasyonu ve canlılığı korunduğu ve uzun süreli kültür çalışmalarında daha başarılı olduğu sonucuna varılmıştır.



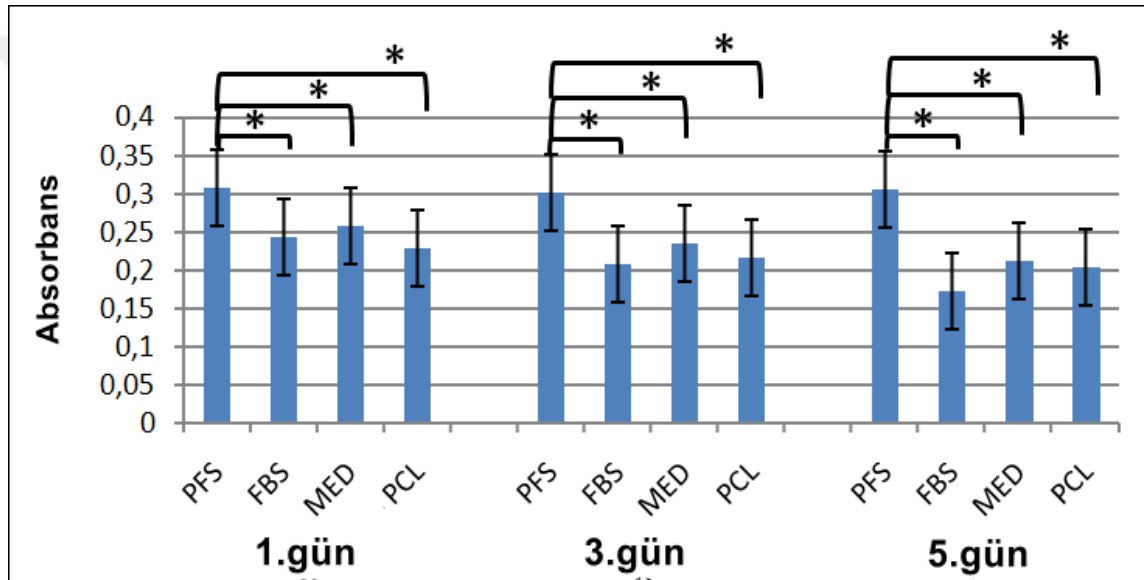
Şekil 19. FBS, Med, PFS ve kaplama yapılmamış olan PCL skafoldlara PFC hücreleri ekiminden **3. gün (72 saat)** sonraki 500x ve 2500x deki SEM görüntüleri.(a) FBS ile kaplanmış (b) Med ile kaplanmış (c) kaplama yapılmamış (d) PFS ile kaplanmış PCL membranı



Şekil 20. FBS, Med, PF ve kaplama yapılmamış olan PCL skafoldlara PFc hücreleri ekiminden **5. gün (120 saat) sonraki** 500x and 2500x deki SEM görüntüleri. (a) FBS ile kaplanmış (b) Med ile kaplanmış (c) kaplama yapılmamış (d) PFS ile kaplanmış PCL mebranı

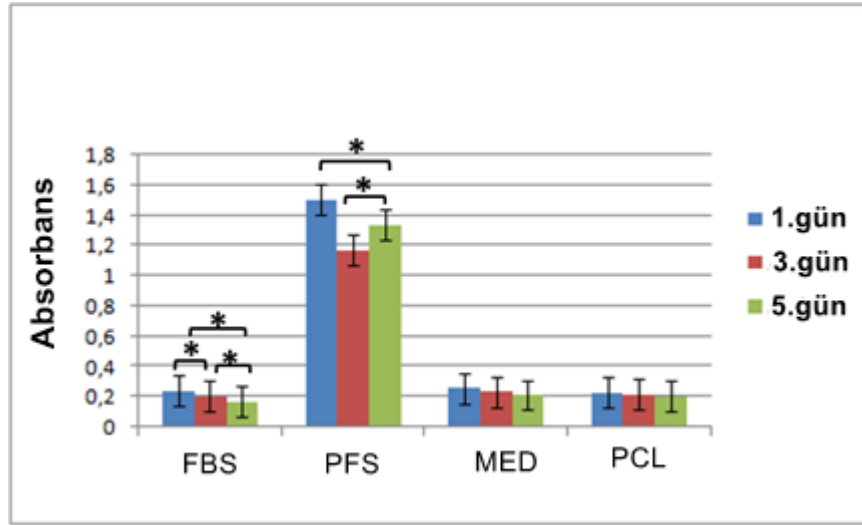
3.3. PCL Membranlarında Hücre Canlılığı Analizi Bulguları

Gruplar arası farklılığın karşılaştırılmasında Anova metodu kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. FBS ve Med ile kaplaması yapılan PCL membranları ve kaplama yapılmamış olan PCL membranlarında hücre kültürünün 1, 3 ve 5. günlerinde istatistiki olarak anlamlı bir farklılık ($p > 0.05$) görülmemiştir. FBS ile kaplaması yapılmış olan PCL membranlarında hücre kültürünün 1, 3, ve 5. günlerinin hepsinde anlamlı farklılık ($p < 0.05$) olduğu belirlenmiştir. Med ve FBS ile kaplanmış PCL membranlarında hücre kültürü tüm günlerde benzerlik göstermektedir (Şekil 21).



Şekil 21. FBS, Med, PFS ile kaplanmış ve kaplama yapılmamış olan PCL membranların hücre canlılık testi grafiği. Konsantrasyon değerleri Ort. $\pm$ SD; n=6 olacak şekilde kaplama yapılan ve yapılmayan gruplar arasında Bonferroni çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilmiştir. Anlamlı farklılık değeri $p < 0.05$ olup ‘*’ ile gösterilmiştir. (Ort.: Ortalama, SD.: Standart sapma)

Şekil 22’de görüldüğü gibi PFS ile yüzey kaplaması yapılmış olan PCL membranlarındaki hücre tutunumu ve canlılığının önemli derecede artmış olduğu görülmektedir. Ayrıca, Bonferroni çoklu karşılaştırma testi sonucuna göre PFS ile kaplanmış PCL membranları ile diğer gruplar karşılaştırıldığında anlamlı farklılık olduğu ($p < 0.05$) belirlenmiştir ve hücre tutunumu ve canlılığının en fazla PFS ile kaplanmış olan PCL membranlarında olduğu gösterilmiştir.



Şekil 22. FBS, Med, PFS ile kaplanmış ve kaplama yapılmamış olan PCL membranlarında hücre canlılığı testi grafiği. 1. günden 5. güne kadar olan hücre canlılığı karşılaştırması her bir grup için Wilcoxon testi ile yapılmıştır. Anlamlı farklılık değeri $p < 0.05$ olup “*” ile gösterilmiştir. (Ort.: Ortalama, SD.: Standart sapma)

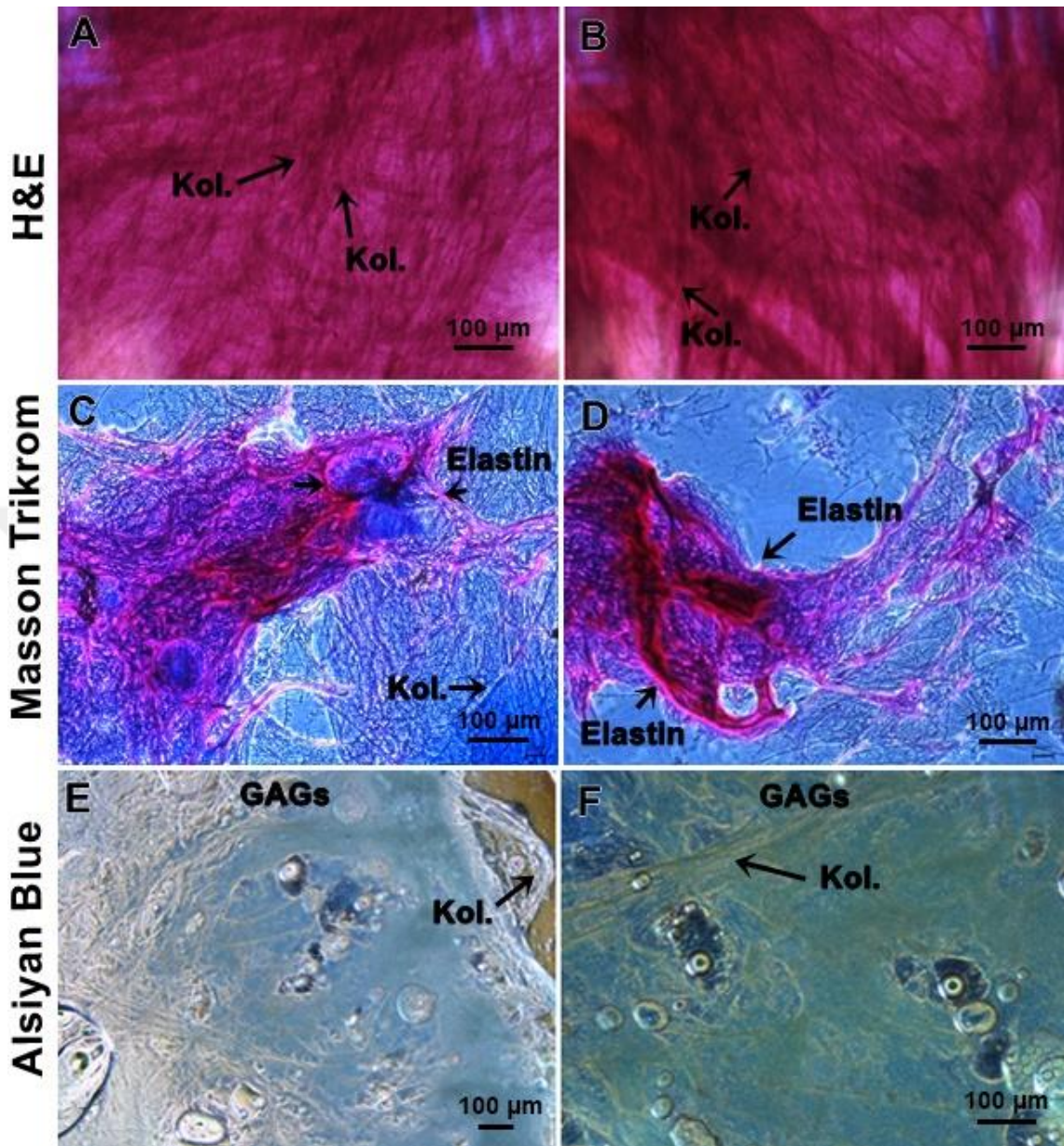
3.4. PFS’nin Karakterizasyonu Bulguları

PFS’nin karakterizasyonu için Raman spektroskopisi, SEM ve histolojik analizler kullanılmıştır.

PFS’nin hem toz halinde hem de sıvı halde kullanılabileceğini göstermek amacıyla PFS’nin hem sıvı hali hem de dondurarak kurutulmuş toz halinin Raman spektroskopu ve histolojik analizleri yapılmıştır. Histolojik boyama için PFS 48 saat boyunca inkübatörde bekletilerek jelleşmesi sağlandı. Histolojik boyamalar jel halindeki PFS ile yapılmıştır.

3.4.1. PFS Histolojik Analizi Bulguları

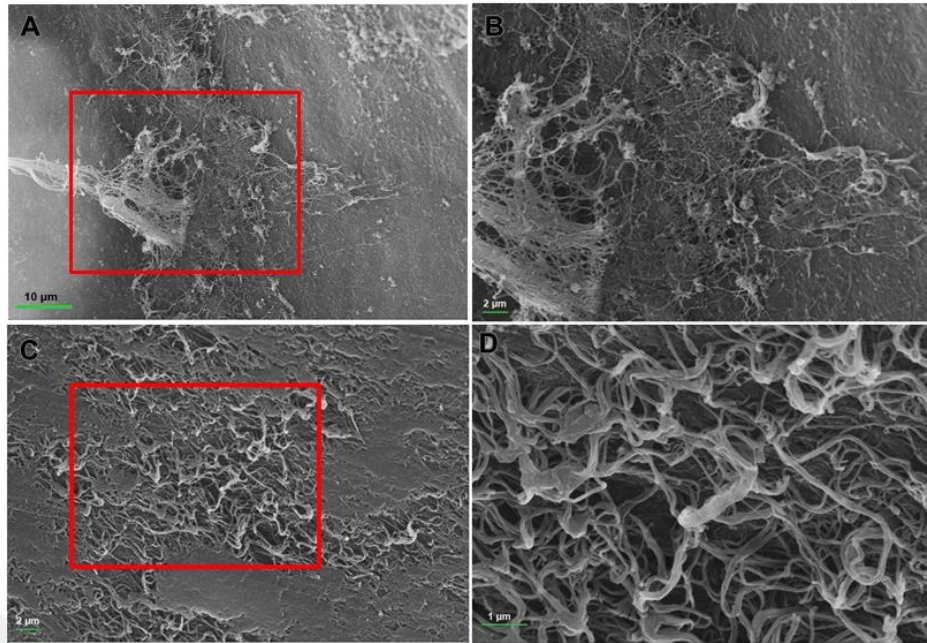
PFS jelimsi yapıya dönüştürüldükten sonra histolojik boyamalar bu jel yapı ile yapılmıştır. Şekil 23’de, PFS jel yapısını H&E ile boyama sonucunda PFS’den hücrelerin tamamen uzaklaştırıldığı ve tüm görüntü alanının pembeye boyandığı görülmektedir. Ayrıca, PFS içeriğindeki kolajen fiber ağı H&E boyama ile net bir şekilde görülmektedir. PFS jel yapısını MT ile boyama sonucunda mavi kısımların kolajen, kırmızı boyanan kısımların da elastin proteini olduğu görülmektedir. PFS içeriğindeki GAGs bileşenlerinin belirlenmesi için AB boyaması yapılmıştır ve Şekil 23’de kolajen fiber ağı içine dağılmış yeşil renkli GAGs yapısı görülmektedir.



Şekil 23. PFS histolojik boyama görüntüleri. (A-B) Masson Trikrom boyama; kolajen (Kol.), mavi; elastin, pembe), (C-D) Hematoksilen-Eozin (H&E) ve (E-F) Alsiyan Blue, Glikozaminoglikanlar (GAGs), yeşil. Objektif büyötmeleri; A-D and F 10x, and E 4x.

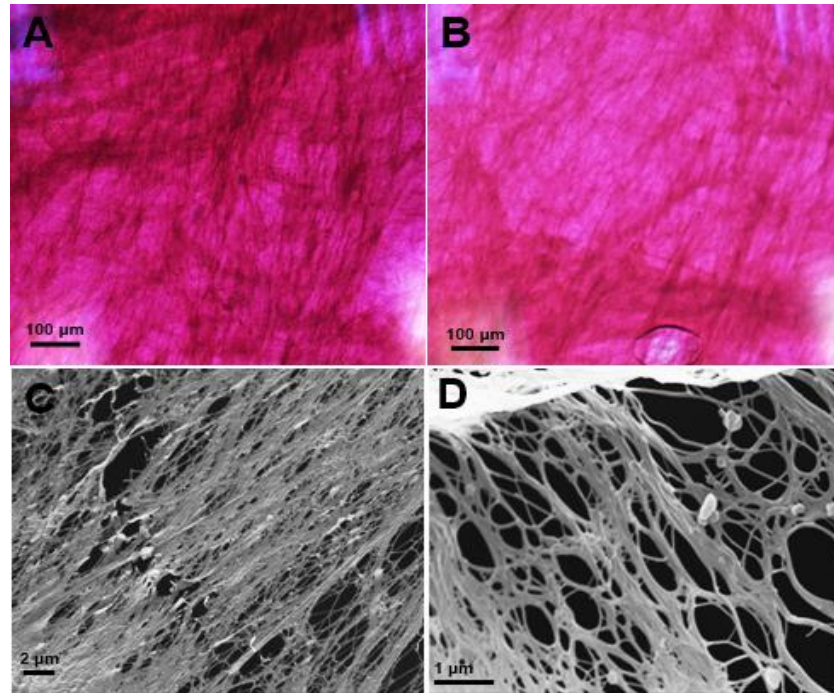
3.4.2. PFS SEM Analizi Bulguları

PFS içeriğindeki kolajen protein ağı SEM ile görüntöleme sonucu görölmektedir. Şekil 24’de yer alan A ve B görüntülerinde kolajen fiber ağı daha ince demetler halindeyken, C ve D’deki görüntülerde daha kalın bir kolajen fiber ağı görölmektedir.



