

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**TİMPANOPLASTİ AMELİYATINDA KULLANILMAK ÜZERE
DOKU İSKELESİNDE FİBROBLAST KÜLTÜRÜ TEMELLİ
BİYOGREFT TASARLANMASI**

HAZIRLAYAN

FATİH ÇAPANOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA- 2024

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**TİMPANOPLASTİ AMELİYATINDA KULLANILMAK ÜZERE
DOKU İSKELESİNDE FİBROBLAST KÜLTÜRÜ TEMELLİ
BİYOGREFT TASARLANMASI**

HAZIRLAYAN

FATİH ÇAPANOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. EMİR BAKİ DENKBAŞ

ANKARA- 2024

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Fatih ÇAPANOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29 / 08 / 2024

Tez Adı: Timpanoplasti Ameliyatında Kullanılmak Üzere Doku İskelesinde Fibroblast Kültürü Temelli Biyogreft Tasarlanması

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Lokman UZUN, Hacettepe Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ, Başkent Üniversitesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi Özge ERDEMLİ, Başkent Üniversitesi

.....

ONAY

Prof. Dr. Dilek ÇÖKELİLER SERDAROĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Tarih : ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih:29 / 0/08/ 2024

Öğrencinin Adı, Soyadı: Fatih ÇAPANOĞLU

Öğrencinin Numarası: 22120347

Anabilim Dalı: Biyoteknoloji

Programı: Biyoteknoloji

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Tez Başlığı: Timpanoplasti Ameliyatında Kullanılmak Üzere Doku İskelesinde Fibroblast Kültürü Temelli Biyogreft Tasarlanması

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 42 sayfalık kısmına ilişkin, 29/ 08/ 2024 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 9'dur.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

Öğrenci Danışmanı

Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

29/08/2024

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca sadece akademik değil aynı zamanda hayat dersleri de aldığım, bilgi ve tecrübesine sonsuz güvendiğim, bu zor yolda desteğini her zaman hissettiğim, o bitmez tükenmez enerjisiyle ve çalışma aşkıyla hayran kaldığım sayın danışman Hocam Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ'a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca yardım aldığım ve sabrı sayesinde her soruma karşılık bulduğum, akademik bilgisiyle yol gösteren sayın Hocam Dr. Öğr. Üyesi FİLİZ KARA'ya saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarımı yürütebilmem için laboratuvar olanaklarını sunan Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Lokman UZUN, güler yüzü, samimiyeti ve her türlü yardımlarıyla yanımda olan Sena PİŐKİN'e saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans sürecimi, deneysel çalışmalarımı ve laboratuvar ortamımı keyifli hale getiren, üzöldüğümde üzölen sevindiğimde sevinen, yardımlarını hiç esirgemeyen can arkadaşlarım Ayşenur ACUNER'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu zorlu süreçte sabır ve anlayışla desteklerini her zaman hissettiğim sevgili eşim ve oğullarım olmak üzere tüm aileme teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

FATİH ÇAPANOĞLU

TİMPANOPLASTİ AMELİYATINDA KULLANILMAK ÜZERE DOKU İSKELETİNDE FİBROBLAST KÜLTÜRÜ TEMELLİ BİYOGREFT TASARLANMASI

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

2024

Timpanoplasti ameliyatı başta orta kulak iltihabı olmak üzere değişik nedenlerle kulak zarındaki perforasyonun tamir edildiği bir ameliyattır. Burada onarım için genellikle temporal kas fasyası, tragal kartilaj, perikondrium, yağ gibi otogreft malzemeleri sıklıkla kullanılmakta ve ameliyatların bir kısmında greft başarısızlığı ile karşılaşmaktadır. Ameliyatta yaşanan zorluklar, greft uygulama başarısızlığı, ameliyat sonrası komplikasyonlar timpanoplastinin olumsuzluklarıdır. Sağlık biyoteknolojisi ve yapay organ tasarımında yaşanan ilerlemeler timpanoplastide biyogreft kullanımını yaygınlaştırmıştır. Sunulan çalışmada; timpanoplastide kullanılmak üzere biyolojik olarak bozunabilen ve biyouyumlu malzemelerin kullanıldığı doku iskeleleri hazırlanması, bu doku iskelesinin hücre gelişimini destekleyecek büyüme faktörleriyle donatılması ardından fibroblast hücreleriyle entegre edilerek uygun mekanik dayanıklılık ve kararlılıkta timpanoplasti ameliyatlarında kullanılacak biyogreftlerin tasarlanması planlanmıştır.

Bu amaçla ipek fibroin esaslı doku iskeleleri, sadece polikaprolakton polimeri kaynaklı doku iskelesi ve polikaprolakton üzerine ipek fibroin ile kaplanarak doku iskeleleri hazırlanmıştır. Hazırlanan doku iskelelerine epidermal büyüme faktörü (EGF) emdirilmek suretiyle entegre edilen fibroblastların canlılığının desteklenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen doku iskeleleri ortalama fiber çapı, biyoaktif molekül salınımı ve entegre edilen hücrelerin canlılığı parametreleri karşılaştırılmıştır.

İpek fibroin, literatürde uygulanan yöntemler ışığında ipek böceği kozasından elde edildikten sonra trifloroasetik asit ile, polikaprolakton biyopolimeri ise kloroform ve dimetil formamid karışımı içerisinde çözülerek elektroçirme için hazırlanmıştır.

Sonraki çalışmalarda biyopolimerler elektroçirme sistemi kullanılarak mikro-nanofiber formunda doku iskeleleri oluşturulmuştur. Yapılan çalışmalarda enjektörün ucundaki iğne ile toplayıcı arasındaki mesafe (10-20 cm arası) ve uygulanan yüksek voltaj değeri (10-30 kV) değiştirilerek parametre değerlendirmesi yapmak üzere uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Burada ipek fibroin esaslı doku iskeleleri, polikaprolakton üzerine ipek fibroin ile kaplama ve sadece polikaprolakton polimeri kullanılarak doku iskeleleri hazırlanmıştır.

Hazırlanan doku iskelelerinin morfolojik değerlendirmeleri taramalı elektron mikroskobu, SEM ile yapılmıştır. Gerekli optimizasyon çalışmalarının ardından membran-hücre entegrasyonunu arttırmak üzere doku iskelelerine farklı miktarlarda (10-20-40 µg EGF/mg doku iskelesi) epidermal büyüme faktörü (EGF) emdirilmiştir. Elde edilen yapılardan in vitro olarak PBS özeltisi içerisinde farklı ortam sıcaklıklarında (+4°C, 25°C ve 37°C'ta) in vitro salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmaların son bölümünde ise hazırlanan EGF yüklü doku iskelelerinden EGF salımı zamana bağlı olarak değerlendirilmiştir. Burada da ortam sıcaklığı ile EGF yükleme oranı temel parametreler olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre ortalama çapları parametrelere bağlı olarak 100-500 nm aralığında değişen nanofiberlerden oluşan ipek fibroin ve polikaprolakton doku iskeleleri hazırlanmıştır. Hazırlanan doku iskelelerine emdirilen EGF'lerin önemli bir bölümü ilk altı saat içerisinde ortama salınmıştır. Salım hızının sıcaklık ve EGF derişiminin artmasıyla arttığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürdeki sonuçlarla uyumlu bulunmuştur. Son olarak gerçekleştirilen L929 fibroblast hücrelerinin ekimi sonrasında yapılan MTT Assay testiyle, hazırlanan doku iskelelerinin biyolojik uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Timpanoplasti, doku iskelesi, ipek fibroin, polikaprolakton, yapay kulak zarı

ABSTRACT

FATİH ÇAPANOĞLU

DESIGNING A FIBROBLAST CULTURE BASED BIOGRAFT IN THE TISSUE SCAFFOLD FOR USE IN TYMPANOPLASTY SURGERY

Başkent University Institute of Science and Technology

Department of Biotechnology

2024

Tympanoplasty surgery is an operation in which the perforation of the eardrum is repaired for various reasons, especially inflammation of the middle ear. Autograft materials such as temporal muscle fascia, tragal cartilage, perichondrium, fat are often used for repair here and graft failure is encountered in some surgeries. Difficulties experienced during surgery, graft application failure, postoperative complications are the disadvantages of tympanoplasty. Advances in health biotechnology and artificial organ design have made the use of biograft in tympanoplasty widespread. In the presented study, it is planned to prepare tissue scaffolds using biodegradable and biocompatible materials for use in tympanoplasty and to design biografts with appropriate mechanical durability and stability by integrating them with fibroblast cells.

In For this purpose, silk fibroin-based tissue scaffolds, tissue scaffolds based only on polycaprolactone polymer, and tissue scaffolds were prepared by coating silk fibroin on polycaprolactone. It is aimed to support the viability of integrated fibroblasts by impregnating the prepared tissue scaffolds with epidermal growth factor (EGF). The obtained tissue scaffolds were compared with their average fiber diameter, bioactive molecule release and viability parameters of the integrated cells.

Silk fibroin was obtained from silkworm cocoon in the light of the methods applied in the literature. And than Silk fibroin was prepared for electrospinning by dissolving it in trifluoroacetic acid and polycaprolactone biopolymer in a mixture of chloroform and dimethyl formamide.

Subsequent studies, tissue scaffolds in the form of micro-nanofibers were created using the biopolymers electrospinnig system. In the studies, the distance between the needle at the end of the injector and the collector (between 10-20 cm) and the applied high voltage value (10-30 kV) were changed and applications were made to evaluate the parameters. Here, tissue scaffolds based on silk fibroin, coated with polycaprolactone fibers and tissue scaffolds were prepared using only polycaprolactone polymer.

Morphological evaluations of the obtained tissue scaffolds were performed using scanning electron microscopy, SEM. After the necessary optimization studies, epidermal growth factor (EGF) was impregnated in different amounts (10-20-40 mg EGF/mg tissue scaffold) on tissue scaffolds to increase membrane-cell integration. From the obtained

structures, in vitro release experiments were performed in different ambient temperatures (at +4°C, 25°C and 37°C) release of PBS solution. In the last part of the studies, EGF release from the prepared EGF-loaded tissue scaffolds was evaluated depending on time. Here, the ambient temperature and the EGF loading rate are evaluated as the basic parameters.

According to the results obtained, silk fibroin and polycaprolactone tissue scaffolds consisting of nanofibers with average diameters between 100-500 nm depending on the parameters have been prepared. A significant part of the EGFs impregnated into the prepared tissue scaffolds were released into the environment within the first six hours. It was determined that the release rate increased with increasing temperature and EGF concentration. The results obtained were found to be compatible with the results in the literature. Finally, with the MTT Assay test performed after the cultivation of L929 fibroblast cells, it was concluded that the prepared tissue scaffolds were biologically compatible.

Keywords: Tympanoplasty, tissue scaffold, silk fibroin, polycaprolactone, artificial eardrum

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLOLAR LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kulak Yapısı.....	2
2.1.2 Timpanik Membran Anatomik ve Fizyolojik Yapısı.....	2
2.1.3. Timpanik Membran Hasarları ve Geleneksel Tedavi Yöntemleri...3	
2.1.4. Timpanik Membran Hasarlarında Klinik Değerlendirmeler.....4	
2.1.5 Timpanik Membran Hasarlarının Onarımında Cerrahi Girişimler	4
2.2. Timpanik Membran Hasarlarının Biyomalzemeler ile Onarımı.....5	
2.2.1. Biyomalzeme Olarak Doğal Polimerler	5
2.2.2 .Biyomalzeme Olarak Sentetik Polimerler	5
2.2.3. Biyofabrikasyon Yöntemleri ile Timpanik Membran Geliştirilmesi..6	
2.4. Eklemeli İmalat Yöntemleri.....6	
2.4.1. Seçimli Lazer ile Sinterleme	6
2.4.2. Eletroegirme Yöntemleri	7
2.4.3. Hibrit Biofabrikasyon Yöntemleri.....8	
2.5. Timpanik Membran Hasarlarının Onarımında Büyüme Faktörlerinin Kullanımı.....	8
2.6. Timpanik Membran Hasarlarının Onarımında Hücre Tedavileri	8
2.7.1 Timpanik Membran Onarımlarının Geleceği	9

2.7.2.	Timpanik Membran Onarımına Karşılık Yeniden Şekillendirme	10
2.7.3.	Teknik ve Fonksiyonel Özelliklerin Geliştirilmesi.....	10
2.8.	Polikaprolakton	10
2.8.1.	Polikaprolakton Yapısı ve Özellikleri	11
2.8.2.	Polikaprolaktonun Doku Mühendisliğindeki Yeri ve Önemi....	12
2.9.	İpek Fibroin.....	13
2.9.1.	İpek Fibroin Yapısı ve Özellikleri	13
2.9.2.	İpek Fibroin Doku Mühendisliğindeki Yeri ve Önemi	14
2.10	Büyüme Faktörleri	15
2.10.1	Büyüme Faktörlerinin Çeşitleri	15
2.10.2.	Büyüme Faktörlerinin Uygulama Alanlarına Göre Değerlendirilmesi	16
3.	MATERYAL METOD.....	17
3.1	Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	17
3.2	İpek Böceği Kozalarından İpek Fibroin Eldesi.....	17
3.3.	Elektroçirme ile Doku İskelesi Hazırlanması.....	18
3.3.1.	İpek Fibroin Doku İskelesi Hazırlanması.....	19
3.3.2.	Polikaprolakton Doku İskelesi Hazırlanması.....	20
3.3.3	İpek Fibroin Çözeltisine Naylon 6, Naylon 6/10 Eklenmesi.....	21
3.3.4	Polikaprolakton ve İpek Fibroin Yapının Katmanlı Olarak Hazırlanması.....	21
3.4.	Elektroçirme ile Hazırlanan Doku İskelelerinin Karakterizasyonu.....	21
3.4.1.	Morfolojik Değerlendirmeler.....	21
3.4.2.	Mekanik Özelliklerin Değerlendirilmesi.....	22
3.5.	Doku İskelelerinin Büyüme Faktörü ile Donatılması.....	22
3.5.1.	Doku İskelelerine Büyüme Faktörü Yüklenmesi.....	23

3.5.2.	Doku İskelelerinden Büyüme Faktörü Salım Çalışmaları.....	23
3.6.	Doku İskeleleri ile Yapılan Hücresel Testler (Biyouyumluluk Testleri).....	24
4.	DENEYSEL BULGULAR.....	26
4.1.	İpek Böceği Kozalarından Elde Edilen İpek Firoinin Özellikleri	26
4.2.	Elektroeğirme ile Hazırlanan Doku İskelelerinin Karakterizasyonu.....	26
4.2.1.	Morfolojik değerlendirmeler	26
4.2.2.	Mekanik Testler	32
4.3.	Doku İskelelerinden EGF Salım Davranışları.....	33
4.3.1.	Doku İskelelerinden EGF Salımına Ortam Sıcaklığının Etkisi ..	34
4.3.2.	Doku İskelelerinden EGF Salımına EGF Yükleme Miktarının Etkisi	35
4.4.	Doku İskeleleri-Hücre Etkileşimleri (MTT Testleri)	35
4.4.1.	PCL Doku İskelesinde Yer Alan EGF Derişiminin Hücre Canlılığına Etkisi	36
4.4.2.	PCL-SF Doku İskelesi üzerinde EGF derişiminin Hücre Canlılığına Etkisi	37
4.4.3.	Eşit EGF İçerikli PCL ve PCL-SF Doku İskelelerinin Hücre Canlılığına Etkisi	38
4.4.4.	EGF İçeren PCL ve PCL-SF Doku İskelelerinin Hücre Canlılığına Etkisi	39
5.	SONUÇLAR.....	41
6.	KAYNAKLAR.....	43
7.	EKLER.....	51

EK.1. EGF spektrofotometrik dalga boyu tarama grafiği

EK.2. EGF salım deneylerinde kullanılan Absorbans/Derişim kalibrasyon grafiği

EK.3. Doku iskelesi-Hücre etkileşimlerinde elde edilen MTT değerleri

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	İşitme ve denge organı kulağın şematik çizimi.....	2
Şekil 2.2	Timpanik membran bölümleri.....	3
Şekil 2.3	Timpanik membran histolojisi.....	3
Şekil 2.4	Timpanik membran üzerindeki kök hücrelerin, progenitör hücrelerin ve keratinositlerin şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.5	Polikaprolakton zincir görünümü.....	11
Şekil 2.6	İpek fibroin şematik yapısı.....	14
Şekil 2.7	İpek fibroinin kullanım formları ve biyomedikal uygulamalar örnekler.....	15
Şekil 3.1	İpek böceği kozasından ipek fibroin proteinin elde edilmesi prosedürü	18
Şekil 3.2	Elektroegirme sistemi düzeneğinin şematik görünümü.....	19
Şekil 4.1	İpek Fibroin Proteini ile Elde Edilen Nanofibriler Matriks SEM Fotoğrafı.....	27
Şekil 4.2	SF Nylon-6/10 Nanofibriler Matriks SEM Fotoğrafı.....	28
Şekil 4.3	PCL ile Elde Edilen Nanofibriler Matriks SEM Fotoğrafı.....	28
Şekil 4.4	PCL Üzerine İpek Fibroin Nanofiberlerin Kaplanmasıyla Elde Edilen Nanofibriler Matriks SEM Fotoğrafı (İpek Fibroin fiber tarafı)	29
Şekil 4.5.	PCL Üzerine İpek Fibroin Nanofiberlerin Kaplanmasıyla Elde Edilen Nanofibriler Matriks SEM Fotoğrafı (PCL fiber tarafı)	29
Şekil 4.6	İpek Fibroin Nanofiberlerin PCL ile ve Nylon 6/10 kullanımıyla elde edilen nanofibriler yapıların değerlendirilmesi	30
Şekil 4.7 .	İpek fibroin nanofiberlerin pcl ile kullanımıyla elde edilen çift tabakalı matrikslerde nanofibriler yapıların değerlendirilmesi	31
Şekil 4.8.	İğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafenin elde edilen matrikslerdeki nanofiber çaplarına etkisi	32
Şekil 4.9.	PCL Doku iskelesine uygulanan kuvvete karşılık gerinim eğrisi	33