Şekil 24. PFS'nin SEM görüntüleri (A-D). Kolajen ince fiber ağları görülmektedir. A ve B; 5.00 KX, C; 2.50 KX, ve D 20.00 KX.

Kolajen fiber ağının bir başka SEM fotoğrafı Şekil 25'de H&E boyama sonucu elde edilen görüntü ile birlikte gösterilmiştir. Şekil 25 C'de bu kolajen ağ örgüsü birbirine paralel uzantılar şeklinde görülürken, Şekil 25 D'de fiber yapılar daha belirgin bir ağ örgüsü şeklinde görülmektedir.



Şekil 25. PFS'de bulunan kolajen fiber yapısının görüldüğü SEM ve H&E boyama görüntüleri. A ve B, H&E boyama, 10x büyütme; C ve D, SEM görüntüleri; C; 5.00 KX, ve D 20.00 KX.

3.4.3. PFS Raman Analizi Bulguları

PFS karakterizasyonu için kullanılan Raman spektroskopisi sonuçları ile spesifik moleküllere ait literatürde belirlenen spektrumların Tablo 1’de verilmiştir. PFS’den elde edilen Raman spektrumlarının olduğu grafik ise Şekil 26’da görülmektedir. Dondurarak kurutulmuş (freeze-dried) olan PFS ve sıvı PFS Raman spektrumları incelendiğinde hem toz hem de sıvı PFS’de benzer spektrumların elde edildiği görülmektedir. Dondurarak kurutulmuş olan PFS’de spektrumların daha belirgin olduğu görülmektedir (Şekil 26).

Şekil 26 ve Tablo 2 verilerine göre sıvı ve dondurularak kurutulmuş PFS’de görülen 649, 668 değerleri literatürdeki Phe (642) spektrumuna karşılık gelmektedir. Literatürde 758 spektrumunun Trp amino asitine ve 761 heparan ve proteoglikana karşılık geldiği ve sıvı PFS’de görülen 757 spektrumunun triptofan ve heparan/proteoglikanı temsil ettiği görülmektedir [150].

Sıvı PFS’de görülen 832 spektrumu fibrinojen spektrum aralığında (829-860) iken, dondurularak kurutulan PFS’de görülen 858 spektrumu kolajen tip IV’e (856) karşılık gelmektedir [150, 153, 154]. Dondurularak kurutulmuş PFS ve sıvı PFS’de sırasıyla görülen 901 ve 937 spektrum değerleri prolin (850-975), hidroksiprolin (850-900), kolajen tip III (896, 941) ve kollajen tip I’e (937) karşılık gelmektedir [151, 153-158]. Hem sıvı PFS’de hem de dondurularak kurutulmuş PFS’de görülen 1007’lik spektrum değeri, kolajen tip IV’e (1004, 1007), proteoglikana (1007) ve Phe aminoasitine (1003, 1032, 1033) karşılık gelmektedir [150, 151, 153, 154, 158-161]. Sıvı PFS’de 1304, 1321 ve dondurularak kurutulmuş PFS’de 1325 spektrumları, kolajen proteininin (1300-1347), özellikle kollajen tip III’ün (13007, 1318) varlığını göstermektedir [151, 152, 154, 155, 157, 159]. Sıvı PFS’de görülen 1448 ve 1453 ve dondurularak kurutulmuş PFS’de 1453 spektrum değerleri kolajen (1451), kolajen tip III (1454) ve elastin (1448) proteinlerinin varlığını göstermektedir [151, 152, 157-159]. Sıvı PFS’de görülen 1659, 1780 ve dondurularak kurutulmuş PFS’de 1638, 1667 spektrum değerleri; elastin (1655, 1670), kolajen (1660, 1670), kolajen tip I (1668), kolajen tip III (1672, 1674) ve kolajen tip IV’e (1673) [151, 152, 157-159] karşılık geldiği görülmektedir. Hem sıvı PFS’de hem de dondurularak kurutulmuş PFS’de 2932 spektrum değeri kolajen tip IV’e karşılık gelmektedir. Son olarak, sıvı PFS’de ve dondurularak kurutulmuş PFS’de 3004-3817 spektrum değerleri kolajene (3200-3700, 3324) karşılık gelmektedir. Tüm spektrum

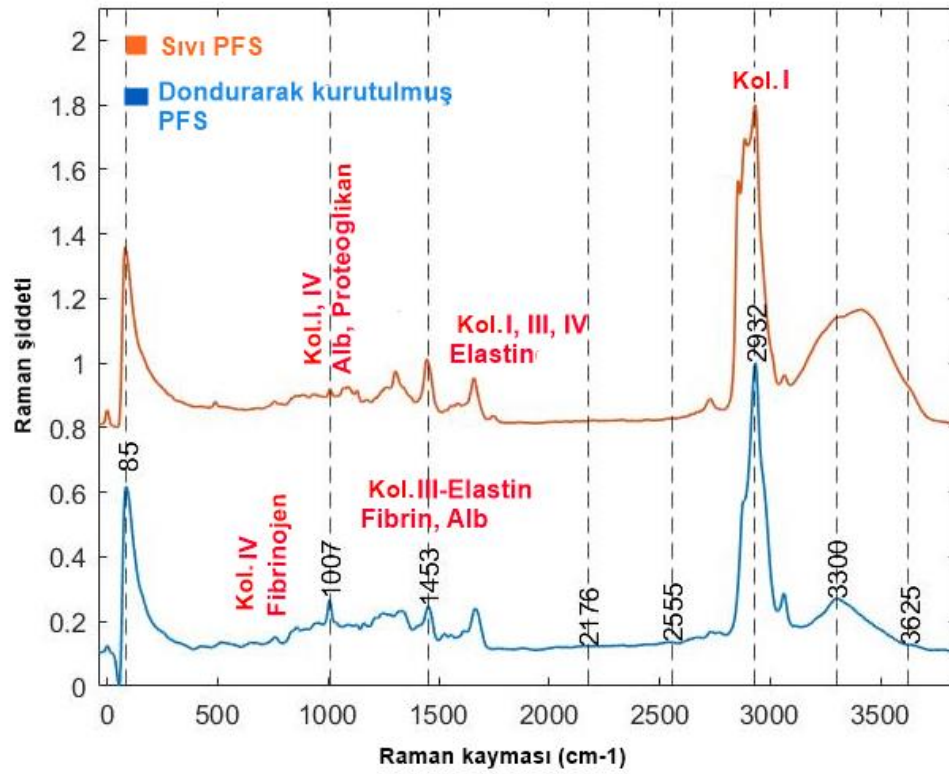
değerlerinden elde edilen sonuçlara göre (Şekil 26), PFS'de kolajen tip I, III, kolajen tip IV, elastin, fibrinogen, fibrin, albumin ve proteoglikan bulunmaktadır[158].

Tablo 1. Sıvı ve dondurarak kurutulmuş olan PFS'nin Raman spektrumları ve literatürde yer alan Raman spektrumları sonuçları

Raman spektrumları (cm ⁻¹)	Sıvı PFS	Dondurarak kurutulmuş PFS	Referanslar
-	80, 81, 85	81, 86	
-	285, 434, 490	434	
621/642- Tirozin/Penilalanin (Phe)	649, 669	649, 668	150
744,758- Triptofan (Trp) 759- Albumin (Alb) 761- Heparan, proteoglikan	757	-	150
815- Kolajen tip I ve IV 856- Kolajen tip IV	832	858	151, 152
829-860- Fibrinogen (Tirozin)	832	858	150
856,875- Kolajen tip IV 856- Prolin 875- Hidroksiprolin 879- Kolajen tip I 850-900- Hidroksiprolin	832	858	153, 154
850-975- Prolin 896- Kolajen tip III 800-980 (876)- Hidroksiprolin 854,873- Kolajen 917- Kolajen tip I 920- Prolin, Kolajen tip I, IV 934- Kolajen 937,938- Kolajen tip I, IV 938- Kolajen tip IV, Elastin 941/942- Kolajen tip I, III 967- Fibrin	937	901	151, 153-158, 161
1000- Kolajen 1004,1007- Kolajen tip I, IV 1007- Proteoglikan 1000,1001,1003,1004,1032,1033- Phe (Kolajen tip I,IV) 1003- Alb 1030-1100- Kolajen	1007	1007	150, 151, 153, 154, 156, 158-161
1209- Phe 1245-1271- Prolin (Kolajen tip I,IV) 1230-1290- Kolajen 1243- Kolajen 1246,1271- Prolin (Kolajen tip I) 1248-Fibrin, Kolajen 1299, 1302-Kolajen tip I 13007- Kolajen tip III 1318- Kolajen tip III 1336-Fibrin 1340-1342- Fibrin, Kolajen 1300-1347- Kolajen	1304, 1321	1325	151, 152, 154, 155, 157, 159, 161,162

Tablo 1. Sıvı ve dondurarak kurutulmuş olan PFS'nin Raman spektrumları ve literatürde yeralan Raman spektrumları sonuçları (devamı)

Raman spektrumları (cm ⁻¹)	Sıvı PFS	Dondurarak kurutulmuş PFS	Referanslar
1440-1460 Kolajen 1441,1443- Kolajen tip I 1451,1452- Kolajen 1454- Kolajen tip III 1447- Kolajen 1448- Elastine, Trp, Alb, Fibrin	1448, 1453	1453	151, 152, 157, 159,162
1605- Phe, Tirozin (Kolajen) 1630-1670- Kolajen 1652- Kolajen tip I 1655- Elastine, Kolajen tip I 1657 - Kolajen 1660,1670- Kolajen 1659- Amid I (C=OH) alfa heliks 1668,1669- Kolajen tip I 1670- Elastin, Kolajen 1672- Kolajen tip III 1673- Kolajen tip IV 1674- Kolajen tip I, III	1659, 1780	1638, 1667	151-154, 157- 159, 161,162
---	1860, 1880	1883	
2400- Kolajen 2900-3000- Kolajen 2932- Kolajen tip I	2932	2932	158
3200-3700- Kolajen 3324- Kolajen	3065, 3117, 3309, 3408, 3414, 3414, 3506, 3767, 3775, 3817	3004, 3062, 3306, 3358, 3595, 3636, 3640, 3778	158



Şekil 26. Dondurarak kurutulmuş ve sıvı PFS'nin Raman analizi grafiği. Kol.; Kolajen, Kol.I; tip I kolajen, Kol.III; tip III kolajen, Kol.IV; tip IV kolajen, Alb; Albumin.

3.4.4. Sıvı PFS ve Dondurarak Kurutulmuş olan PFS'nin İstatistiksel Analizi

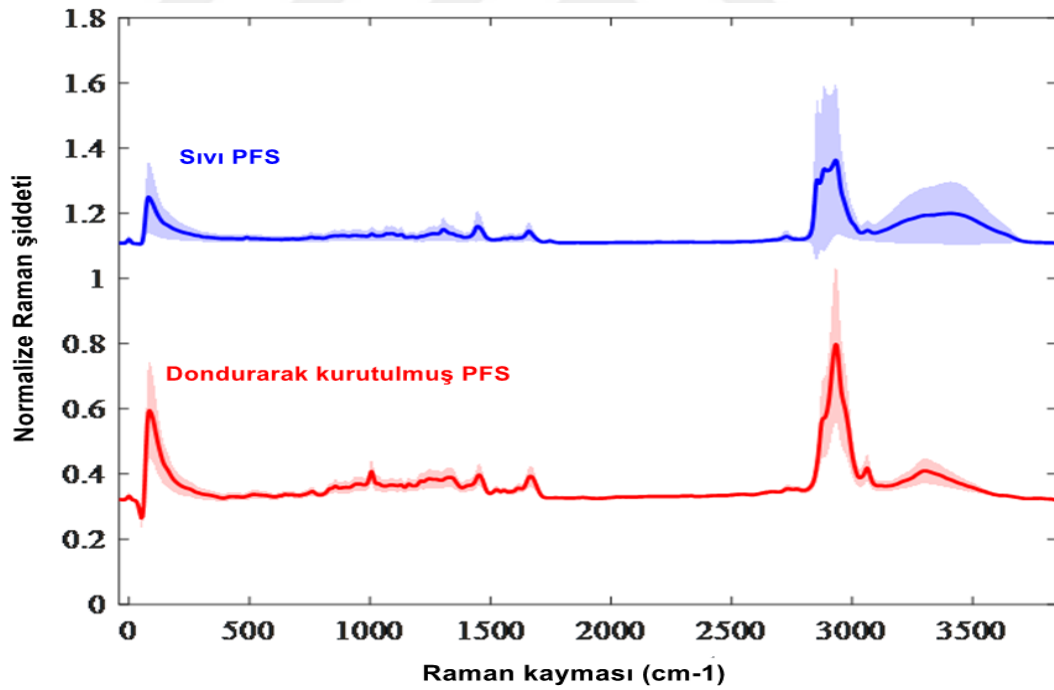
Sıvı PFS ve dondurarak kurutulmuş olan PFS'nin Raman spektrumları analizi sonucunda dondurarak kurutmanın PFS yapısında önemli bir değişiklik yapmadığı TBA analizi ile tespit edilmiştir. Tablo 2'de TBA analizi sonucu birinci temel bileşen, ikinci temel bileşen ve diğer bileşenlerin değerleri görülmektedir. Sıvı PFS ve dondurularak kurutulmuş PFS'den Raman spektrumlarını karşılaştırırken, genel veri seti ($n = 12$) için TB1 ve TB2 puan değerlerinin dağılımı, PFS ve dondurularak kurutulmuş PFS'deki spektral farklılıklarını göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre sıvı PFS spektrumları ile dondurularak kurutulmuş PFS'nin benzerliği Şekil 27'de görülmektedir.