Şekil 4.10 Doku iskelesinden EGF salımına ortam sıcaklığının etkisi	34
Şekil 4.11. Doku iskelesinden EGF salımına EGF yükleme miktarının etkisi.....	35
Şekil 4.12. Farklı miktarlarda EGF içeren PCL doku iskelelerinin hücre canlılığına etkisi.....	36
Şekil 4.13 Farklı miktarlarda EGF içeren PCL-İpek Fibroin doku iskelelerinin hücre canlılığına etkisi.....	37
Şekil 4.14 Eşit miktarlarda EGF içeren PCL-İpek Fibroin doku iskelelerinin hücre canlılığına etkisi.....	38
Şekil 4.15 EGF içeren ve içermeyen PCL ve PCL-İpek Fibroin doku iskelelerinin hücre canlılığına etkilerinin genel değerlendirilmesi.....	39
Şekil 4.16. Polikaprolakton doku iskelesinde gözlenen L929 fibroblast hücreleri SEM görüntüsü	40

TABLULAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 Polikaprolaktonun fiziksel özellikleri.....	12
Tablo 3.1. İpek fibroin mikro-nanofiber doku iskeleleri için kullanılan parametreler.....	20
Tablo 4.1 PCL mekanik test sonuçları.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
Eİ	Eklemeli İmalat
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
g	Gram
IGF-1	İnsulin-Benzeri Büyüme Faktörü
kDa	Kilo Dalton
LiBr	Lityum Bromür
M	Molar
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromide
Na ₂ CO ₃	Sodyum bikarbonat
PBS	Fosfat Buffer Solne
PCL	Polikaprolakton
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGA	Poliglikolikasit
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Polilaktik-Ko-Glikolik Asit
PRP	Trombositten Zengin Plazma
PU	Poliüretan
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SF	İpek Fibroin
SLS	Seçici Lazer Sinterleme
TFA	Trifluoroasetik Asit
TGF-B	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TM	Timpanik Membran
UV	Ultraviyole
w/v	gram/ hacim
µg	Mikrogram

1.GİRİŞ

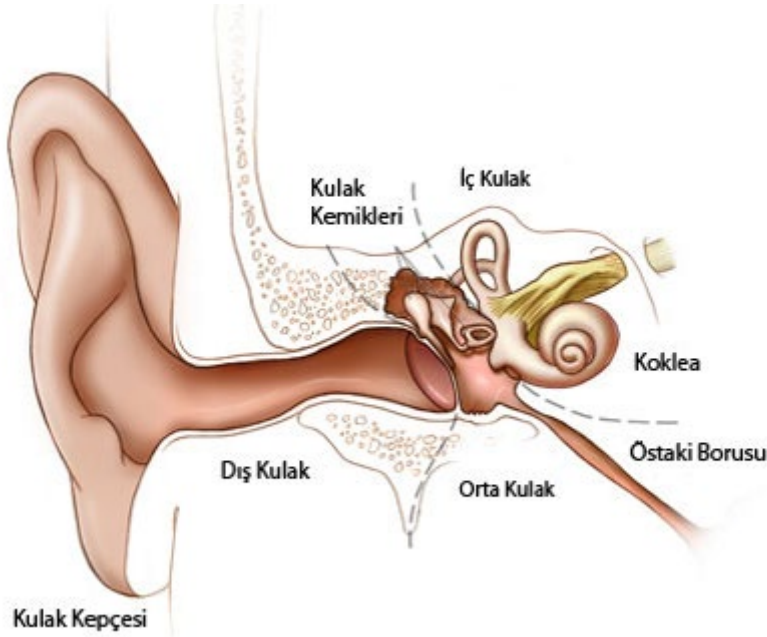
Kronik otitis media kulak zarının bütünlüğünün bozulduğu işitme kaybı ve kulak akıntısı gibi hayat kalitesini bozan bulguların ön planda olduğu, ilerleyen vakalarda baş dönmesi, yüz felci, beyin apsesi gibi ciddi komplikasyonlara yol açabilen bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda toplumda % 0,45-%3 [1] arasında değişen oranlarda görülmektedir. Sosyoekonomik şartların kötü olduğu toplu yaşam ve hijyen eksikliğini görüldüğü çevrelerde kronik otitis media görülme sıklığı artmaktadır. Timpanoplasti kulak zarındaki perforasyonun tamir edildiği, gerektiğinde kemikçik zincir bozukluğunun düzeltildiği ameliyat olup kronik otitis medialı hastaların tedavisinde sıklıkla uygulanmaktadır. Timpanoplasti ameliyatlarında kulak zarındaki defektin onarılması için doku reddinin gözlenmediği temporal kas fasyası, tragal kartilaj, perikondrium, yağ gibi [2] otogreft materyalleri sıklıkla kullanılmaktadır. Kronik otittin yaygınlığına göre gerektiğinde kulak arkasındaki mastoid kemikten iltihabın temizlendiği mastoidektomi de prosedür olarak uygulanmaktadır. Timpanoplasti ameliyatlarında postauriküler, endaural ve son zamanlarda gittikçe yaygınlaşan daha az invazif bir yöntem olarak endoskopik yaklaşım uygulanmaktadır. Timpanoplasti ameliyatlarında greft başarısı %75- %90 oranında rapor edilmiştir [3]. Ameliyat yöntemindeki zorluklar, greft başarısızlığı, ameliyat sonrası görülen komplikasyonlar bu ameliyatların yeterince yapılmasına engel teşkil etmektedir.

Biyoteknoloji alanındaki gelişmeler ve yapay organ tasarımındaki ilerlemeler timpanoplastide biyogreft kullanımını son yıllarda yaygınlaştırmaktadır. [4] Bu bağlamda birçok doku iskelesi, hücre, büyüme faktörü kullanılarak çalışma yapılmıştır. Timpanoplasti ameliyatında kullanılmak üzere doku iskelesi hazırlamak ve fibroblast hücreleri ile entegre ederek uygun sağlamlık, kararlılık ve biyouyumlu bir biyogreft tasarlanması planlanmaktadır. Bu amaçla ipek fibroin esaslı doku iskeleleri, sadece polikaprolakton polimeri kaynaklı doku iskelesi ve polikaprolakton üzerine ipek fibroin ile kaplanarak doku iskeleleri hazırlanmıştır. Hazırlanan doku iskelelerine epidermal büyüme faktörü (EGF) emdirilmek suretiyle entegre edilen fibroblastların canlılığının desteklenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen doku iskeleleri ortalama fiber çapı, biyoaktif molekül salınımı ve entegre edilen hücrelerin canlılığı parametreleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen biyogreftin timpanoplasti ameliyatlarında kullanılmasıyla operasyon süresinin kısılması, komplikasyonların azalması ve başarı oranının artması planlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kulak Yapısı

Kulak, canlı organizmalarda dış ortamdan gelen ses dalgalarının algılanmasında mekanik enerjinin beyin tarafından yorumlanabilir elektrik enerjisine dönüştürüldüğü, bu süreçte meydana gelen kayıpların telafi edildiği, aynı zamanda hayati bir fonksiyon olan dengenin sağlanmasında kritik rolü olan mükemmel bir duyu organıdır.



Şekil 2.1 İtme ve denge organı kulağın şematik çizimi

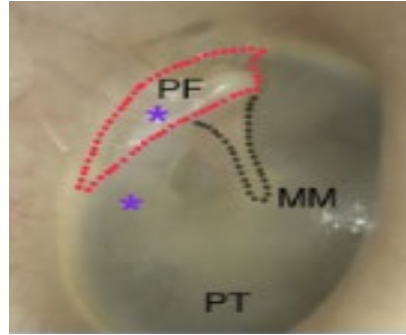
Kulak kepçesi dış kulak yolu dışkulağın, timpanik membran (TM), kulak kemikçikleri, östaki borusu orta kulağın, semisirküler kanallar koklea ve vestibulokoklear sinirin başlangıç bölümü ise iç kulağı oluşturmaktadır (Şekil 2.1).