TB1 ve TB2'nin yükleme spektrumları, ağırlıklı olarak genel spektral veri seti içinde benzer olan Raman spektrumlarını göstermektedir. TB2'de, sıvı PFS ve dondurularak kurutulmuş PFS ayırımına izin veren önemli bir puan değeri kayması tanımlanmamıştır. İki ana bileşen, sıvı PFS için TB1 ve TB2'nin sırasıyla %81,92 ve %16,19 olduğunu, dondurularak kurutulmuş PFS için TB1 ve TB2'nin toplam varyansların sırasıyla

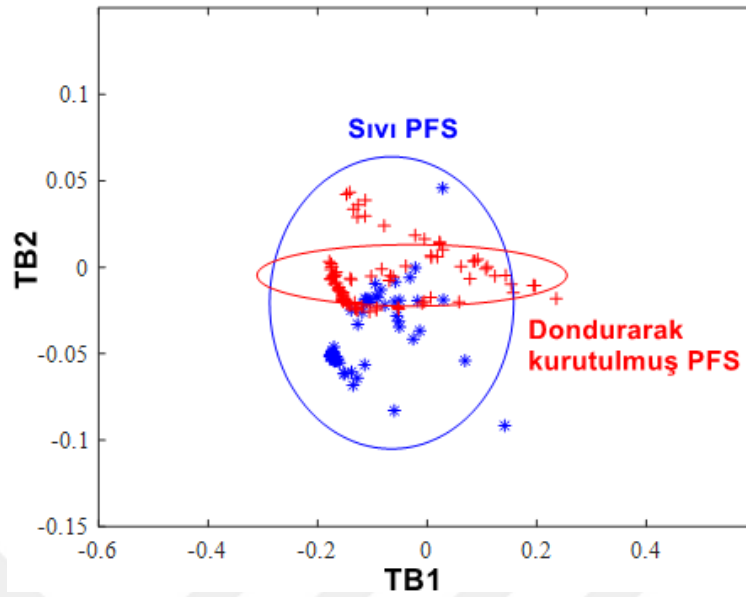
%99,14 ve %0,62'sini oluşturduğu sonucu elde edilmiştir (Tablo 2). Bu sonuçlar, PFS'nin dondurularak kurutulmasının PFS üzerinde önemli bir değişiklik yapmadığını göstermiştir. Sıvı PFS'de ve dondurularak kurutulmuş PFS'de işlenmiş spektrumlar standart sapmaları ile Şekil 27'de verilmiştir. Ortalama spektrumlar, sıvı ve dondurularak kurutulmuş PFS'de oldukça benzer olduğu Şekil 28'de görülmektedir. Standart sapmalardaki en belirgin farklılıkların, sıvı PFS'den kaynaklı olan 3000 ve 3500 cm^{-1} 'deki spektrumlardan kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 28).

Tablo 2. Raman spektrumlarının TBA ile analizi sonuçları.

TBA	% TB 1	% TB 2	Diğerleri
Sıvı PFS	81,92	16,19	1,89
Dondurarak kurutulmuş PFS	99,14	0,62	0,24



Şekil 27. Sıvı PFS ve dondurularak kurutulmuş PFS'nin ortalama Raman spektrumları. Spektrumların standart sapmaları, çoğu dalga sayısında gözlemlemek için küçük olan gölgeli bölgeler tarafından gösterildiği gibi ortalama spektrum ile birlikte verilmiştir.



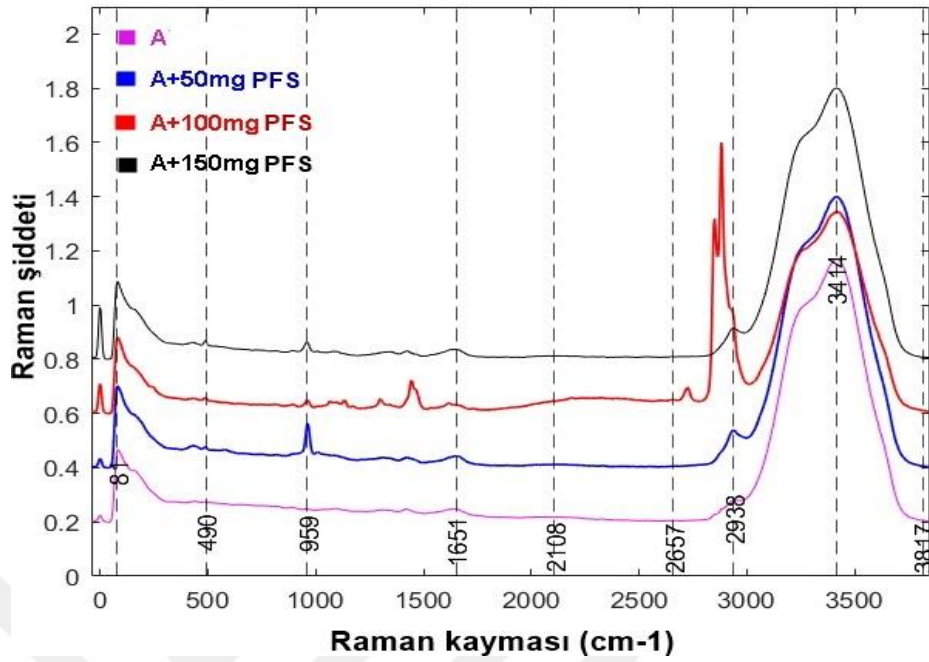
Şekil 28. PFS ve dondurularak kurutulmuş PFS'nin tekli Raman spektrumunun TBA grafiği. TB1 ve TB2 skor değerleri, dondurularak kurutulmuş PFS (kırmızı) ve sıvı PFS (mavi) arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir.

3.5. A-PFS Hidrojellerinin analizi bulguları

PFS'nin hidrojel üretiminde değişen oranlarda PFS, Aljinat ile birlikte kullanılmıştır. Bunun için A, A-50mg PFS, A-100mg PFS, A-150mg PFS ve A-PFS (1:1) şeklinde dört grup oluşturulmuştur. Gruplardan A, gruplar arası farklılığın belirlenmesi için kullanılmıştır. A-PFS (1:1) ise dondurularak kurutulmuş ve sıvı PFS'nin etkisinin karşılaştırılması için oluşturulmuştur. Belirlenen her grubun Raman spektroskopisi ve histolojik boyama analizleri yapılarak elde edilen sonuçlar aşağıda paylaşılmıştır.

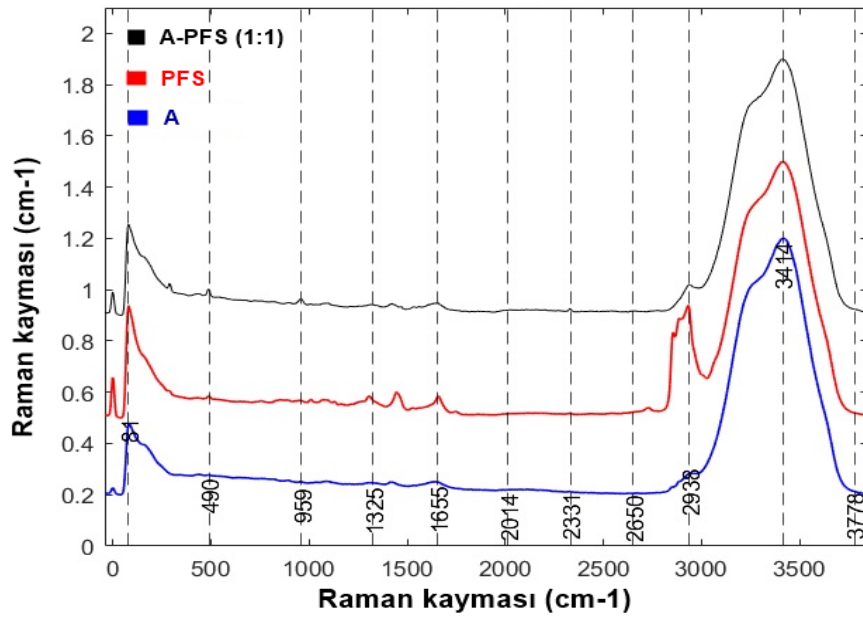
3.5.1. PFS-Alg hidrojellerinin Raman analizi bulguları

Şekil 29'de A, A-50mg PFS, A-100mg PFS ve A-150mg PFS hidrojellerinin Raman spektrumu grafiği görülmektedir. PFS ile Aljinatın homojen bir şekilde karıştığı ve artan PFS miktarına göre Raman spektrum şiddetinin arttığı görülmektedir (Şekil 29).



Şekil 29. Aljinat ve PFS ile elde edilen hidrojenlerin Raman spektrum grafiği.

Şekil 30’da A, PFS ve A-PFS (1:1) hidrojenlerinin Raman spektrumları görülmektedir. PFS’nin sıvı halinin %3’lük (w/v) A ile eşit hacimlerde (1:1) karıştırılmasıyla homojen bir karışım oluşturduğu grupların ayrı ayrı spektrumları incelenmesiyle anlaşılmaktadır.



Şekil 30. Aljinat, A-PFS (1:1) ve PFS hidrojeninin Raman spektrum grafiği.

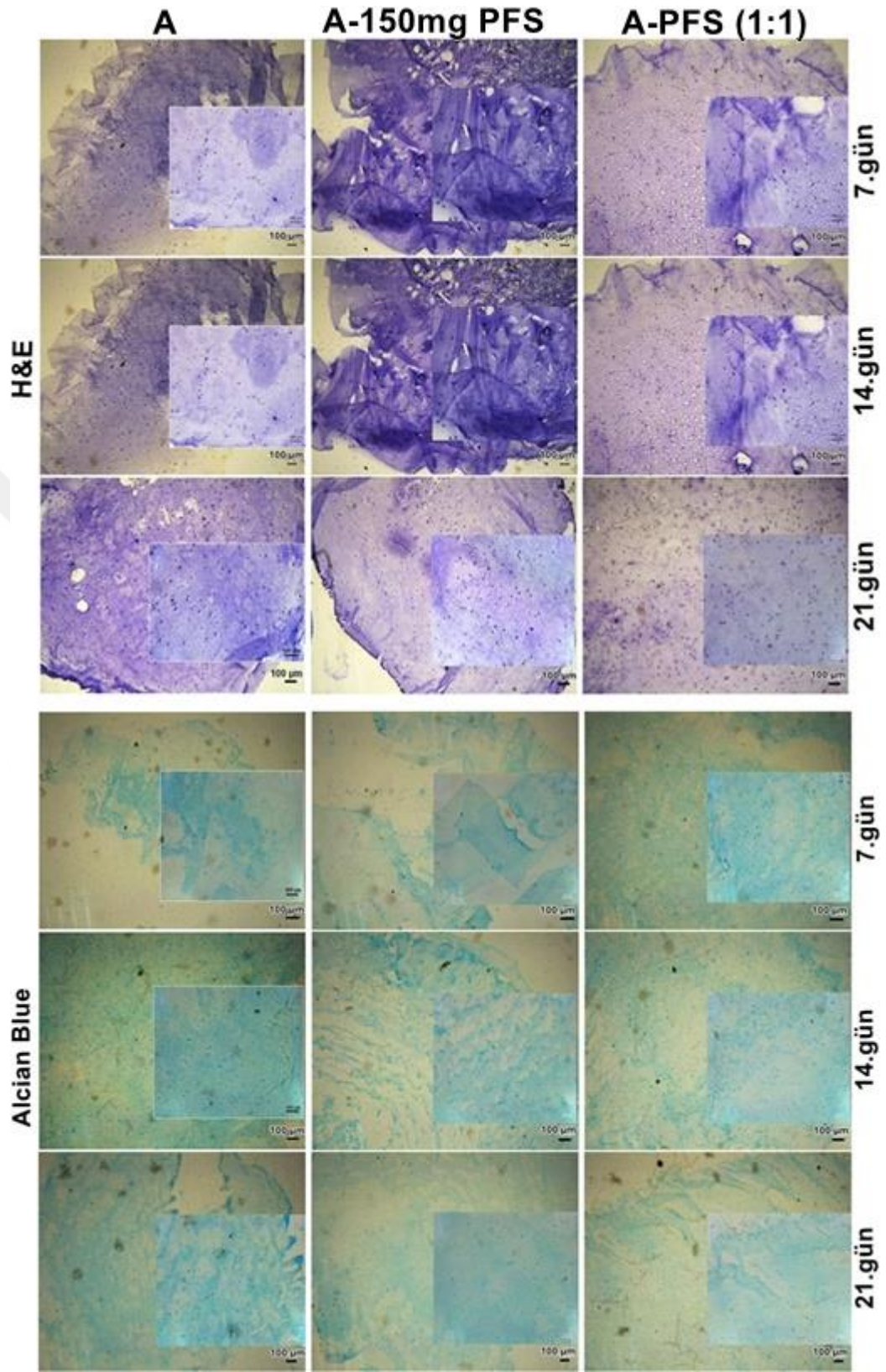
3.5.2. A-PFS Hidrojellerinin Hücre Kültürü Histolojik Analiz Bulguları

Şekil 31’de A, A-150mg PFS ve A-PFS (1:1) hidrojellerinde MC3T-3 osteoblast hücrelerinin 7., 14., ve 21. günlerdeki histolojik boyama sonrası ışık mikroskobu görüntüleri görülmektedir. H&E boyama sonucunda, hidrojel yapılarda MC3T-3 hücreleri siyah ve sitoplâzma içeriği mor renkli görülmektedir (Şekil 31). Tüm gruplarda hücrelerin hidrojel yapılarda çoğaldığı ve kültürünün başarılı bir şekilde yapıldığı görülmektedir.

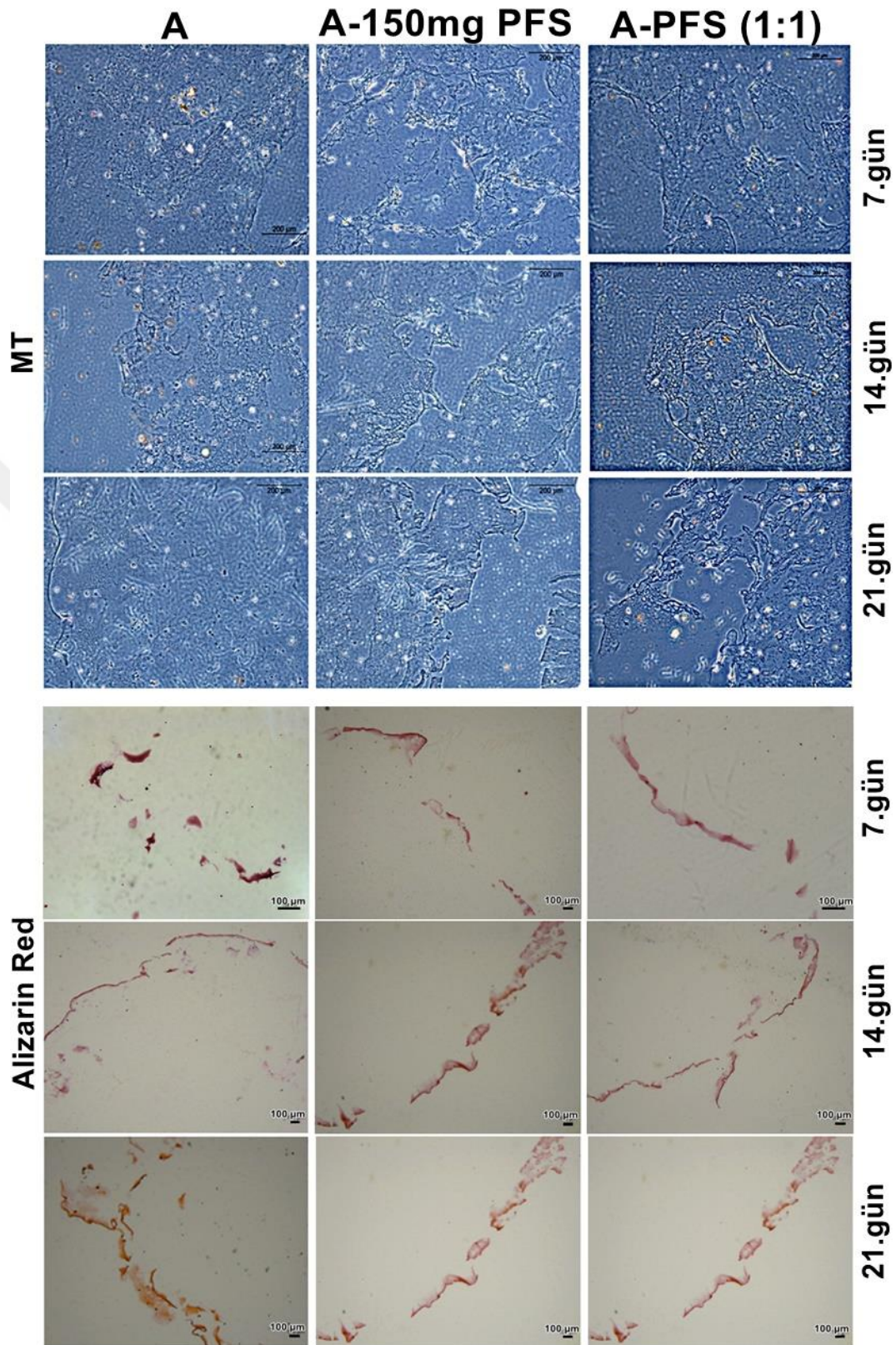
Polisakkarit yapılı GAGs bileşenlerinin gösterilmesi için AB histolojik boyaması yapılmış ve ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 31’de görülmektedir. Sadece polisakkarit bileşenleri içeren Aljinat hidrojelli AB boyamasının daha yoğun olduğu görülmektedir. PFS içeren hidrojel gruplar, Aljinat hidrojeli ile kıyaslandığında AB boyamanın daha az yoğunlukta boyandığı görülmektedir.