2.1.2. Timpanik Membran Anatomik ve Fizyolojik Yapısı

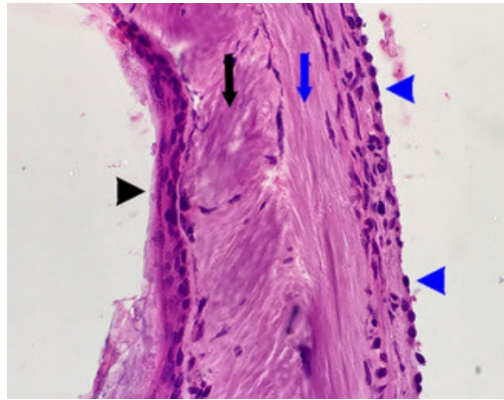
Orta kulak yapıları içerisinde sayılan kulak zarı, ve dış kulak yolu ile orta kulağı birbirinden ayıran, dış ortamdan gelen seslerin oluşturduğu titreşimin orta kulak kemikçik sistemine iletimini sağlayan insanlarda yaklaşık olarak 1 cm çapında dairesel yapıda anatomik yapıdır. Pars flaksida ve ve pars tensa olma üzere iki ana bölümden oluşur. Pars tensa kulak kemikçiklerinden malleusun sap kısmına tutunmaktadır (Şekil 2.2.). Ses iletiminde ana rol oynayan bölge pars tensa olup, pars flaksidada fibröz tabaka zayıf olarak

bulunmaktadır (Şekil 2.3.). Pars tensa ve pars flaksida bileşimi kulak zarı perforasyonlarının onarılmasında kök hücreler için kaynak oluşturmaktadır (Şekil 2.4.). Dış ortandan gelen ses dalgaları, kulak kepçesi ve dış kulak yolu vasıtasıyla kulak zarına ulaşır ve ses enerjisinin kulak zarında oluşturduğu titreşim malleusa (çekiç kemiği) aktarılır.Mevcut titreşim, inkus (örs) ve stapes (üzengi) kemikleri yoluyla stapes tabanına oradan da kokleaya iletilir.

TM ile stapes tabanının arasında 17 kat büyüklük farkı ve kemikçik zincirdeki kaldıraç mekanizmasında da 1,3 kat kazanç elde edilmesi sonucu yaklaşık 22 kat ses şiddeti arttırılır ki bu da hava ortamından sıvı ortama geçişte gerçekleşen enerji kaybını telafi etmektedir.



Şekil 2.2. Timpanik membran bölümleri PT: Pars tensa, PF Pars flaksida MM: Manibrium mallei [5].



Şekil 2.3. Timpanik membran histolojisi: Siyah ok ucu keratinize yassı epitel, mavi ok ucu kübik epitel, siyah ok radial kollajen lifler, mavi ok sirküfarenseyel kollajen lifler[6].

2.1.3. Timpanik Membran Hasarları ve Geleneksel Tedavi Yöntemleri

TM bütünlüğünün bozulması süre bakımından akut ve kronik olarak ikiye ayrılmaktadır. Akut zar perforasyonu genellikle bir travma veya enfeksiyon neticesinde kulak zarının delinmesi sonucu ortaya çıkar. Akut perforasyonlar yüzde 70-90 oranında spontan olarak iyileşme oranına sahiptir. Kronik perforasyonlar ise 3 ay boyunca TM defektinin kapanmadığı veya persistan akıntıyla birlikte enflamasyonun devam ettiği olgularda gözlenmektedir. Akut perforasyon onarımında klasik olarak sigara kağıdı ile

kapama ülkemizde en sık uygulanan ucuz ve pratik yöntemken [7] çeşitli çalışmalarda ipek patch, gelfoam patch gibi materyaller kullanılmıştır [8]. Kronik zar perforasyon onarımında ise timpanoplasti prosedürü uygulanmaktadır. Timpanoplasti kulak zarındaki perforasyonun tamir edildiği, gerektiğinde kemikçik zincir bozukluğunun düzeltildiği ameliyat olup kronik otitis medialı hastaların tedavisinde sıklıkla uygulanmaktadır. Bu operasyonda sıklıkla kullanılan greftler temporal faysa, kıkırdak, perikondrium, periost, ven, yağ doku, veya deri olarak sıralanabilir [9]. Kronik otittin yaygınlığına göre gerektiğinde kulak arkasındaki mastoid kemikten iltihabın temizlendiği mastoidektomi de prosedür olarak uygulanmaktadır.

2.1.4. Timpanik Membran Hasarlarında Klinik Değerlendirmeler

TM perforasyonlarında tedavi kararı; perforasyonun akut veya kronik olması, zardaki defektin lokalizasyonu, defektin büyüklüğü, eş zamanlı enfeksiyon veya kolestatom gibi ilave hastalıkların varlığı değerlendirilerek alınmaktadır. Akut, posterior veya medial yerleşimli genellikle 3 mm'yi aşmayan perforasyonlar daha az invaziv müdahale ile düzelirken, kronik anterior yerleşimli, geniş perforasyonlar, enfeksiyon veya kolestatom varlığı, yapılacak müdahalenin boyutunu arttırırken iyileşme şansını azaltan durumlardır.

2.1.5. Timpanik Membran Hasarlarının Onarımında Cerrahi Girişimler

Kulak zarı onarımında bugüne kadar birçok teknik bildirilmiştir. Klasik olarak kulak kepçesinin arkasından (postauriküler) veya önünden endaural insizyonla kulak zarına ulaşım mümkünken günümüzde daha az invaziv olan endoskopik yaklaşım gittikçe yaygınlaşmaktadır. Kulak zarına yerleştirilecek greft materyalinin yerleştirme tekniğine göre kulak zarı üzerine (overlay), kulak zarı ile malleus kemiği arasına (over-underlay) ve malleus kemiği altına (underlay) olmak üzere çeşitli yöntemler tarif edilmiştir. Son iki yöntemde dışkulak yolu ve timpanik membran yerinden kaldırılmakta ve greft materyali kaldırılan flep altına yerleştirilmektedir. Yine son zamanlarda defekt boyutuna uygun kıkırdak dokunun şekillendirilerek zar üzerine yerleştirildiği butterfly tekniği artan sıklıkla uygulanmaktadır [10,11].

2.2. Timpanik Membran Hasarlarının Biyomalzemeler ile Onarımı

Günümüzde hasta konforunun artırılması, cerrahi işlem süre ve komplikasyonlarının azaltılması, maliyet gibi konular daha az invaziv yöntemlerin tercih edilmesine yol açmaktadır. Bu bağlamda hastadan alınan otogreftler yerine dışarıda üretilen biyomalzemeler bu ihtiyacı karşılamaktadır. Bu amaçla kullanılan doku iskelesi malzemeleri deselülarize doku ve polimer olarak ikiye ayrılmaktadır. Deselülarize dokuya kadavra veya domuz peritonunda alınan aselüler kollajen, insan kaynaklı cryo-dried aselüler dermal doku matriksi deselülarize domuz mesanesi, domuz ince barsak submukozası, sığır ve at perikard dokusu sayılabilir. Tüm bu örneklerin birçoğunun insan çalışması olmamakla birlikte uygulamasında birçok etik ve biyogüvenlik sorunları barındırmaktadır [12]. Biyomateryal olarak polimerlere gelince bu grupta birçok seçenek karşımıza çıkmaktadır. Silk fibroin, kitosan, polikaprolakton, kalsiyum alginat, hyaluronik asit, gliserol subasetat gibi birçoğunun klinik modeli denenmiş, güvenliği kanıtlanmış uygulanabilir timpanik membran ve diğer dokuları rahatlıkla taklit edebilen biyomateryaller üretilmiştir [12].

2.2.1. Biyomalzeme Olarak Doğal Polimerler

Biyomalzeme olarak kullanılan biyomateryallerde, özellikle doku iyileşmesi sırasında dokuya destek olması, kemotaksis ve hücre büyümesine imkan sağlaması, gerektiğinde anti mikrobik veya büyüme faktörlerinin salınmasını sağlaması gibi özellikler aranmaktadır. Bu bağlamda doğal polimer olarak adlandırılan biyomateryal ürünler canlı organizmalar tarafından sentezlenen monomer olarak amino asit veya monosakkaritlerin veya her ikisinin değişen sıklıkta tekrarlanmasıyla sentezlenmiştir. Bu polimerlerin biyoyumlu olmaları, aynı zaman da dokuda hücre proliferasyonunu teşvik etmeleri, antimikrobiyal özellikte olmaları, kolay ulaşım ve maliyetlerinin düşük olması gibi avantajları mevcuttur [13]. Doğal polimerlere örnek olarak kollajen, aljinat, hyalüronik asit, silk fibroin, kitosan, selüloz örnek gösterilebilir [14].

2.2.2. Biyomalzeme Olarak Sentetik Polimerler

Sentetik polimer sınıfındaki biyomateryallerde biyoyumluluk, biyoçözünürlük ve ihtiyaca göre tekrarlanabilir üretim özellikleri bulunmaktadır. Bu sınıfa polivinil alkol (PVA), polietilen oksit (PEO), polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA), polietilen glikol (PEG) ve poliüretan (PU), örnek gösterilebilir. Fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikler doğal polimerlerden farklı olarak

ihtiyaca göre şekillendirmek istenen sentetik biyopolimerlerin avantajı olsa da genel olarak maliyet ve ekstraselüler matrikse bazı noktalarda yapısal olarak benzememesi dezavantaj olarak değerlendirilmektedir [15].