PFS’de bulunan kolajen proteinin gösterilmesi için MT boyama yapılmış ve ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 32’de görülmektedir. Histolojik boyama sonucunda aljinat ile PFS’nin homojen olarak karışmış olduğu ve MT boyama ile kolajen fiber ağları tüm hidrojel yapılarında görülmektedir.

MC3T-3 osteoblast hücrelerinin hidrojel gruplarında kültürünün yapılmasında hücrelerin farklılaşarak kemik dokuyu oluşturmalarının incelenmesi için AR histolojik boyaması yapılmıştır. Kültürün 7. gününde kemik dokunun oluşmaya başladığı ve 21.günde her bir hidrojel grup için kemik doku oluşumunun arttığı Şekil 32’de görülmektedir.



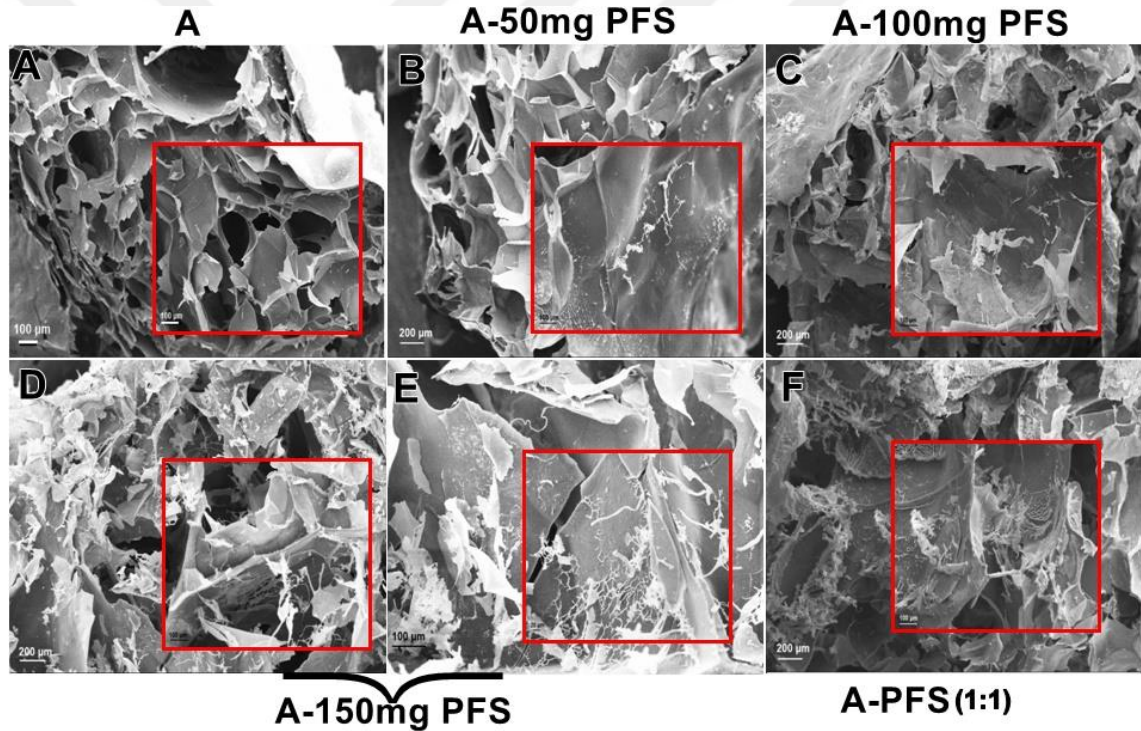
Şekil 31. A-PFS hidrojellerinde MC3T-3 hücrelerinin 7., 14. ve 21. günlerdeki, H&E ve Alcian blue histolojik boyama görüntüleri.



Şekil 32. A-PFS hidrojelinde MC3T-3 hücrelerinin 7., 14. ve 21. günlerdeki, MT ve Alizarin red histolojik boyama görüntüleri.

3.5.3. A-PFS Hidrojellerinin SEM Analizi Bulguları

Aljinat ile hazırlanan PFS hidrojjelerinde miktar belirlenmesi amacıyla artan miktarlarda PFS (50, 100, 150mg) eklenerek hidrojjeler üretilmiştir. Ayrıca, Aljinat ile PFS'nin eşit hacimde (1:1) olacak şekilde hazırlanan A-PFS (1:1) hidrojjelerinin dondurarak kurutulduktan sonraki SEM görüntüleri Şekil 33'de verilmiştir. Sadece Aljinat ile hazırlanan hidrojel ile PFS eklenen hidrojel grupları karşılaştırıldığında PFS'nin Aljinat ile homojen olacak şekilde karışım oluşturduğu görülmektedir. A-50mg PFS ve A-100mg PFS hidrojel gruplarında PFS dağılımının miktardan kaynaklı olarak daha az olduğu görülmektedir. A-150mg PFS ve A-PFS (1:1) hidrojjelerinde ise PFS dağılımının daha iyi olduğu SEM görüntüleri ile görülmektedir.

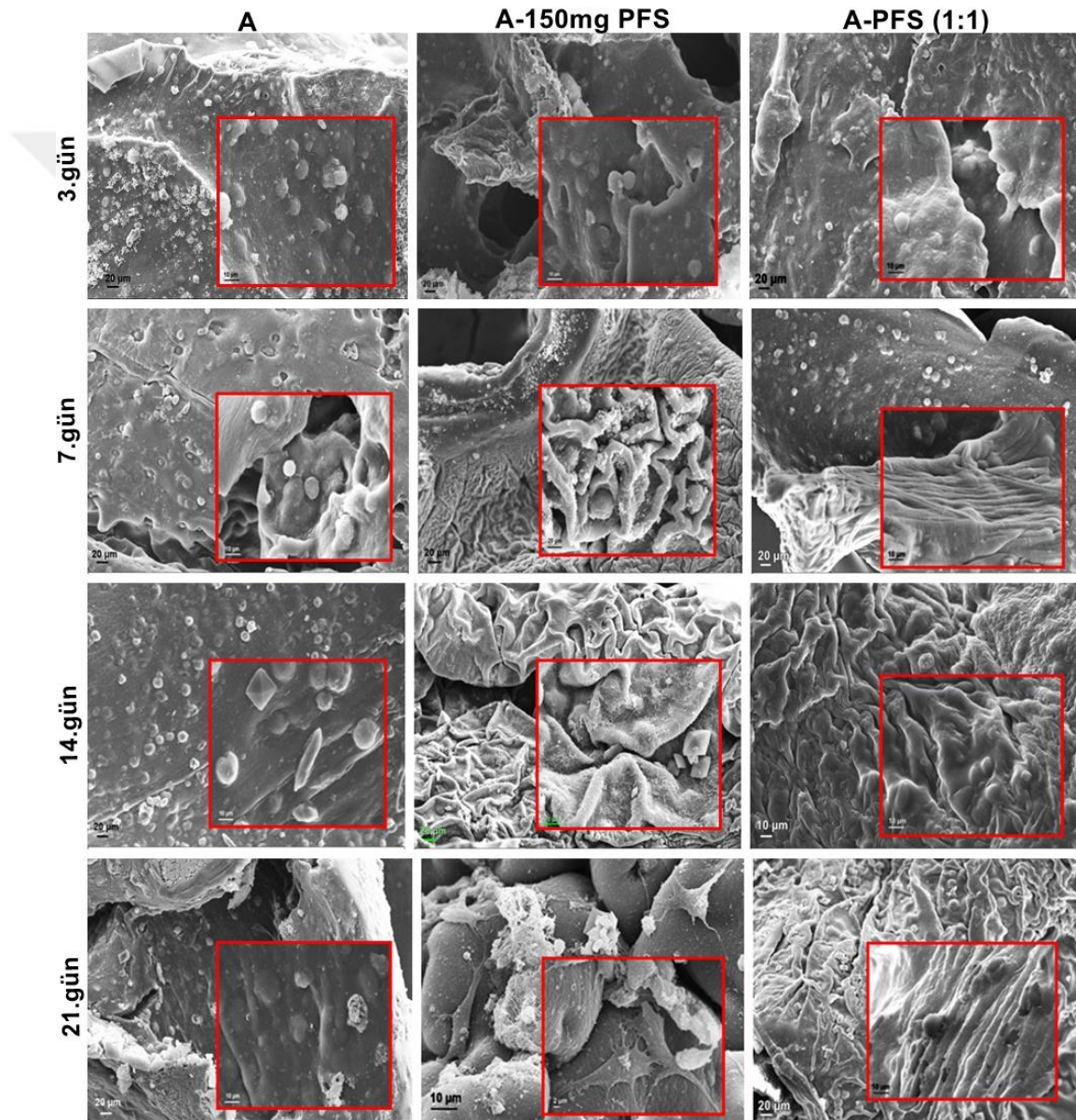


Şekil 33. Aljinat ve artan oranlarda PFS eklenerek oluşturulan hidrojel yapıların SEM görüntüleri. A; Sadece Aljinat (A) içeren hidrojel yapının görüntüsü, B; A-50mg PFS'den oluşan hidrojel yapının görüntüsü, C; A-100mg PFS'den oluşan hidrojel yapının görüntüsü, D ve E; A-150mg PFS'den oluşan hidrojel yapının görüntüsü, F; A-PFS (1:1) hidrojel yapının SEM görüntüsü. A, B, C, D ve F'de mikroskop büyütmesi 100Kx ve 250Kx; E'de 250Kx ve 500Kx dir.

3.5.3.1. A-PFS Hidrojelleri ile Hücre Kültürü SEM Analizi Bulguları

Aljinat ile hazırlanan PFS hidrojjelerinden PFS'nin homojen dağılımından dolayı A-150mg PFS ve A-PFS (1:1) hidrojjelerinde MC3T-3 hücrelerinin 21 gün boyunca in-vitro kültürü yapılarak kültürün 3., 7., 14. ve 21. günlerdeki SEM görüntüleri Şekil

34'de verilmiştir. Aljinat ile karıştırılan PFS'nin etkisini göstermek için kontrol olarak Aljinat hidrojel kullanılmıştır. A, A-150mg PFS ve A-PFS (1:1) olmak üzere 3 gruptan oluşan hidrojellerinde MC3T-3 hücrelerinin SEM görüntüleri fotoğrafları görülmektedir (Şekil 34). PFS eklenen hidrojel gruplarında hücrelerin PFS içeriğindeki protein yapıların olduğu bölgelerde tutunumu ve farklılaşmasının daha iyi olduğu görülmektedir. Özellikle, A-150mg PFS hidrojelinde 21.günde hücrelerin farklılaştığı açık bir şekilde görülmektedir.



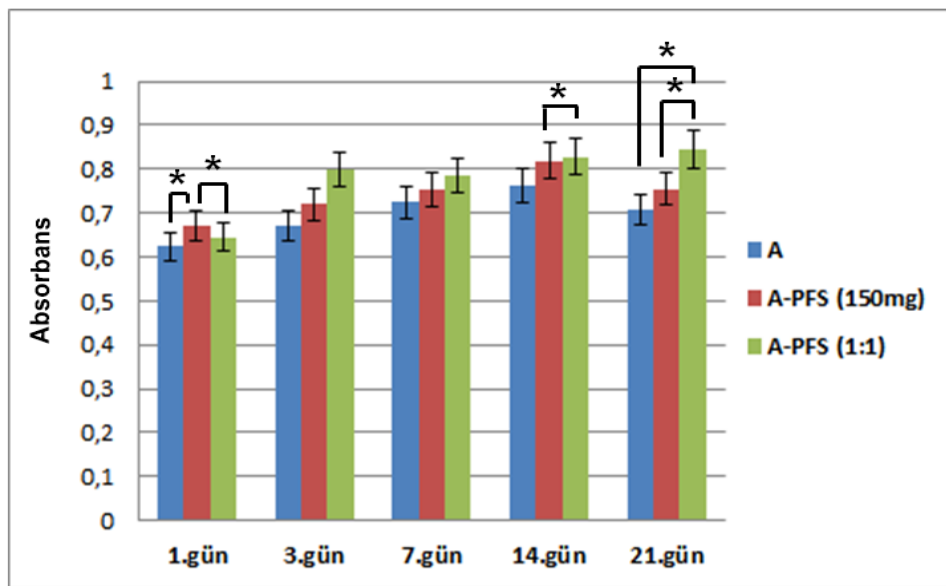
Şekil 34. A, A-150mg PFS ve A-PFS (1:1) hidrojelleri ve bu hidrojellerde kültüre edilen MC3T-3 hücrelerin 3., 7., 14. ve 21. günlerdeki SEM görüntüleri. Tüm görüntülerde büyütme 500Kx ve 2.50Kx şeklinde iken, 21. günde A-150mg PFS büyütme 2.50Kx ve 5.00Kx'dir.

3.5.3.2. A-PFS Hidrojellerinde Hücre Canlılık Testi Bulguları

A, A-150mg PFS ve A-PFS (1:1) hidrojel gruplarında MC3T-3 hücrelerinin 1., 3., 7., 14. ve 21. günlerdeki hücre canlılığında anlamlı farklılığın karşılaştırılmasında tek yönlü Anova metodu kullanılmıştır. Grupların kendi içinde karşılaştırılmasında ise bağımsız örneklem t-testi kullanılmıştır.

Tek yönlü Anova istatistiği sonucuna göre tüm gruplar arasında anlamlı farklılığın sadece 1. ve 21. günlerde olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Böylece, 3., 7. ve 14. günlerde gruplar arasında anlamlı bir farklılık ($p > 0.05$) elde edilmemiştir.