2.2.3. Biyofabrikasyon Yöntemleri ile Timpanik Membran Geliştirilmesi

Biyofabrikasyon yöntemleri, eksik doku tamamlanana kadar implanta eklenen hücrelerin canlılığının sağlandığı doku histolojisine uyumlu ekstraselüler matriks benzeri yapı üretme işlemidir. 3 boyutlu baskı ve elektroçizme gibi yöntemler gözenekli yapılar ve canlı hücrelerin doku yapısına benzer şekilde 3 boyutlu karmaşık organoidlerin üretilmesine izin verdiği için doku mühendisliği uygulamalarına imkan vermektedir. [16]

Timpanik membran kalınlığı 100 mikrondan az, iki epitel tabakası arasında radyal ve sirküler tarzda kollagen liflerin uzandığı vibrasyon özelliği olan gergin vasıfta zar yapısıdır. Timpanik membran için yapılan biyofabrikasyon yöntemlerinin bu özellikleri dikkate alınması gerekmektedir.

Biyofabrikasyon ve diğer eklemeli imalat (Eİ) türleri arasındaki temel fark, hücrelerle birlikte biyomürekkep olarak adlandırılan hidrojellerden geliştirilen, basılı, biyomalzemedeki hücrelerin dahil edildiği doku kültürlerini içermesidir. Biyomürekkebe dahil edilen çeşitli sitümölan moleküller yardımıyla, doku rejenerasyon, proliferasyon ve migrasyon süreçlerini yönlendirmek mümkün olabilmektedir [17].

2.4. Eklemeli İmalat Yöntemleri

Eklemeli imalat yöntemleri doku iskelesi yapımında 3 boyutlu yapıdan esinlenerek katman üstüne katman konarak üretim yapılmasını sağlar [18]. Stereolitografi (SLA), selektif lazer sinterleme (SLS), 3 boyutlu printing (3DP), ve kaynaşmış depozisyon modelling (FDM) olarak 4 alt kategoriye ayrılır.

2.4.1. Seçimli Lazer ile Sinterleme

Seçici lazer sinterleme (SLS), Deckard (1989) tarafından geliştirilmiş ve patentlenmiştir ve yüksek yoğunluklu bir lazer ışını kullanılarak bir polimer, seramik veya hibrit toz yatağının seçici yoğunluk kontrollü malzeme geliştirmesine dayanmaktadır. Seçici parçacık bağlamayla bir katman oluşturulduktan sonra yeni bir toz yatağı bir öncekinin üzerine bir silindirle mekanik olarak yayılır. Sinterleme işlemi, parçacıkları birbirine bağlayabilecek uygun lazer yoğunluğuyla gerçekleştirilir. Yapışkan bir 3D yapı oluşturmak

için bir katman ve ayrıca bitişik katmanlar arasında. Ayrışmış veya sinterlenmemiş alanlar, sonraki katmanlar için destek görevi görür [18]. SLS tarafından hazırlanan iskelelerin mekanik özellikleri ve boyutu, yapım düzlemine, üretim yönüne, tarama aralığına, parçacıkların boyutu ve lazer yoğunluğu gibi işlem parametrelerine büyük ölçüde bağlıdır [19].

2.4.2. Elektroğirme Yöntemleri

Elektroğirme (elektrospinnig) çeşitli derişimlerde hazırlanan polimer çözeltilerinden nano/mikro ölçekteki fiberlerin (lif) üretilmesine imkan sağlayan bir tekniktir. Elektroğirme tekniği ile üretilen nanofiberler fibriler yapı dolayısıyla olağanüstü yüzey alanı/hacim oranına, kontrol edilebilir gözenek yapısına, esnek yüzey özelliklerine, yüksek gözenekliliğe, yüksek işlevsellik gibi birçok avantaja sahiptir [20]. Bu teknik ile çeşitli formlarda (gelişigüzel ya da doğrusal düzende) örülmemiş fiberler elde edilebilir. Elde edilen doku mühendisliği iskeleleri, kas, kan damarları, sinir, kemik, yara örtüleri, ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılabilirler [21].

Elektroğirme sistemi genel olarak üç temel elemandan oluşur; yüksek voltaj kaynağı, nanofiberleri toplayıcı zemin ve polimer fırlatılan kılcal boru. Bu yöntemde, polimer çözeltisi ucundaki iletken kılcal bölgeye ve bir toplayıcıya yüksek voltaj uygulanır. Polimer çözeltisine uygulana voltajı oluşturduğu yüzey yükü, yüzey gerilimini aştığında bir polimer çözeltisi jeti Taylor konisi adı verilen yapının ucundan toplayıcıyı hedefleyecek şekilde itilir. Jetin kararsızlığı nedeniyle de polimer sıvısının çözücüsü buharlaşarak uzaklaşır [22]. Sonuç olarak toplayıcı zemin üzerinde çözücüsü buharlaşmış nanofiber yapılar elde edilir.

Elektroğirme ile üretilen nanofiberlerin özelliklerinin belirlenmesinde çözücünün cinsi, çözelti viskozitesi, çözelti iletkenliği, yüzey gerilimi, voltaj, toplayıcı mesafesi, akış hızı, toplayıcı cinsi, sıcaklık ve nem önemli rol oynamaktadır [23].

2.4.3. Hibrit Biofabrikasyon Yöntemleri

Hibrit biyofabrikasyon farklı biyomateryal üretim modellerin dezavantajlarını minimize ederek istenen yapıya daha yakın biyomalzeme üretme yöntemleridir. 3 boyutlu biyobasım ile elektrooğırme yöntemlerinin bir biyomateryal yapımında katmanlı olarak kullanılması hibrit biyofabrikasyona örnektir [24].

2.5. Timpanik Membran Hasarlarının Onarımında Büyüme Faktörlerinin Kullanımı

Timpanik membran hasarlarının onarımı sırasında epitelyal migrasyon ve proliferasyon kritik rol oynamaktadır. Dışarıdan verilen growth faktörler migrasyon ve proliferasyon süreçlerinin gelişimine katkı sağlar [25]. Epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü- beta (TGF- β) ve insulin-benzeri büyüme faktörü büyüme faktörlerinin ana grubunu oluşturmaktadır.

EGF, DNA , RNA protein ve ekstraselüler hyaluronik asit sentezini uyarır. Hasar sonrası timpanik membran epitelinde EGF molekülüne karşı reseptör sayısı artmasa da reseptörlerde yüksek afinite gözlenmiştir [26]. İyileşme sürecine paralel olarak EGF üretimi artmaktadır [27].

FGF, fibroblast, epitelyal hücreler ve keratinositlerin proliferasyon ve diferansiyasyonunda etkilidir. Ayrıca kollajen liflerin uzaması ve vazodilatasyon sağlanmasında etkilidir [28,29].

TGF, yara iyileşmesinde kolonizasyon ve promotiliteye katkıları EGF2den daha belirgindir. Kulak zarı hasarından sonra salgılanır [30].

İnsülin , Igf 1 reseptörü üzerinden etki ederek neovaskülarizasyon, fibroblast ve keratinosit proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyonu, keratin migrasyonu etkileri gözlenmektedir [31].

Platelet zengin plazma (PRP): Trombositlerdeki alfa granüllerde bulunan büyüme faktörünün timpanik membran defektinin kapanma süresini azalttığı gösterilmiştir [32].

2.6. Timpanik Membran Hasarlarının Onarımında Hücre Tedavileri

Timpanik membran onarımı sırasında doku iskelesi, büyüme faktörü ve hücreler etkileşimde bulunmaktadır. Timpanik membranda çeşitli lokalizasyonda bulunan kök hücre

ve progenitör hücreler TM perforasyon onarımlarında önemli rol oynar (Şekil 2.4.). bunun yanında perforasyon kenarında tespit edilen progenitör hücreler de , rejenerasyon için kaynak oluşturduğundan biyogreft çalışmalarında doku iskelesine hücre ekleme işlemi sınırlı sayıda çalışmada uygulanmıştır [33]. Bu amaçla otolog fibroblastlar, fare embriyonik kök hücresi ve insan mezenkimal kök hücresinin kullanıldığı in vitro ve hayvan çalışmaları mevcuttur. Enfeksiyon, rejeksiyon ve tümör oluşumu risklerinin yanında etik ve yasal sorunlar, kök hücre kullanımını kısıtlamaktadır [34]. Kulak zarı perforasyonlarında umboda, mallus manibriumunda ve anulusta progenitör hücrelerin varlığı gözlenmiştir[33]. Tüm bu sebepler ve kök hücre uygulamalarındaki zorluklar daha farklılaşmış hücre kullanımının (örn:otolog keratinosit) şu aşamada daha uygun seçenek olduğunu düşündürmektedir [33].



Şekil 2.4 Timpanik membran üzerindeki kök hücrelerin, progenitör hücrelerin ve keratinositlerin şematik gösterimi [35].

Malleolar fold kök hücreler için kaynak oluştururken manibrium mallei ve anulus yoluyla progenitör ve keratinositlere farklılaşırlar. perforasyon kenarında ise artmış selüler aktivite gözlenmektedir.