Grupların kendi arasında karşılaştırıldığında anlamlı farklılığın belirlenmesi için bağımsız örneklem t-testi sonuçlarına göre 1. gün A ile A-PFS (1:1) ve A-150mg PFS ile A-PFS (1:1) arasında anlamlı farklılık ($p < 0.05$) elde edilmiştir. 3. ve 7. günlerde herhangi bir anlamlı farklılık görülmemiştir. 14.günde sadece A-150mg ile A-PFS (1:1) arasında anlamlı farklılık elde edilmiştir. Kültürün son günü olan 21. günde; A ile A-PFS (1:1) ve A-150mg ile A-PFS (1:1) grupları arasında anlamlı farklılık elde edilmiştir. Şekil 35’de üç hidrojel gruplarında 21 gün boyunca kültürü yapılan MC3T-3 hücrelerinin hücre canlılığı tüm günlerde A hidrojelinde daha az iken PFS içeren hidrojel gruplarında hücre canlılığının daha yüksek olduğu görülmektedir. Hücre kültürünün başlangıcı olan 1. günde hidrojel gruplarındaki hücre canlılığı çok yakın gibi görünse de istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (Şekil 35).



Şekil 35. A-PFS hidrojellerinde MC3T-3 hücrelerinin 1., 3., 7., 14. ve 21.günlerdeki hücre canlılığı grafiği. Anlamlı farklılık değeri $p < 0.05$ olup “*” ile gösterilmiştir.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1.Tartışma

Bu tez çalışmasında PF'nin karakterizasyonu gerçekleştirilerek doku mühendisliği alanında uygulanmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiş olup içerik ve elde edilen bulgular yönüyle literatürde bir ilk çalışma olup özgün değer taşımaktadır. PF'nin karakterizasyonu sonucunda hücrelerinden uzaklaştırılmış olan PF, PFS olarak adlandırılmış ve PFS'nin karakterizasyonu sonucunda PFS'nin kolajen tip I, III, IV, elastin, fibrin, fibrinojen, albumin ve proteoglikan içerdiği sonucuna varılmıştır. Doğal ECM yapısını oluşturan bu bileşenlerin PFS içinde yer aldığının ortaya koyulması literatüre özgün katkılar sağlamıştır.

Biyomedikal alanda pek çok çalışmada yaygın olarak kullanılan FDA onaylı PCL polimeri biyoyumlu, mekanik olarak dayanıklı ve biyobozunur özelliktedir. PCL biyoyumlu olmasına rağmen hidrofobik özelliği hücre tutunması açısından dezavantaja sahiptir. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak ve hücre tutunumunu artırmak için kolajen, jelatin, fibronektin gibi doğal polimerler ile yüzey kaplama yapılmaktadır. [140, 141]

Tez çalışmasında ise, PFC hücrelerinin tutunumunu artırmak için PCL membranları PFS ile kaplanmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada PFS'ye ek olarak fetal sıgır serumu (FBS) ve Alfa-Mem (Med) kullanılmış ve PFS'nin PFC hücrelerinin tutunumuna olan etkisi hücre canlılığı testi ve SEM görüntüleriyle analiz edilmiştir. MTT hücre canlılık testi analiz sonuçlarına göre PFS ile kaplanan PCL membranlarında, PFC hücrelerinin uzun dönem hücre canlılığını koruduğu ve böylece PFS'nin hücre canlılığına olumlu etki oluşturduğu sonucuna varılmıştır. PFS'nin hücre canlılığı ve çoğalmasına olan bu etkinin PFS'nin albumin, globulinler, makroglobulinler, fibrinojen, kolajen, elastin gibi heterojen protein yapılarından oluşması ve ayrıca proteoglikan yapı içermesinden

kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü, PFS içinde bulunan bu protein çeşitleri farklı vücut dokularından izole edilerek malzeme yüzey kaplamasında biyouyumluluğu artırmak için tek başına ya da ikili karışım halinde literatürde kullanılmaktadır [10,142].

Literatürde gerçekleştirilen çalışmada PFS içeriğinde de bulunan albümin proteininden yapılan doku iskelesinin mezenkimal kök hücrelerin (MKH) büyümesini ve farklılaşmasını olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir [143]. Böylece, tez çalışmasında PCL membranların albümin içeren PFS ile kaplanması, PFC hücrelerinin tutunması ve canlılığı üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. PFS'nin hücre yapışması ve canlılığı üzerindeki etkisi protein kompleksi ile olmakla birlikte aynı zamanda PFS'nin büyüme faktörleri içermesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. PFS içeriğinde temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve vasküler endotelial büyüme (VEGF) gibi büyüme faktörleri ve prostaglandin ve sitokin içermektedir [144-148].

Ayrıca, PFS'nin vasküler düz kas hücreleri, miyokardiyal hücre ve vasküler endotelial hücre büyümesi ve uyarımı üzerinde çok önemli bir etkisi bulunmaktadır [149]. PFS içerdiği bu bileşenler sayesinde MKH kök hücrelerinin kültüre edilmesi için uygun bir ortam sağlamaktadır [17].

PCL membranları yüzey kaplamasında kullanılan PFS'nin hücre canlılığına etkisi sığır PF'den izole edilen PFS'nin fibrinojen, albümin, globulinler, büyüme faktörleri, prostaglandin ve sitokin gibi protein bileşenleri içererek hücre tutunmasını arttırdığını göstermektedir. PFS ile kaplanmış PCL iskelelerinde hücre kültürünün ilerleyen günlerinde, hücrelerin hücre canlılığını ve sayısını korumanın yanı sıra SEM görüntülerinde görüldüğü gibi PCL membranı yüzeyinde ve PFS'nin SEM görüntülerinde görülen kolajen ağ yapılarından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Şekil 20, 24, 25). Parametrik olmayan analiz sonuçları, PFS kaplı PCL yapı iskeleleri ile FBS, Med ile kaplanmış PCL membranları ve kaplanmamış PCL membranları arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar ($p < 0.05$) olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, PFS ile kaplanmış PCL membranları hücrelerin tutunması ve canlılığı üzerinde önemli derecede olumlu etki göstermiştir. Tez çalışması birinci bölümünde gerçekleştirilen PFS'nin PCL membranlarının kaplanması ve hücre canlılığı ve tutunmasının incelenmesi sonuçlarına göre PFS iyi bir yüzey kaplama malzemesi olduğu

gösterilmiştir. Bu bulgularla, hücre tutunmasını sağlamak/arttırmak için kullanılan kaplama malzemelerine ilave olarak PFS'nin de kullanılabileceği gösterilmiştir.

PFS'nin karmaşık protein içeriğinin belirlenmesi ve PFS'nin karakterizasyonu için moleküler kimlik analizi olarak kullanılan Raman spektroskopisi kullanılmıştır. Raman analiz sonuçlarına ek olarak, histolojik analiz ve SEM görüntüleme sonuçları, PF'nin doğal ECM bileşenlerini içerdiğini ve morfolojik ve yapısal olarak doğal ECM'ye benzer olduğunu göstermiştir. PFS, doğal ECM bileşenleri olan kolajen tip I, III, IV, elastin, fibrin, fibrinojen, GAGs ve proteoglikan içermektedir. PFS'nin doğal ECM bileşenleri içerdiği ve doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabileceği ilk kez bu tez çalışması ile belirlenmiştir. Doğal ECM, hücre çoğalması, canlılığı, farklılaşması ve göçünü barındıran önemli bir misyona sahiptir. Bu yüzden, doku mühendisliği çalışmalarında kolajen, fibrin, matrigel, Jelatin-Metakryloyl jelatin-metakrilat (JelMA) ve hücreleri uzaklaştırılmış dokular doğal ECM'yi taklit etmek için kullanılmaktadır. Bu malzemelerin ECM'yi tam olarak taklit edememe, biyouyumluluk ve izolasyonunda zorluk veya kaynak eksikliği gibi bazı sorunlar bulunmaktadır. Bu sorunlara çözüm olacak ve doku mühendisliği çalışmalarında hem yapı hem de içerik olarak doğal ECM'yi yüksek benzerlik gösteren bir malzeme biyouyumluluk açısından önemlidir. PFS'nin doku mühendisliğinde, tez çalışması ile bir ilk olarak sentetik ve hidrofobik PCL membranlarının yüzey kaplaması için kullanılmıştır [135]. Tez çalışmasının son aşamasında ise, PFS'nin hidrojel sistemlerde kullanılabilirliğini göstermek için Aljinat ile birlikte kullanılmıştır. Aljinata değişen oranlarda dondurarak kurutulmuş PFS eklenerek en iyi hidrojel yapının A-150mg PFS grubunda olduğu belirlenmiştir. dondurarak kurutulmuş PFS'ye ilave olarak PFS'nin sıvı halinin de hidrojel sistemlerde kullanılabilirliğini göstermek amacıyla eşit hacimlerde (1:1) hazırlanan A-PFS hidrojeli üretilmiştir. Bu hidrojel gruplarında hücre canlılığı ve farklılaşmasının belirlenmesi kontrol grubu olarak Aljinat hidrojeli kullanılmıştır. MC3T-3 hücrelerinin 21 günlük in-vitro kültürleri yapılarak PFS eklenen gruplarda hücre canlılığı ve farklılaşmasının daha iyi olduğu sonucu elde edilmiştir. Ayrıca, PFS'nin hem toz hem de sıvı olarak hidrojel sistemlerde kullanılabilirliği tez çalışmasının önemli çıktılarından biridir.

Bu çalışmada, PF'nin doğal ECM'ye benzeyen yapısı histolojik, Raman spektroskopi analizi ve SEM görüntüleri ile ortaya konmuştur. Böylece PFS'nin literatürde hiç bahsedilmeyen doğal ECM ile benzerliği keşfedilmiş ve yüzey kaplama, *in vivo/in vitro*

gibi çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabileceği bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir.

4.2. Sonuç ve Öneriler

Bu tez çalışması ile bir plazma ultrafiltratı olan PF'nin doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabilirliği araştırılmıştır. Örnek alımının ve etik sorun oluşturmadağı için PF sıvısı mezbaneye kesim amaçlı getirilen sağlıklı sığırlardan kesimden hemen sonra alınmıştır. Kısa sürede laboratuvara getirilen heterojen hücre topluluğu içeren PF'den hücreler uzaklaştırılarak hücreleri uzaklaştırılmış olan PF, PFS olarak adlandırılmıştır. PFS'nin doku mühendisliğinde kullanılabilirliğinin araştırıldığı bu tez çalışmasının ilk aşamasında PFS, elektro eğirme yöntemiyle üretilen PCL membranlarının yüzey kaplamasında kullanılmıştır. PFS'nin yüzey kaplamaya etkisinin karşılaştırılması için Alfa-Mem (Med) besi yeri ve sığır serumu (FBS) PCL membranlarının yüzey kaplamasında kullanılmıştır. Kontrol olarak kaplama yapılmamış PCL membranları kullanılmıştır. Kaplamadaki amaç hidrofobik özellikte olan PCL polimerinden üretilmiş olan PCL membranlarının hidrofilik özellik kazanarak hücre tutunumunu artırmasıdır. PCL membranlarının kaplama sonrası hücre tutunumuna etkisinin belirlenmesi için PCL membranlarında PFc hücreleri beş gün boyunca kültüre edilmiştir. Hücre kültürünün 1., 3. ve 5. günlerinde hücre canlılığının belirlenmesi için MTT analizi yapılmıştır. PCL membranlarının yapısı ve bu membranlara tutunan hücrelerin görüntülenmesi için SEM analizi yapılmıştır. Hücre kültürünün 1. gününde; FBS, Med ve PFS ile yüzey kaplaması yapılmış olan PCL membranlarına hücrelerin tutunduğu, fakat kaplama yapılmamış olan PCL membranlarına hücrelerin tutunmadığı görülmüştür (Şekil 18). Üçüncü ve beşinci günlerde PFS ile yüzey kaplaması yapılmış olan membranlara hücre tutunumu görülmesine rağmen FBS ve Med ile kaplanmış olanlarda hücre sayısında azalmanın olduğu SEM görüntüleri ile belirlenmiştir (Şekil 19, 20). Böylece, PFS ile kaplanmış olan PCL membranlarının 1., 3. ve 5. günlerde hücre tutunumu ve hücre sayısının diğer membranlara göre daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır. PFS ile kaplanmış olan PCL membranlarında hücre sayısında artma ile birlikte hücre canlılığının da korunduğu hücre canlılık testi ile tespit edilmiştir. MTT analizi sonucunda elde edilen absorbans değerlerinin istatistik analizinde Anova metodu kullanılarak gruplar arası farklılık karşılaştırılmıştır. Kontrol olarak seçilen kaplama yapılmayan PCL membranları ile FBS ve Med ile kaplama yapılan PCL

membranlarının 1, 3 ve 5. günlerde hücre canlılığı Bonferroni çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilerek anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0.05$) sonucuna varılmıştır. Ayrıca, Bonferroni çoklu karşılaştırma testi PFS ile kaplanmış PCL membranları ve kaplama yapılmayan PCL membranları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu ($p<0.05$) belirlenmiştir. Böylece, hücre tutunumu ve canlılığının en fazla PFS ile kaplanmış olan PCL membranlarında olduğu gösterilmiştir (Şekil 21). Her bir grubun kendi içinde 5 gün boyunca hücre canlılığını analiz etmek için Wilcoxon testi kullanılmıştır. FBS ile kaplama yapılmış olan PCL membranlarının 1, 3 ve 5. günlerde kendi aralarında karşılaştırılması sonucuna göre 1. günde hem 3.gün hem de 5. günler arasında anlamlı farklılığın olduğu sonucuna varılmıştır. PFS ile kaplama yapılan PCL membranlarında 1. gün ile 3. gün arasında anlamlı farklılık görülmezken, 1. gün ile 5. gün arasında ve 3. gün ile 5. gün arasında anlamlı farklılık olduğu görülmüştür. Med ile kaplama yapılmış PCL membranlarında ve kaplama yapılmamış PCL membranlarının kendi içinde 1, 3 ve 5. günler arasında hiç bir anlamlı farklılık olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 22). Böylece; hücre canlılığı analizi sonuçları ve SEM görüntüleri birlikte değerlendirildiğinde, PFS özellikle PCL gibi hidrofobik özellikte membranların yüzey kaplamasında hücre tutunumunu artırmak amacıyla kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Raman spektroskopisi analizi öncesinde PFS örneklerinin bir kısmı dondurarak kurutma ile toz PFS elde edilmiştir. Dondurarak kurutma işleminin PFS yapısında herhangi bir değişikliğe sebep olup olmadığını tespit etmek amacıyla hem dondurarak kurutulmuş olan PFS hem de sıvı PFS'nin Raman spektroskobu ile analizi yapılmıştır. Elde edilen Raman spektrum değerleri grafik haline getirilerek sıvı ve toz PFS'nin benzer spektrumlar içermekle birlikte toz PFS spektrumlarının daha belirgin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 26). Bunun sebebi spektrumların sıvı PFS'de su kaynaklı olarak değiştiği ve toz PFS'nin su içermemesi daha belirgin spektrumların oluşmasına sebep olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, dondurarak kurutma işleminin PFS yapısında değişime sebep olup olmadığı TBA analizi ile de araştırılmıştır. TBA analizi sonucuna göre TB1 ve TB2'nin yükleme spektrumları, ağırlıklı olarak genel spektral veri seti içinde benzer olan Raman spektrumlarını gösterdiği görülmüştür. Sıvı PFS için TB1 ve TB2 değerlerinin sırasıyla %81,92 ve %16,19 olduğunu, dondurularak kurutulmuş PFS için TB1 ve TB2'nin toplam varyansları sırasıyla %99,14 ve %0,62'sini oluşturduğu

sonucu elde edilmiştir (Tablo 2). TB2'de, sıvı PFS ve dondurularak kurutulmuş PFS ayırımına izin veren önemli bir puan değeri kayması tanımlanmamıştır. TB1 toplam varyansının %99,14 olması, Şekil 27'de verilen sıvı ve dondurularak kurutulmuş PFS'den elde edilen spektrumların standart sapma grafiğinde benzer spektrumlar içermesi ve Şekil 28'deki TBA analizi sonuçlarına göre sıvı PFS'nin dondurularak kurutulmasının PFS üzerinde önemli bir değişiklik yapmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Raman spektroskopu ile PFS'ye ait spektrum değerleri elde edildikten sonra, literatürdeki spektrumlar ile karşılaştırılarak (Tablo 1) PFS içeriğindeki bileşenler tespit edilmiştir. Raman spektrumları her bir molekül için belirli spektrum değerine karşılık geldiği için literatürdeki spektrum değerleri ile karşılaştırma sonucunda PFS içeriğinde doğal ECM bileşenlerinden olan kolajen tip I, III, IV, albumin, fibrin, fibrinojen, elastin ve proteoglikan bulunduğu tespit edilmiştir.

PFS'nin karakterizasyonu için kullanılan bir diğer yöntem ise histolojik boyamadır. Histolojik boyama öncesinde PFS 48 saat boyunca inkübatörde bekletilerek jelleşmesi sağlandı. Jelleşen PFS ile histolojik boyamada histolojik karakterizasyonda kullanılan H&E boyası; proteinlerin ve hücre çekirdeğinin boyanmasında, Masson Trikróm boyası; kolajen proteininin boyanmasında, Alsiyan blue boyası ise; polisakkarit yapıdan oluşan GAGs bileşeninin boyanmasında kullanılmıştır. Boyama sonucu elde edilen cam bloklar ışık mikroskopu ile incelenerek görüntüleri kaydedilmiştir. H&E boyama sonucunda PF'nin tamamen hücrelerinden uzaklaştırıldığı ve hematoksilen ile boyanan hücre çekirdeği kısmının bulunmadığı gözlenmiştir. Ayrıca, tüm görüntü alanının pembeye boyanarak eozinle boyanan kısımlarda belirgin kolajen fiber ağının bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 23 A, B). PFS jel yapısının Masson Trikróm (MT) ile boyama sonucunda maviye boyanan kısımların kolajen, kırmızı/pembeye boyanan kısımların da elastin proteini olduğu tespit edilmiştir (Şekil 23 C, D). PFS içeriğindeki GAGs bileşenlerinin belirlenmesi için Alsiyan blue (AB) boyaması yapılarak, Şekil 23'de kolajen fiber ağı içine dağılmış GAGs yapısının yeşil renge boyandığı gözlenmiştir (Şekil 23 E, F). Elde edilen histolojik boyama görüntüleri sonuçlarına göre; PFS'nin genel yapısının H&E boyama ile fiber ağ yapısından oluştuğu, MT boyama ile PFS içeriğinde elastin ve kolajen proteinlerinin bulunduğu ve AB boyama ile polisakkarit yapıları bileşenler olan GAGs ve hem protein hem de polisakkarit yapıları bileşenler içeren proteoglikanların PFS içeriğinde bulunduğu sonucuna varılmıştır.

PFS'nin karakterizasyonu için kullanılan SEM görüntüleme ile PFS'nin nanoboyutta yapısı incelenmiştir. SEM görüntüleme için jelleştirilmiş olan PFS kullanılmıştır. Histolojik boyama sonucu elde edilen görüntülerde de görülen PFS içeriğindeki kolajen protein ağının nano boyuttaki yapısı SEM analizi ile görüntülenmiştir. Şekil 24'de yer alan A ve B görüntülerinde kolajen fiber ağı daha ince demetler halindeyken, C ve D'deki görüntülerde daha kalın bir kolajen fiber ağı bulunduğu gözlenmiştir. Ayrıca, Şekil 24 A ve B'de kolajen fiber ağı çapraz bağlı bir örgü yapıda görülmekteyken Şekil 24 C ve D'de kolajen fiberlerin daha çok birbirine paralel önde olacak şekilde yönlendiği görülmektedir. Objektif büyütmesi arttıkça SEM görüntüleme ile kolajen fiberlerin yapısı ve fiber yönlenmeleri daha detaylı görülmektedir (Şekil 24 B, D). Kolajen fiber ağının bir başka SEM fotoğrafı Şekil 25'de H&E boyama sonucu elde edilen görüntü ile birlikte gösterilmiştir. Şekil 25 C'de bu kolajen ağ örgüsü birbirine paralel uzantılar şeklinde görülürken, Şekil 25 D'de 20.00 KX büyütmede fiber yapılar daha belirgin bir ağ örgüsü şeklinde görülmektedir. SEM görüntüleme sayesinde H&E boyama ile mikroboyutta görülen PFS içeriğindeki kolajen fiber yapısının daha detaylı incelenerek nano boyutta yapısı hakkında bilgiye ulaşılabilmektedir. Elde edilen SEM bulgularına göre PFS yapısının doğal ECM yapısına benzediği sonucuna varılmıştır.

PFS'nin karakterizasyonu sonucunda hem yapısal hem de içerik olarak doğal ECM'ye benzerliğinin tez çalışması ile ilk defa keşfedilmiş olması tez çalışmasına özgün bir değer katmaktadır. PFS'nin doğal ECM'ye benzerliği ile çeşitli doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabilirliğinin gösterilmesi için PFS aljinat (A) ile birlikte hidrojel üretiminde kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında aljinat ile birlikte ilk defa kullanılan PFS'nin hangi oranlarda hidrojel yapılara ekleneceğinin belirlenmesi için artan oranlarda PFS eklenerek denemeler yapılmıştır. %3'lük aljinat çözeltisine artan miktarda 50, 100, 150 mg PFS ve kontrol olarak da sadece aljinat içeren çözeltiler hidrojel üretimi için kullanılmıştır. Ayrıca, Sıvı PFS'nin de hidrojel üretiminde kullanılabilirliğinin gösterilmesi için aljinat ile eşit hacimde karıştırılan sıvı PFS (A-PFS (1:1)) bir diğer hidrojel grubu olarak belirlenmiştir. Üretilen hidrojel gruplarının Raman spektroskopu analizi ve SEM görüntüleme analizi yapılmıştır. Raman spektrum değerleri ile elde edilen Raman spektrumu/ Raman kayması grafiğinden PFS'nin aljinat ile homojen olarak karıştığı görülmüştür. Aljinat içerisine eklenen PFS miktarı artışı ile

PFS'ye ait olan spesifik spektrumların grafikte belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür (Şekil 29).

A, A-50mg PFS, A-100mg PFS, A-150mg PFS ve A-PFS (1:1) olmak üzere beş farklı hidrojel gruplarının SEM görüntüleme ile yapıları incelenmiştir. Artan miktarda eklenen PFS grupları incelendiğinde A-150mg PFS hidrojel grubunda PFS aljinat içerisinde homojen olarak karışmakla birlikte kolajen fiber yapısının da aljinat içerisinde yoğun bir şekilde dağıldığı SEM görüntülerinde görülmektedir (Şekil 33 D, E). Ayrıca, A-PFS (1:1) hidrojel grubunda da benzer şekilde yoğun olarak PFS yapısı gözlenmiştir (Şekil 33 D, E). Böylece, MC3T-3 osteoblast hücrelerinin *in-vitro* kültürü için A, A-150mg PFS ve A-PFS (1:1) hidrojel grupları tercih edilmiştir.

Belirlenen hidrojel gruplarında MC3-T3 hücreleri 21 gün boyunca kültüre edilerek kültürün 3, 7, 14 ve 21.günlerinde SEM analizi yapılmıştır. Histolojik analiz için hücre kültürünün 7, 14 ve 21.günlerinde ve hücre canlılık analizi için de hücre kültürünün 1, 3, 7, 14 ve 21. günlerindeki hidrojel grupları kullanılmıştır.

Histolojik boyamada hücre kültürünün 7., 14., ve 21. günlerinde H&E boyama sonucunda, hidrojel yapılarda MC3T-3 hücreleri siyah ve sitoplazma içeriği mor renkli görülmektedir (Şekil 31). Tüm gruplarda hücrelerin hidrojel yapılara tutunarak çoğaldığı ve hücre kültürünün başarılı bir şekilde gerçekleştiği sonucu elde edilmiştir. AB histolojik boyaması ile polisakkarit yapılı olan aljinat hidrojelinde daha yoğun bir boyanmanın olduğu görülmüştür. PFS eklenen hidrojel gruplarda PFS içeriğinde az miktarda bulunan GAGs yapısından dolayı AB ile daha az boyanma olduğu gözlenmiştir (Şekil 31). Hidrojel gruplarında kolajen yapıyı görüntülemek için MT boyama yapılmış ve ışık mikroskobu görüntüleri sonuçlarına göre aljinat ile PFS'nin homojen olarak karışmış olduğu ve MT boyama ile kolajen fiber ağları tüm hidrojel yapılarında görülmektedir (Şekil 32). MC3T-3 osteoblast hücrelerinin hidrojel gruplarında kültürünün yapılmasında hücrelerin farklılaşarak kemik dokuyu oluşturduğu AR histolojik boyaması ile belirlenmiştir. Hücre kültürünün 7. gününde kemik dokunun oluşmaya başladığı ve 21.günde her bir hidrojel grup için kemik doku oluşumunun arttığı gözlenmiştir (Şekil 32).

A, A-150mg PFS ve A-PFS (1:1) hidrojellerinde MC3T-3 hücrelerinin 21 gün boyunca *in-vitro* kültürü yapılarak hücre kültürünün 3., 7., 14. ve 21. günlerdeki SEM

görüntüleri incelendiğinde PFS eklenen hidrojel gruplarındaki hücre tutunmasının ve farklılaşmasının daha iyi olduğu sonucu elde edilmiştir (Şekil 34). Bunun sebebi, PFS içeriğindeki protein bileşenlerin bulunması ve yapısal olarak da doğal ECM'ye benzerliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. MC3T-3 osteoblast hücrelerinin 21.günde farklılaşmış halini özellikle A-150mg PFS hidrojelinde belirgin bir şekilde görülmesi ile en iyi hidrojel grubunun 150mg PFS içeren hidrojel olduğu söylenebilmektedir (Şekil 34). Böylece, PFS hem sıvı PFS şeklinde hem de %3'lük aljinat çözeltisi içine 150mg PFS eklenenerek doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabilirliği sonucuna varılmaktadır.

A, A-150mg PFS ve A-PFS (1:1) hidrojel gruplarında MC3T-3 hücrelerinin 21 günlük hücre kültürü sonuçlarının SEM ve histolojik boyama ile analizine ilave olarak hücre canlılığının belirlenmesi için MTT analizi yapılmıştır. MTT analizi için hücre kültürünün 1., 3., 7., 14. ve 21.günlerinde hücre canlılığına bakılarak elde edilen absorbans değerleri tek yönlü Anova metodu kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Tek yönlü Anova istatistiği sonucunda tüm gruplar arasında anlamlı farklılığın sadece 1. ve 21. günlerde olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Böylece, 3., 7. ve 14. günlerde gruplar arasında anlamlı bir farklılık ($p > 0.05$) olmadığı sonucu elde edilmiştir.

Her bir hidrojel grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı farklılığın belirlenmesi için bağımsız örneklem t-testi sonuçlarına göre 1. gün A ile A-PFS (1:1) ve A-150mg PFS ile A-PFS (1:1) arasında anlamlı farklılık ($p < 0.05$) olduğu tespit edilmiştir. 3. ve 7. günlerde ise gruplar arasında herhangi bir anlamlı farklılık olmadığı sonucu elde edilmiştir. Hücre kültürünün 14.günde sadece A-150mg ile A-PFS (1:1) arasında anlamlı farklılık elde edilmiştir. Hücre kültürünün son günü olan 21. günde; A ile A-PFS (1:1) ve A-150mg ile A-PFS (1:1) grupları arasında anlamlı farklılık elde edilmiştir. Şekil 35'de üç hidrojel gruplarında 21 gün boyunca kültürü yapılan MC3T-3 hücrelerinin hücre canlılığı tüm günlerde A hidrojelinde daha az iken PFS içeren hidrojel gruplarında hücre canlılığının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Hücre kültürünün başlangıcı olan 1. günde hidrojel gruplarındaki hücre canlılığı çok yakın gibi görünmesine rağmen istatistik analizi sonuçlarına göre anlamlı farklılık olmadığı sonucuna varılmıştır (Şekil 35).

Sonuç olarak, PF'nin henüz aydınlatılmamış olan doğal ECM'ye önemli derecede benzerliği ve doğal biyomalzemelere alternatif olarak doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabileceği bu tez çalışmasıyla bir ilk olarak ortaya koyulmuştur. Ayrıca, PFS *in-vitro* hücre kültürü çalışmaları, biyoyazıcı sistemlerde biyomürekkep malzemesi olarak, sentetik/doğal polimerlerle karıştırılarak doku rejenerasyonunda kullanımı, çeşitli hidrojel sistemlerin üretiminde ve organoid yapıların üretimi gibi pek çok biyomedikal mühendisliği uygulamalarında kullanılabilmek potansiyeline sahiptir.



KAYNAKÇA

1. Vogiatzidis, K., Zarogiannis, S.G., Aidonidis, I., Solenov, E.I., Molyvdas, P-A., Gourgoulialis, K.I., Hatzoglou, C., 2015. Physiology of pericardial fluid production and drainage. **Frontiers in Physiology**, **6**: 1–6.
2. Meyer, M., 2019. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. **Biomedical engineering online**, **18(1)**: 24.
3. Spinali, K.L., Schmuck, E.G., 2018. Natural Sources of Extracellular Matrix for **Cardiac Repair**. **Advances in experimental medicine and biology**, **1098**: 115-130.
4. Hoit, B.D., 2017. Pathophysiology of the pericardium. **Progress in Cardiovascular Diseases**, **59**: 341–348.
5. Holt, J.P., 1970. The normal pericardium. **American Journal of Cardiology**, **26(5)**: 455-65.
6. Bonow, R.O., Mann, D.L., Zipes, D.P., Libby, P., 2011. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. 9th edition. Elsevier Science, 2128
7. Balfe, A., Barry, S., Blake, O., Cannon, D., Healy, M., Kilbane, M., 2009. The biochemistry of body fluids. Association of Clinical Biochemists in Ireland (ACBI) Scientific Committee Guidelines, 36/15–16.
8. Bhargava, M., Wazni, O.M., Saliba, W.I., 2016. Interventional pericardiology. **Current Cardiology Reports** **18(3)**:31.
9. Iskandar, R., Liu, S., Xiang, F., Chen, W., Li, L., Qin, W., Huang, F., Chen, X. 2017. Expression of pericardial fluid T-cells and related inflammatory cytokines in patients with chronic heart failure. **Experimental and therapeutic medicine**, **13(5)**: 1850–1858.
10. Gibson, A.T., Segal, M.B., 1978b. A study of the routes by which protein passes from the pericardial cavity to the blood in rabbits. **Journal of Physiology**, **280**: 423–433.