2.7. Timpanik Membran Onarımlarının Geleceği

Toplumun %3 lük bir kısmını ilgilendiren kronik otit medianın tedavisinde her geçen gün daha az invaziv tekniklerin kullanıma girmesiyle hekim ve hastanın konforu artarken daha maliyet etkin bir tedavi arayışı devam etmektedir. Tasarlanan biyogreftlerde kulak zarının mekanik ve vibroelastik özelliklerinin taklit edilmesi işitmede fizyolojik sonuçlara

daha yakın iyileşme sağlayarak tedavi sonunda hasta memnuniyetini arttırmada önemli bir rol oynayacaktır. Ameliyat yöntemlerindeki gelişmelere paralel olarak doku iskelesi, biyomoleküller ve hücre bileşimli biyogreftlerin kullanımı hasta konforunu arttırmakla birlikte yüksek iyileşme oranları, daha kısa ameliyat süresi ve benzeri konularda umut vaad etmektedir. [12]

2.7.1. Timpanik Membran Onarımına Karşılık Yeniden Şekillendirme

3 boyutlu doku iskeleleri doku hasarının tamirinde yapısal desteğin yanında kimyasal ve biyolojik ajanların yardımıyla çevre dokuya destek olarak yara iyileşmesini hızlandırma potansiyeline sahiptir. Deselülarize dokular, filmler, hidrojeller, nanofibriller , 3 boyutlu biyoprinte doku iskeleleri timpanik membranın onarımı konusunda in vitro ve invivo çalışmalarda değerlendirilerek biyogreftlerin gelecekte kullanımı noktasında umutlandıran gelişmelere yol açmıştır. [36]

2.7.2. Teknik ve Fonksiyonel Özelliklerin Geliştirilmesi

Yapay kulak zarı için tasarlanan biyogreftin, kulak zarının anatomik, histolojik ve mekanik özelliklerine biyomimetik benzerliği şüphesiz greft başarısını arttıracaktır. Anatomik olarak kulak zarının malleus kemiği ve anulus ile olan ilişkisi , pars tensa ve pars flaksidanın konumu , histolojik olarak kollajen liflerin radyal ve dairesel yerleşiminin dikkate alınması, timpanik membran hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonuna uygun biyogreft tasarlanması, mekanik olarak küt veya baro travmalara dayanıklı (ortalama 100 kPa basınç)[37], vibroakustik olarak bakiye zarla uyumlu titreşime sahip biyomateryaller tasarlanması teknik ve işlevsel yönden geliştirilmeye müsait geniş bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır[35].

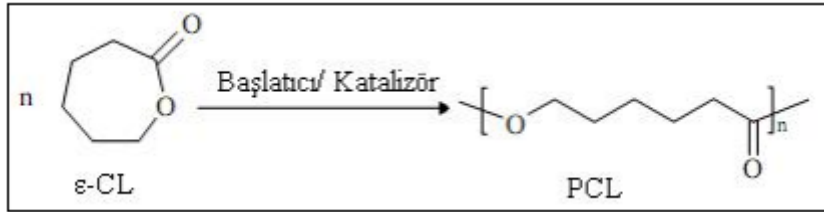
2.8. Polikaprolakton

Medikal uygulamalarda iyi bir kopolimer veya karışım malzemesi olarak öne çıkan Polikaprolakton (PCL), ilk olarak 1930'larda sentezlenen ilk polimerlerdendir. Çeşitli mikroorganizmaların sentetik polimerlerin bozunmasında rol alması zaman içinde Polikaprolaktonun kullanımını arttırmıştır [38]. Biyoyumlu ve biyobozunur olması, cerrahi sütürlerde, ilaç salınım sistemleri gibi medikal alanlarda kullanılırken kolay şekil almasından dolayı naylon katkılı malzemelerin içinde ve ambalajlamada kullanılmaktadır [39]. PCL, biyobozunurluğu çeşitli malzeme veya kopolimer yapılarıyla değiştirilebilir, kolay

şekillenebilir ve farklı gözenek boyutunda üretilebilir olmasından dolayı diğer biyopolimerlere göre daha avantajlıdır [38].

2.8.1. Polikaprolakton Yapısı ve Özellikleri

Polikaprolaktonun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri Polikaprolakton (PCL) monomeri ϵ -kaprolakton camsı geçiş sıcaklığı -60 oC, erime noktası 59 oC ile 64 oC arasında olan hidrofobik, yarı kristalin yapıda bir homopolimerdir. Kristalin yapısı ve düşük erime sıcaklığı kolay şekil alabilir olmasını sağlamaktadır. Molekül ağırlığı 3.000 g/mol'den 100.000 g/mol'e kadar değişmektedir [38]. Molekül ağırlığına kristal yapı ters orantılı olarak etki etmektedir. [39]. PCL oda sıcaklığında karbon tetraklorür, kloroform, diklorometan, benzen, toluen, sikloheksan ve 2-nitropropan gibi çözücülerde yüksek çözünürlüğe sahip olup; aseton, 2butanon, etil asetat, dimetilformamid ve asetonitril gibi çözücülerde düşük çözünürlüğe sahipken; alkol, dietil eterve petrol eteri gibi çözücülerde ise hiç çözünmemektedir [38].



Şekil 2.5 Polikaprolakton zincir görünümü

Polikaprolaktonun bir diğer önemli özelliği de birçok farklı polimerle harmanlama (blending) yapılabilmesidir. Selüloz propiyonat, selüloz asetat, poliglikolik asit, polilaktik asit ve polilaktik asit-ko-glikozit ile PCL harmanları gerilim ve kırılma direnci yüksek, adezyon kuvvet özelliği güçlendirilmiş yapılar oluşturulabilmektedir [38]. Bunların yanı sıra PCL-poliüretan (PU) harmanları kalp damar cerrahisi uygulamalarda, PCL Poliglikolik asit (PGA) harmanları ilaç salınım sistemleri ve sütür materyali olarak kullanımına örnek gösterilebilir. [40].

Tablo 2.1. PCL'nin diğer fiziksel özellikleri

Viskozitesi (100 oC)	1.500.000 mPa.s
Yoğunluk (60 oC)	1,1 g/cm ³
Erime Noktası	59 oC - 64 oC
Parlama Noktası	275 °C
Parçalanma Sıcaklığı	200 °C

2.8.2. Polikaprolaktonun Doku Mühendisliğindeki Yeri ve Önemi

Polikaprolakton polimeri doku mühendisliği uygulamalarından, ilaç üretimine; medikal araçların üretiminden tekstil sanayine, yapıştırıcılardan boya kullanımına kadar çok geniş bir uygulama alanına sahiptir [38]. Toksikite testlerinde polikaprolaktonun canlı dokularla minimum etkileşime girdiği ve toksisite göstermediği gözlemlenmiştir [39]. İyi bir biyoyumlu polimer olması biyolojik amaçlı kullanım alanını çoğaltmıştır. Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi'nin (FDA) ilaç kullanımında onay almış belli sayıdaki polimerlerindedir. İlaç aktif maddelerinin PCL'nin gözenekli yapısına kolaylıkla emdirilebilmesi, vücutta aktif maddeyi yüksek oranda geri salabilmesi ve uzun biyobozunma süresi sayesinde ilacı stabil tutabilmesi gibi özelliklerinden dolayı PCL'nin kullanımı artmıştır. [41] Uygulanan medikal implant başlangıç molekül ağırlığına göre PCL'nin homopolimer olarak bozunması 2 -4 yıl sürmektedir. Biyobozunma hızı diğer laktonlar veya glikolitler/laktitlerle kopolimerizasyon yoluyla değiştirilebilir. [42] Polikaprolakton cerrahi suture, yara örtüsü bezi ve diş hekimliği uygulamalarında kullanılmaktadır. Cerrahi suturelerin üretiminde kullanılacak bölgenin gerekli görülen dayanım ve süreye göre poliglolik asit ile beraber

harmanlanarak kullanılmaktadır [43]. Cerrahi olarak daha uzun dayanım gerektiren sütürlerin üretiminde harman yapısındaki PCL içeriği artmaktadır. Diş hekimliğinde PCL termoplastik yapısı sayesinde dolgu malzemesi olarak fosfatla kompozit yapılarak kullanılmaktadır [44]. PCL'nin yüksek dayanımlı ve sert olması sebebiyle, bakteriyel proliferasyona müsait bir yapı olmaması implant olarak kullanımında uygun bir materyal olarak öne çıkarmaktadır. Doku mühendisliği uygulamalarında PCL süngerimsi kemikle benzer sıkıştırma mukavemetine ve modüle sahip iskeleler halinde işlenebilir böylece kemik ve kırık yapılarının yerini alması amaçlı kullanılmaktadır [45]. Polikaprolakton, poliüretanla beraber kardiyovasküler alanda kullanılmasının yanında polilaktik asit (PLA) ve poliglolik asit (PGA) gibi polimerlerle de beraber kullanılmaktadır [46]. PLA ve PGA iyi birer biyouyumlu malzeme olmalarına rağmen uzun süreli stres dayanımları düşük polimerlerdir [47] ve yapay damar olarak kullanılmaları dayanımlarının düşük olması kullanımlarını kısıtlamaktadır. Bu dezavantajı önlemek amacıyla PCL katkılı kopolimerler hazırlanarak geçilebilmektedir [47]. Yapay deri üretiminde kullanılan doğal bir bileşen olan kolajen nispeten zayıf mekanik özelliklere sahiptir. Ayrıca deri uygulamalarında kullanılan biyomalzemenin hücre adezyon ve proliferasyonuna imkan sağlaması beklenmektedir. Kolajen ile polikaprolakton harmanlanarak üretilen kompozit malzemenin yüksek germe dayanımı gösterdiği, hücrelerin adezyon ve proliferasyonu için uygun ortam sağladığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [48].

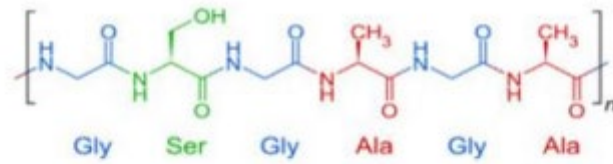
2.9. İpek Fibroin

2.9.1. İpek Fibroin Yapısı ve Özellikleri

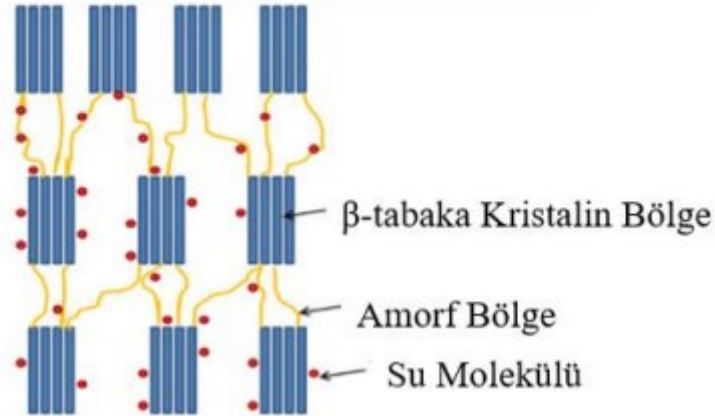
İpek geniş bir terimdir ve sıklıkla ipekböcekleri, sinekler, örümcekler, akarlar ve akrepler gibi çeşitli böcekler tarafından eğrilen protein lifleri olarak anılır; ancak türden türe ve işlevden işleve değişiklik gösterir. Çok yönlü bir biyopolimer olan ipek, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında yaygın olarak araştırılmaktadır.

İpekböceği ipeğinin doğal formu, ipek proteini fibroin (SF) ve serisin proteininden oluşur. Bununla birlikte, SF, ipek biyomalzeme kullanımının baskın türüdür. İpek fibroin, ipek böceklerinin (*Bombyx mori*) kozalarından elde edilen lif kısmı olup üzerinde en çok çalışma yapılan ipek çeşididir. [49]

SF'nin kimyasal yapısı disülfür bağları ile bağlanmış hafif zincirlerden ve ağır zincirlerden oluşur. Ağır zincir, kristal ve amorf bölgelerden oluşur. Kristalin bölgeler glisin- alanin, amorf bölgeler, aspartik asit gibi amino asitlerden oluşur. Kristalin bölgeler, yüksek mekanik mukavemet ve tokluk sağlayan hidrofobik β -tabaka oluşturu yapılar açısından zengindir. SF, formuna bağlı olarak ya yüksek miktarda β -tabaka ya da α -helis içerir. SF proteinin esas mukavemetini bir matris görevi gören α -helisler ve bobinlerle çevrili β -tabakaları sağlar. [50]



İpek Protein Kimyasal Yapısı

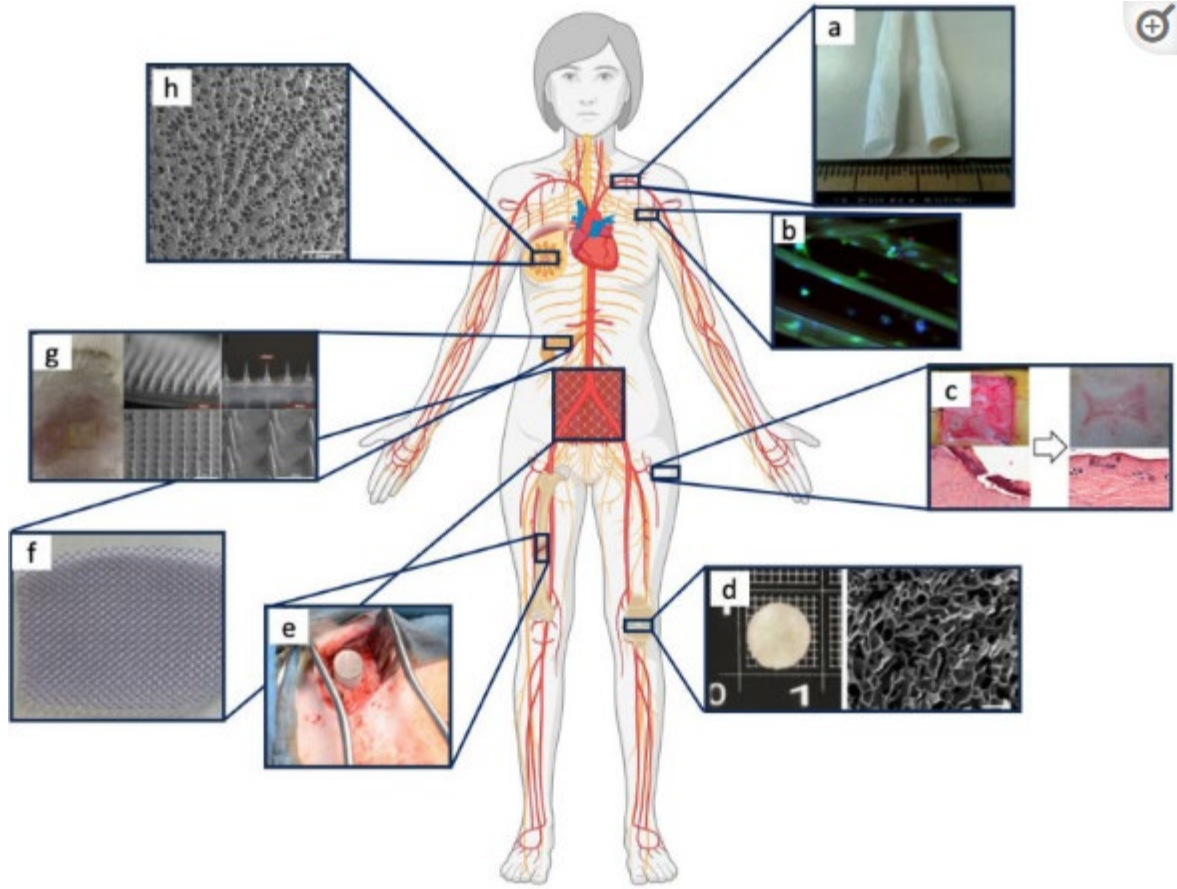


Şekil 2.6 İpek fibroin şematik yapısı

2.9.2. İpek Fibroin Doku Mühendisliğindeki Yeri ve Önemi

SF bazlı biyomalzemeler mükemmel biyoyoumluluk sergiler [51]. İpek fibroinin doğal yapıda olması ve mekanik stabilite, uzun bozunma hızı ve düşük immünojenite bu biyopolimerin tercih edilme sebeplerindendir. İpek fibroinin biyobozunma oranı, doku iskelesi formuna, çapraz bağlayıcı ajan türüne, harmanlanan biyomolekülün yapısına ve kristallenme gibi diğer faktörlere bağlı olarak implantasyondan haftalar ila yıllar sonrasına

kadar kontrol edilebilir[51]. Bu nedenle SF, doku mühendisliğinde kemik, kıkırdak, sinir, deri gibi çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.7 İpek fibroinin kullanım formları ve biyomedikal uygulamalar örnekleri:

(a) Elektroeğrilmiş ipek fibroin tüpler (kardiyovasküler cerrahi), (b) fiber yapı (periferik sinir sistemi), (c) film (kıkırdak doku), (d,e) 3 Boyutlu doku iskelesi (kemik doku), (f,g) yama formasyonu (abdominal cerrahi), (h) hidrojel yapı (meme protezi)., [52,53,54,55,56,57,58]

2.10. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri görece küçük ve kararlı, salınımına uğrayan veya membrana bağlı ligandlar olup, hücre çoğalması, farklılaşması, anjiyogenez hücrenin sağ kalımı, inflamasyon doku tamiri ve fibroziste önemli rol oynar [59].

2.10.1 Büyüme Faktörlerinin Çeşitleri

Büyüme faktörleri 5 ana grupta toplanabilir. Bunlar epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktör β (TGF- β) and insulin benzeri büyüme faktörü (IGF-1)

2.10.2. Büyüme Faktörlerinin Uygulama Alanlarına Göre Değerlendirilmesi

TM onarımında büyüme faktörleri ile yapılan çalışmalarda perforasyonun kapanması sürecinin ayrı basamaklarında etkili olduğu tespit edilmiştir.