11. Athar, H., Parrah, J.U., Moulvi, B.A., Singh, M., Dedmari, F.H., 2012. Pericarditis in Bovines- A Review. **International Journal of Advanced Veterinary Science and Technology**, **1(1)**: 19-27
12. Pekins, S.L., Magdesian, K.G., Thomas, W.P., Spier, S.J., 2004. Pericarditis and pleuritis caused by *C. pseudotuberculosis* in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, **224**: 1133-1138.
13. Ullah, J., Hashmi, S., Ali, A., Khan, F., Sami, S.A., Basir, N., Bokhari, S.S., Sharif, H., El-Seedi, H.R., Musharraf, S.G., 2021. Pericardial fluid proteomic label-free quantification of differentially expressed proteins in ischemic heart disease patients with systolic dysfunction by nano-LC-ESI-MS/MS analysis. **Royal Society of Chemistry Advances**, **11(1)**: 320.
14. Gibson, A.T., Segal, M.B., 1978a. A study of the composition of pericardial fluid, with special reference to the probable mechanism of fluid formation. **Journal of Physiology**, **277**: 367-77.
15. Benhaiem-Sigaux, N., Mina, E., Sigaux, F., Lambre, C.R., Valensi, F., Allegret, C., Bernaudin, J.F., 1985. **Characterisation of human pericardial macrophages. Journal of Leukocyte Biology**, **38**: 709–721
16. Trindade, F., Vitorino, R., Leite-Moreira, A., & Falcão-Pires, I. 2019. Pericardial fluid: an underrated molecular library of heart conditions and a potential vehicle for cardiac therapy. **Basic research in cardiology**, **114(2)**: 10.
17. Blázquez, R., Sánchez-Margallo, F.M., Crisóstomo, V., Báez, C., Maestre, J., García-Lindo, M., Usón, A., Álvarez, V., Casado, J.G., 2015. Intrapericardial administration of mesenchymal stem cells in a large animal model: a bio-distribution analysis. **PLoS One**, **10(3)**: e0122377
18. Kuosmanen, S.M., Hartikainen, J., Hippeläinen, M., Kokki, H., Levonen, A.-L., and Tavi, P., 2015. MicroRNA profiling of pericardial fluid samples from patients with heart failure. **PLoS ONE**, **10**: e0119646.
19. Beltrami, C., Besnier, M., Shantikumar, S., Shearn, A. I., Rajakaruna, C., Laftah, A., Sessa, F., Spinetti, G., Petretto, E., Angelini, G. D., Emanuelli, C., 2017. Human Pericardial Fluid Contains Exosomes Enriched with Cardiovascular-Expressed MicroRNAs and Promotes Therapeutic Angiogenesis. Molecular therapy: **The Journal of the American Society of Gene Therapy**, **25(3)**: 679–693.

20. Tuzlakoglu, K., Bolgen, N., Salgado, A.J., Gomes, M.E., Piskin, E., Reis, R.L., 2005. Nano- and micro-fiber combined scaffolds: A new architecture for bone tissue engineering, **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, **16,(12)**: 1099 – 1104
21. Kular, J. K., Basu, S., Sharma, R. I., 2014. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. **Journal of tissue engineering**, **5**: 2041731414557112.
22. Eckes, B., Nischt, R., Krieg, T., 2010. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, **3**: 4.
23. Labat-Robert, J., Robert, AM., Robert, L., 2012. Aging of the extracellular matrix. **Médecine & Longévité**, **4**: 3–32.
24. Singh, P., Carraher, C., Schwarzbauer, J.E., 2010. Assembly of fibronectin extracellular matrix. **Annual review of cell and developmental biology**, **26**: 397–419.
25. Tzu, J., Marinkovich, M.P., 2008. Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. **The international journal of biochemistry & cell biology**, **40(2)**: 199–214.
26. Chiquet-Ehrismann, R., Tucker, R.P., 2004. Connective tissues: signalling by tenascins. **The international journal of biochemistry & cell biology**, **36(6)**: 1085–1089.
27. Sharma, P., Maffulli, N., 2005. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. **The Journal of bone and joint surgery American volume**, **87(1)**: 187–202.
28. Tanzer M. L., 2006. Current concepts of extracellular matrix. **Journal of orthopaedic science: official journal of the Japanese Orthopaedic Association**, **11(3)**: 326–331.
29. Kim, S.H., Turnbull, J., Guimond, S., 2011. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **The Journal of endocrinology**, **209(2)**: 139–151.

30. Tan, H., Gong, Y., Lao, L., Mao, Z., Gao, C., 2007. Gelatin/chitosan/hyaluronan ternary complex scaffold containing basic fibroblast growth factor for cartilage tissue engineering, **The Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, **18**: 1961–1968.
31. Awad, H.A., Wickham, M.Q., Leddy, H.A., Gimble, J.M., Guilak, F., 2004. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds, **Biomaterials**, **25**: 3211–3222
32. Tibbitt, M.W., Anseth, K.S., 2009. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. **Bioengineering and Biotechnology**, **103**: 655–63.
33. Rozario, T., & DeSimone, D. W., 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. **Developmental biology**, **341(1)**: 126–140.
34. Bosman, F.T., Stamenkovic, I., 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **Journal of Pathology**, **200**: 423–428.
35. Schiller, J., Huster, D., 2012. New methods to study the composition and structure of the extracellular matrix in natural and bioengineered tissues. **Biomatter**, **2(3)**: 115-31.
36. Drury, J.L., Mooney, D.J., 2003. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications, **Biomaterials**, **24**: 4337–4351.
37. Lee, C.H., Singla, A., Lee, Y., 2001. Biomedical applications of collagen, **International Journal of Pharmacy**, **221**: 1–22.
38. Yannas, I.V., Burke, J.F., 1980. Design of an artificial skin I. Basic design principles, **Journal of Biomedical Materials Research**, **14**: 65–81.
39. Stefan, M.M., Shortkroff, S., Schneider, T.O., Breinan, H.A., Yannas, I.V., Spector, M., 1999. Meniscus cells seeded in type I and type II collagen-GAG matrices in vitro, **Biomaterials**, **20**: 701–709.
40. Tan, H., Huang, D., Lao, L., Gao, C., 2009. RGD modified PLGA/gelatin microspheres as microcarriers for chondrocyte delivery, **Journal of Biomedical Materials Research**, **91B**: 228–238.

41. Huang, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A., Madihally, S.V., 2005. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering, **Biomaterials**, **26**: 7616–7627.
42. Manon-Jensen, T., Kjeld, N.G., & Karsdal, M.A., (2016). Collagen-mediated hemostasis. **Journal of thrombosis and haemostasis**, **14(3)**: 438–448.
43. Guhathakurta, S., Galla, S., Ramesh, B., Venugopal, J.R., Ramakrishna, S., Cherian, K.M., 2011. Nanofiber-reinforced biological conduit in cardiac surgery: preliminary report. **Asian Cardiovascular and Thoracic Annals**, **19(3-4)**: 207–212.
44. Maurer, T., Stoffel, M.H., Belyaev, Y., Stiefel, N.G., Vidondo, B., et al. 2018. Structural characterization of four different naturally occurring porcine collagen membranes suitable for medical applications. **PLOS ONE** **13(10)**: e0205027.
45. Eckes, B., Nischt, R., and Krieg, T., 2010. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. **Fibrogenesis Tissue Repair**; **3**: 4.
46. Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M., 2010. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, **123**: 4195–4200.
47. Wang, J.H., 2006. Mechanobiology of tendon. **Journal of Biomechanics**, **39**: 1563–1582.
48. Yue, B., 2014. Biology of the extracellular matrix: an overview. **Journal of glaucoma**, **23(8 Suppl 1)**: S20–S23.
49. Browne, L., 2007. Glycosaminoglycan Stabilization in Bovine Pericardium, Clemson University, Bioengineering Department, Master of Science, South Carolina, All Theses. 241.
50. Fogerty, F.J., Akiyama, S.K., Yamada, K.M., Mosher, D.F., 1990. Inhibition of binding of fibronectin to matrix assembly sites by antiintegrin (alpha 5 beta 1) antibodies. **The Journal of cell biology**, **111(2)**: 699–708.
51. Alovskaya, A., Alekseeva, T., Phillips, J.B., King, V., Brown, R., 2007. Fibronectin, collagen, fibrin-components of extracellular matrix for nerve regeneration. **Topics in Tissue Engineering**, **3**: 1-26.

52. Karp, G., 2010. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. Chapter 7, VI Edition. John Wiley & Sons, 832.
53. Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W.G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J. C. R., Kleinman, H. K., et al., 2005. A simplified laminin nomenclature. **Matrix Biology**, **24(5)**: 326-332.
54. Langer, R., Vacanti, J.P., 1993. Tissue engineering. **Science**, **260**: 920–926.
55. Anderson, S.E., Hill, A.J., Iaizzo, P.A., 2009. Microanatomy of human left ventricular coronary veins. **Anatomical record**, **292**: 23-28
56. Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J., Atala, A., 2013. Principles of Tissue Engineering, 2nd Edition, Academic press, Elsevier
57. Hench, L., Jones, J., 2005. Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering, Woodhead Publishing, Cambridge 304.
58. Saltzman, W.M., 2004. Tissue Engineering: Engineering Principles for Design of Replacement Organs and Tissue, Oxford University Press, New York, 544.
59. Woodruff, M.A., Hutmacher, D.W., 2010. The return of a forgotten polymer polycaprolactone in the 21st century, **Progress in Polymer Science**, **35**: 1217-1256
60. Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A.M., Chiellini, E., 2010. Polymeric materials for bone and cartilage repair, **Progress in Polymer Science**, **35(4)**: 403–440.
61. Albertsson, A.C., Varma, I.K., 2003. Recent developments in ring opening polymerization of lactones for biomedical applications, **Biomacromolecules**, **4**: 1466-1486.
62. Tseng, H., Puperi, D.S., Kim, E.J., et al., 2014. Anisotropic poly(ethylene glycol)/polycaprolactone hydrogel-fiber composites for heart valve tissue engineering. **Tissue Engineering Part A**, **20**: 2634–2645
63. Lee, J., Elosegui-Artola, A., Trang Le, K.H., Kim, G.M., 2013. Morphological Cues for Regulation of Cell Adhesion and Motility with Tailored Electrospun Scaffolds of PCL and PCL/PVP Blends, **Cellular and Molecular Bioengineering**, **6**: 482-495.

64. Shin, Y., Hohman, M., Brenner, M., Rutledge, G., 2001. Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities **Polymer**, **42**: 9955-67.
65. Melcher, J.R., Taylor, G.I., 1969. Electrically driven jets. **Proceedings of the Royal Society London A**, **313**: 453–475.
66. Hasan, A., Memić, A., Annabi, N., Hossain, M., Paul, A., Dokmeci, M.R., Dehghani, F., Khademhosseini, A., 2014. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. **Acta biomaterialia**, **10(1)**: 11-25.
67. Kim, S.J., Lim, J.Y., Kim, I.Y., Lee, S.H., Lee, T.S., Kim, S.I., 2005. Optimum parameters for production of nanofibres based on poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid) by electro-spinning, **Smart Materials and Structures**, **14**.
68. Mengüç, G.S., Kanat, Z.E., Çay, A., Kırıcı, T., Gülümser, T., Tarakçıoğlu, I., 2007. Nano Fibres (Part 1, 2), **Textile and Apparel**, **17(1, 2)**: 15-17, 83-89.
69. Ravichandran, R., Sundarajan, S., Venugopal, J.R., Mukherjee, S., Ramakrishna, S., 2012. Advances in polymeric systems for tissue engineering and biomedical applications, **Macromolecular Bioscience**, **12**: 3, 286–311.
70. Khan, N., 2012. Applications of electrospun nanofibers in the biomedical field, **Studies by Undergraduate Researchers at Guelph**, **5**: 63-73.
71. Smith, L.A., Ma, P.X., 2004. Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, **39**: 125-131.
72. Rocco, K.A., Maxfield, M.W., Best, C.A., Dean, E.W., Breuer, C.K., 2014. In Vivo Applications of Electrospun Tissue-Engineered Vascular Grafts: A Review. **Tissue Engineering Part B Reviews**, **20**: 628–40.
73. Li, M., Mondrinos, M. J., Gandhi, M. R., Ko, F. K., Weiss, A. S., & Lelkes, P.I., 2005. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. **Biomaterials**, **26(30)**: 5999–6008.
74. Wang, H., Fu, G., Li, X., 2009. Functional polymeric nanofibers from electrospinning, **Recent patents on nanotechnology**, **3(1)**: 21-31

75. Wang, W., Caetano, G., Ambler, W.S., Blaker, J.J., Frade, M.A., Mandal, P., Diver, C., Bártolo, P., 2016. Enhancing the hydrophilicity and cell attachment of 3d printed pcl/graphene scaffolds for bone tissue engineering. **Materials (Basel, Switzerland)**, **9(12)**: 992.
76. Mijovic, B.; Trcin, M.; Agic, A.; Zdraveva, E.; Bujic, M.; Spoljaric, I.; Kosec, V., 2012. Study on cell adhesion detection onto biodegradable electrospun PCL scaffolds. **Journal of Fiber Bioengineering and Informatics**, **5**: 33-40.
77. Atyabi, S.M., Irani, S., Sharifi, F., et al, 2016. Cell attachment and viability study of PCL nano-fiber modified by cold atmospheric plasma. **Cell biochemistry and biophysics**, **74(2)**: 181–190.
78. Heydarkhan-Hagvall, S., Schenke-Layland, K., Dhanasopon, A. P., Rofail, F., Smith, H., Wu, B. M., Shemin, R., Beygui, R. E., MacLellan, W.R., 2008. Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering. **Biomaterials**, **29(19)**: 2907–2914.
79. Wu, C.J., et al., 2011. Mechanically tough pluronic f127/laponite nanocomposite hydrogels from covalently and physically cross-linked networks. **Macromolecules**, **44(20)**: 8215-8224.
80. Pawan, P., Mayur, P., Ashwin, S., 2011. Role of natural polymers in sustained release drug delivery system: Applications and recent approaches. **International Research Journal of Pharmacy**, **2(9)**: 6-11.
81. Hoffman, A.S., 2002. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **54(1)**: 3-12.
82. Zhang, Y., Dai, J., Yan, L., Sun, Y., 2020. Intra-articular injection of decellularized extracellular matrices in the treatment of osteoarthritis in rabbits. **PeerJ**, **8**: e8972
83. Peña, B., Laughter, M., Jett, S., Rowland, T. J., Taylor, M., Mestroni, L., Park, D. 2018. Injectable Hydrogels for Cardiac Tissue Engineering. **Macromolecular Bioscience**, **18(6)**: e1800079.
84. Kikuchi, T., Sakuta, T., Yamaguchi, T., 1998. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. **Osteoarthritis and cartilage**, **6(3)**: 177–186.

85. Claudio-Rizo, J.A., Delgado, J., Quintero-Ortega, I.A., Mata-Mata, J.L., Mendoza-Novelo, B., 2018. Decellularized ECM-derived hydrogels: modification and properties, **Hydrogels**, **3**: 3-5.
86. Awad, N.K., Niu, H., Ali, U., Morsi, Y.S., and Lin, T., 2018. Electrospun fibrous scaffolds for small-diameter blood vessels: A review, **Membranes**, **8(1)**: 15.
87. Sankaran, K.K., Krishnan, U.M., and Sethuraman, S., 2014. Axially aligned 3D nanofibrous grafts of PLA–PCL for small diameter cardiovascular applications, **Journal of Biomaterials Science**, **25(16)**: 1791-1812.
88. Schrieber, R. and Gareis, H., 2007. Gelatine handbook: theory and industrial practice. John Wiley & Sons.
89. Liu, Y., and Chan-Park, M.B., 2010. A biomimetic hydrogel based on methacrylated dextran-graft-lysine and gelatin for 3D smooth muscle cell culture. **Biomaterials**, **31(6)**: 1158-1170.
90. Huang, S., and Fu, X., 2010. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. **Journal of Controlled Release**, **142(2)**: 149-159.
91. Neffe, A.T., et al. 2011. Gelatin functionalization with tyrosine derived moieties to increase the interaction with hydroxyapatite fillers. **Acta Biomaterialia**, **7(4)**: 1693-1701.
92. Lin, Y.H., et al., 2005. Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. **Biomaterials**, **2005. 26(14)**: 2105-2113
93. Feng, Q., et al., 2016. Mechanically resilient, injectable, and bioadhesive supramolecular gelatin hydrogels crosslinked by weak host-guest interactions assist cell infiltration and in situ tissue regeneration. **Biomaterials**, **101**: 217-228.
94. Bigi, A., and et al., 2001. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, **22(8)**: 763-768.
95. Shim, W.S., et al., 2005. Novel Injectable pH and Temperature Sensitive Block Copolymer Hydrogel. **Biomacromolecules**, **6(6)**: 2930-2934.

96. Yahia, L., 2015. History and Applications of Hydrogels. **Journal of Biomedical Sciences**, **4(2)**: 13.
97. Das, S., et al., 2015. Bioprintable, cell-laden silk fibroin–gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs. **Acta Biomaterialia**, **11**: 233-246.
98. Sanmartín-Masiá, E., Poveda-Reyes, S., and Gallego Ferrer, G., 2017. Extracellular matrix–inspired gelatin/hyaluronic acid injectable hydrogels. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, **66(6)**: 280-288.
99. Augst, A.D., Kong, H.J., Mooney, D.J., 2006. Alginate hydrogels as biomaterials. **Macromolecular Bioscience**, **6(8)**: 623–633.
100. Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., Thom, D., 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg box model. **FEBS Letters**, **32**: 195–198.
101. Kulseng, B., Skjåk-Braek, G., Ryan, L., Andersson, A., King, A., Faxvaag, A., Espevik, T., 1999. Transplantation of alginate microcapsules: Generation of antibodies against alginates and encapsulated porcine islet-like cell clusters. **Transplantation**, **67**: 978–984.
102. Paige, K.T., Cima, L.G., Yaremchuk, M.J., Vacanti, J.P., Vacanti, C.A., 1995. Injectable cartilage, **Plastic Reconstructive Surgery**, **96**: 1390–1400.
103. Paige, K.T., Cima, L.G., Yaremchuk, M.J., Schloo, B.L., Vacanti, J.P., Vacanti, C.A., 1996. De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs. **Plastic Reconstructive Surgery**, **97**: 168–180.
104. Skjak-Braerk, G., Grasdalen, H., Smidsrod, O., 1989. Inhomogeneous polysaccharide ionic gels, **Carbohydrate Polymers**, **10**: 31–54,
105. Saul, J.M., Williams, D.F., 2011. Hydrogels in regenerative medicine. In: Modjarrad K, Ebnesajjad S, editors. *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices*. Elsevier; pp. 279-302.
106. Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Manivasagan, P., Kang, K-H., Kim, S-K., 2015. Alginate composites for bone tissue engineering: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, **72**: 269-281.

107. Wang, Y., 2018. Programmable hydrogels. **Biomaterials**, **178**: 663-680.
108. Gombotz, W.R., Wee, S.F., (1998). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31, 267–285.
109. Lee, K.Y.; Mooney, D.J., 2012. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 2012, 37, 106–126.
110. Leone, G., Torricelli, P., Chiumiento, A., Facchini, A., Barbucci, R., (2008) Amidic alginate hydrogel for nucleus pulposus replacement. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84(2), 391-340.
111. Venkatesan, J., Jayakumar, R., Anil, S., Chalisserry, E.P., Pallela, R., Kim, S.-K., 2015. Development of Alginate-Chitosan-Collagen Based Hydrogels for Tissue Engineering. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, **5**: 458–464.
112. Montalbano, G., Toumpaniari, S., Popov, A., Duan, P., Chen, J., Dalgarno, K., Scott, W.E., Ferreira, A.M., 2018. Synthesis of bioinspired collagen/alginate/fibrin based hydrogels for soft tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C, Materials for biological applications**, **91**: 236–246.
113. Yang, X., Lu, Z., Wu, H., Li, W., Zheng, L., & Zhao, J., 2018. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C, Materials for biological applications**, **83**: 195–201.
114. Mahou, R., Vlahos, A.E., Shulman, A.S., & Sefton, M.V., 2018. Interpenetrating Alginate-Collagen Polymer Network Microspheres for Modular Tissue Engineering. **American Chemical Society, Biomaterials Science and Engineering**, **4(11)**: 3704-3712 .
115. Kim, G., Ahn, S.H., Kim, Y., Cho, Y., Chun, W., 2011. Coaxial structured collagen–alginate scaffolds: fabrication, physical properties, and biomedical application for skin tissue regeneration. **Journal of Materials Chemistry**, **21**: 6165-6172.

116. Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., Gurny, R., 2004. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, **57(1)**: 19-34.
117. Hamed, H., Moradi, S., Hudson, S.M., Tonelli, A.E., 2018. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. **Carbohydrate polymers**, **199**: 445-60.
118. Tan, H., Lao, L., Wu, J., Gong, Y., Gao, C., 2008. Biomimetic modification of chitosan with covalently grafted lactose and blended heparin for improvement of in vitro cellular interaction, **Polymers for Advanced Technologies**, **19**: 15–23.
119. Hsieh, W.C., Chang, C.P., Lin, S.M., 2007. Morphology and characterization of 3D micro-porous structured chitosan scaffolds for tissue engineering, **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, **57**: 250–255.
120. Yuan, Y., Chesnutt, B.M., Utturkar, G., Haggard, W.O., Yang, Y., Ong, J.L., Bumgardner, J.D., 2007. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release, **Carbohydrate Polymers**, **68**: 561–567.
121. Tezel, A., and Fredrickson, G.H., 2008. The science of hyaluronic acid dermal fillers. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, **10(1)**: 35-42.
122. Lam, J., Truong, N.F. and Segura, T., 2014. Design of cell–matrix interactions in hyaluronic acid hydrogel scaffolds. **Acta Biomaterialia**, **10(4)**: 1571-1580.
123. West, D.C., and Kumar, S., 1989. Hyaluronan and angiogenesis, 187-201. *Ciba Foundation symposium*, 1989;143: discussion 201-7, 281-5.
124. Ohya, S., Nakayama, Y., Matsuda, T., 2001. Thermoresponsive artificial extracellular matrix for tissue engineering: hyaluronic acid bioconjugated with poly(N-isopropylacrylamide) grafts. **Biomacromolecules**, **2(3)**: 856-63.
125. Bergholt, M.S., Serio, A., Albro, M.B., 2019. Raman Spectroscopy: Guiding Light for the Extracellular Matrix. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, **7**: 303
126. Ember, K.J.I., Hoeve, M.A., McAughtrie, S.L., Bergholt, M.S., Dwyer B.J., Stevens M.M., et al., 2017. Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. **npj Regenerative Medicine**, **2**:12.

127. Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I.U., 2007. Raman spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, **42**: 493–541.
128. Raman, C., Krishnan, K., 1928. A New Type Of Secondary Radiation. **Nature** **121**: 501–502.
129. Puppels, G.J., C. Otto, J., Greve, M., Robert-Nicoud, M., Arndt-Jovin, D.J., Jovin, T.M., 1994. Raman microspectroscopic study of low-pH-induced changes in DNA structure of polytene chromosomes. **Biochemistry**, **33**: 3386–3395.
130. Rygula, A., Majzner, K., Marzec, K.M., Kaczor, A., Pilarczyk, M., Baranska, M., 2013. Raman spectroscopy of proteins: a review. **Journal of Raman Spectroscopy**, **44**: 1061–1076.
131. Votteler, M., Carvajal, Berrio, D.A., Pudlas, M., et al., 2012. Raman spectroscopy for the non-contact and non-destructive monitoring of collagen damage within tissues. **Journal of Biophotonics**, **5**: 47–56.
132. Sönmezer, D., Latifoğlu, F., İsoğlu, İ.A., Düzler, A., Toprak, G., Ceylan, D., 2016. Vascular tissue production by using cell component and biomaterial. *Medical Technologies congress (Tiptekno'16)*, Antalya, Turkey. 27-29 October 2016, pp.205-208
133. Latifoğlu, F., Sönmezer, D., Toprak, G., Düzler, A., İsoğlu, İ.A., Ceylan, D., 2018. Cell Isolating from Bovine Pericardial Fluid and Culturing for Next Tissue Engineering Applications. *The Eurasia Proceedings of Science Technology Engineering and Mathematics (EPSTEM)* 2018, Antalya, 4;224-229
134. Sönmezer, D., Latifoğlu, F., Toprak, G., Düzler, A., 2019. Effect of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) on Cells Isolated from Pericardial Fluid. *Medical Technologies congress (Tiptekno'19)*, 3-5 October 2019, Antalya, Turkey, 1-4.
135. Sönmezer, D., Latifoğlu, F., Toprak, G., Düzler, A., İsoğlu, İ.A., 2021. Pericardial fluid and vascular tissue engineering: A preliminary study. **Bio-Medical Materials and Engineering**, **32(2)**: 101-113.
136. Betts, J.G., DeSaix, P., Johnson, E., Johnson, J.E., Korol, O., Kruse, D.H., Poe, B., Wise, J.A., Womble, M., Young, K.A., 2015. *Anatomy and Physiology*. OpenStax, Rice University, Houston, Texas.

137. Culling, C.F.A., 1974. Handbook of histopathological and histochemical techniques (including museum technique). London, Butterworth, 553.
138. Wang, S., Goecke, T., Meixner, C., Haverich, A., Hilfiker, A., Wolkers, W.F., 2012. Freeze-dried heart valve scaffolds. **Tissue Engineering**, **18**: 517–525
139. He, Y., Chen, Y., Wan, X., Zhao, C., Qiu, P., Lin, X., Zhang, J., Huang, Y., 2020. Preparation and Characterization of an Optimized Meniscal Extracellular Matrix Scaffold for Meniscus Transplantation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, **8**: 779.
140. Sousa, I., Mendes, A., Bártolo, P.J., 2013. PCL scaffolds with collagen bioactivator for applications in Tissue Engineering. **Procedia Engineering**, **5**: 279–284
141. Berneel, E., Desmet, T., Declercq, H., Dubruel, P., Cornelissen, M., 2012. Double protein-coated poly- ϵ -caprolactone scaffolds: successful 2D to 3D transfer. **Journal of Biomedical Materials Research A**, **100**(7): 1783-17.
142. 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.
143. Hutchin, P., Nino, H.V., Suberman, R., 1971. Electrolyte and acid-base composition of pericardial fluid in man. **Archives of surgery**, **102**(1): 28–30.
144. Li, P., Liang, Lee, I., Yu, W., et al., 2014. A Novel Albumin-Based Tissue Scaffold for Autogenic Tissue Engineering Applications. **Scientific Reports**, **4**: 5600.
145. Ege, T., Canbaz, S., Yuksel, V., Duran, E., 2003. Effect of pericardial fluid pro-inflammatory cytokines on hemodynamic parameters. **Cytokine**, **23**: 47–51.
146. Kiris, I., Kapan, S., Okutan, H., Narin, C., Ozaydin, M., Cure, M.C., Sutcu, R., 2016. Relationship between site of myocardial infarction, left ventricular function and cytokine levels in patients undergoing coronary artery surgery. **Cardiovascular Journal of Africa**, **27**: 299– 306.
147. Miyazaki, T., Pride, H.P., Zipes, D.P., 1990. Prostaglandins in the pericardial fluid modulate neural regulation of cardiac electrophysiological properties. **Circulation Research**, **66**: 163–175.

148. Ristić, A.D., Pankuweit, S., Maksimović, R., Moosdorf, R., Maisch, B., 2013. Pericardial cytokines in neoplastic, autoreactive, and viral pericarditis. **Cardiac Failure Review**, **18**: 345–353.
149. Honda, A., Iwai, T., Mori, Y., 1989. Insulin-like growth factor I (IGF-I) enhances hyaluronic acid synthesis in rabbit pericardium. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, **1014**: 305–312.
150. Poon, K.W., Lyng, F.M., Knief, P., Howe, O., Meade, A.D., Curtin, J.F., Byrne, H.J., Vaughan, J., 2012. Quantitative reagent-free detection of fibrinogen levels in human blood plasma using Raman spectroscopy. **Analyst**, **137**(8): 1807–1814.
151. Dong, R., Yan, X., Pang, X., Liu, S., 2004. Temperature-dependent Raman spectra of collagen and DNA. **Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, **60**: 557–561
152. Cárcamo, J., Aliaga, Á., Clavijo, R., Brañes, M., Campos-Vallette, M., 2012. Raman study of the shockwave effect on collagens. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, **86**: 360-365.
153. Martinez, M.A., Bullock, A., MacNeil, S., Rehman, I., 2019. Characterisation of structural changes in collagen with Raman spectroscopy. **Applied Spectroscopy Reviews**, **54**: 509-542.
154. Nguyen, T.T., Gobinet, C., Feru, J., et al., 2012. Characterization of Type I and IV collagens by Raman microspectroscopy: identification of spectral markers of the dermo-epidermal junction. **Spectroscopy**, **27**: 421-427
155. Erlach, T.C., Hedegaard, M.A., Stevens, M.M., 2015. High resolution Raman spectroscopy mapping of stem cell micropatterns, **Analyst**, **140**(6): 1798–1803.
156. Kunstar, A., Leferink, A.M., Okagbare, P.I., Morris, M.D., Roessler, B.J., Otto, C., Karperien, M., van Blitterswijk, C.A., Moroni, L., van Apeldoorn, A.A., 2013. Label-free Raman monitoring of extracellular matrix formation in three-dimensional polymeric scaffolds. **Journal of the Royal Society, Interface**, **10**(86): 20130464.

157. Cárcamo, J., Aliaga, Á., Clavijo, E., Brañes, M., Campos-Vallette, M., 2012. Raman and surface enhanced Raman scattering in the study of human rotator cuff tissues after shock wave treatment. **Journal of Raman Spectroscopy**, **43**: 248-254.
158. Jastrzebska, M., Wrzalik, R., Kocot, A., Zalewska-Rejdak, J., Cwalina, B., 2003. Raman spectroscopic study of glutaraldehyde-stabilized collagen and pericardium tissue. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, **14**: 185-197
159. O'Brien, C.M., Vargis, E., Rudin, A., Slaughter, J.C., Thomas, G., Newton, J.M., Reese, J., Bennett, K.A., Mahadevan-Jansen, A., 2018. In vivo Raman spectroscopy for biochemical monitoring of the human cervix throughout pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, **218(5)**: 528.
160. Votteler, M., Carvajal, Berrio, D.A., Pudlas, M., Walles, H., Schenke-Layland, K., 2012. Non-contact, label-free monitoring of cells and extracellular matrix using Raman spectroscopy. **Journal of Visualized Experiments**, **(63)**: 3977.
161. Nguyen, T.T., Gobinet, C., Feru, J., Brassart-Pasco S., Manfait, M., Piot, O., 2012. Characterization of type I and IV collagens by Raman microspectroscopy: Identification of spectral markers of the dermo-epidermal junction. **Spectroscopy**, **27(5–6)**: 421–427.
162. Polak, R., Rodas, A.C., Chicoma, D.L., et al. 2013. Inhibition of calcification of bovine pericardium after treatment with biopolymers, E-beam irradiation and in vitro endothelization. **Materials Science, Medicine Materials science and engineering C, Materials for biological applications**, **33(1)**: 85-90.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Dilek Sönmezer

Uyruğu: Türkiye (T.C)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü	2008-2011
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Biyoloji Bölümü	2004-2008

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2014-Halen	Çukurova Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü	Yıl

YABANCI DİL

İngilizce