EGF, DNA, RNA protein ve hyaluronik asit sentezini uyarır. Fibroblast sayısı ve neovaskülarizasyonu attırmaktadır. Ana proliferatif etkisi epitel tabakasında görülür. Hasar sonrası timpanik membran epitelinde iyileşme sürecine paralel olarak EGF üretimi artmaktadır. [26,27] Timpanik membran kapanma süresinde azalmaya yardımcı olur. Uzun dönem kullanılması kolestatom formasyonuna sebep olabilmektedir. [60]

FGF, Fibroblast, epitelyal hücreler ve keratinositlerin proliferasyon ve diferansiyasyonunda etkilidir. Ayrıca kollajen liflerin uzaması ve vazodilatasyon sağlanmasında etkilidir. Kulak zarı defektlerinin daha hızlı kapanmasının yanında, işitmenin de iyileşmesinde katkısı mevcuttur [28,29].

TGF: Yara iyileşmesinde kolonizasyon ve promotiliteye katkıları EGF'den daha belirgindir. Kulak zarı hasarından sonra perforasyon bölgesinde salgılanır [30].

İnsülin: Igf 1 reseptörü üzerinden etki ederek neovaskülarizasyon, fibroblast ve keratinosit proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyonu, keratin migrasyonu etkileri gözlenmektedir. [31].

Platelet zengin plazma (PRP): Trombositlerdeki alfa granüllerde bulunan büyüme faktörünün timpanik membran defektinin kapanma süresini azalttığı gösterilmiştir. [32]

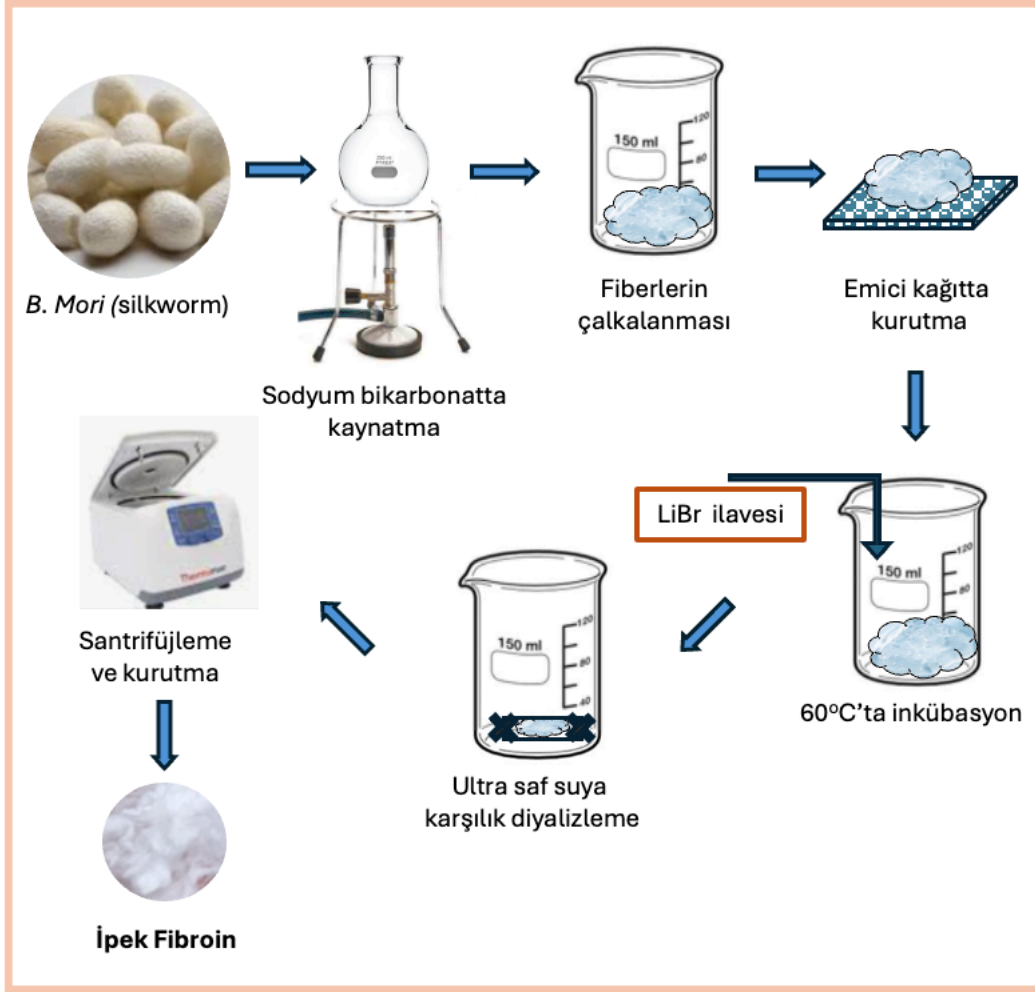
4. MATERYAL METOD

3.1 Kullanılan kimyasallar ve cihazlar

Çalışmada kullanılan ipek kozaları KOZA firmasından temin edilmiştir. Sodyum karbonat (Na_2CO_3), Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), PBS Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Trifloroasetik asit (TFA) Turalab'dan temin edilmiştir. Polikaprolakton polimeri (ortalama molekül ağırlığı 80.000 Da) Kloroform Dimetilformamid DMEM, MTT, DMSO Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. EGF Cutego (Çin Halk Cumhuriyeti) firmasından temin edilmiştir. NUVE marka Fn 400 model Kuru Hava Sterilizatörü, Snijder marka 34532 model manyetik karıştırıcı, doku iskelesi tartımlarında Unibloc marka AP225WD model hassas tartı kullanılmıştır. Elektroeğirme çalışmalarında Hacettepe Üniversitesi Biyokimya laboratuvarındaki Fresenius vial infzyon pompası içeren elektroeğirme cihazı kullanılmıştır. Absorbans ölçümleri UV-Visible Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601 cihazıyla yapılmıştır. SEM görüntüleri için Hacettepe Üniversitesi Hunitek laboratuvarında Leica Ace200 ile doku iskeleleri 20 nm karbon ile kaplanmıştır. SEM görüntüleri TESCAN (GAIA3, Çek Cumhuriyeti) marka mikroskopla elde edilmiştir. MTT testi sonrası absorbans ölçümleri ELISA readerda (SpectraStar, BMG LABBIotech) ile yapılmıştır.

3.2. İpek Böceği Kozalarından İpek Fibroin Eldesi

İpek proteinlerinden ipek fibroinin elde edilmesinde ekstraksiyon/özütleme yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla sağlam (hasar görmemiş, parçalanmamış olan) ipek böceği kozalarından belli bir miktar tartılıp (örneğin 5 g kadar içi boşaltılmış kozalardan) yaklaşık olarak yarım saat kadar süreyle bu ipek böceği kozaları yaklaşık olarak 0.02 M sodyum bi karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi içerisinde kaynatılmıştır. Daha sonra elde edilen fibroin üç kez saf su ile yıkayıp çalkalandıktan sonra bir gece boyunca kurumaya bırakılmıştır. Son olarak kurutulmuş olan ipek fibroini yaklaşık 9 M'lık lityum bromür (LiBr) çözeltisi içerisinde çözülmüş ve sonrasında içerisinde saf su ortamında diyaliz membranında yaklaşık 2 gün boyunca diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemi sonrasında çözeltide yer alan tuzlar uzaklaştırılmıştır ve bu çözelti 9 bin rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra $+4^\circ\text{C}$ 'de üç gün boyunca bekletilerek saf ipek fibroin çözeltisinin elde edilmesi sağlanmıştır. Elde edilen ipek fibroin çözeltisi bir sonraki aşamada elektroeğirme uygulamasında kullanılana kadar yine $+4^\circ\text{C}$ 'de kapalı kaptaki muhafaza edilmiştir [62]. Yapılan çalışmalar Şekil 3.1.'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1 İpek böceği kozasından ipek fibroin proteininin elde edilmesi prosedürü

3.3. Elektroğirme ile Doku İskelesi Hazırlanması

Elektroğirme yöntemi ile mikro-nanofiber formunda yapılar elde edilmesinde, hazırlanan polimer çözeltilerine yüksek voltaj uygulanması ile jet akımı şeklinde akış oluşturmak üzere çözeltinin yer aldığı bölümün ucunda yer alan iğnenin elektrikleştiği, ardından karşı tarafta yer alan bir toplayıcı (örneğin; alüminyum plaka-levha) üzerinde yığılmanın gerçekleştiği bir elektro-hidrodinamik teknoloji kullanılmıştır. Oluşan yapılarda elektroğirmenin kullanılmasının en temel avantajlarından biri değişik geometrik şekil ve morfolojide yapıların fibriler yapılar oluşturulması için uyarlanabilmesidir. Yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan temel elektroğirme düzeneği Şekil 3.2.'de şematik olarak gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi düzenek üç ana bölümden oluşmaktadır;

bunlardan birincisi yüksek voltaja sahip bir güç kaynağı, ikincisi enjeksiyon pompası ile sıkıştırılan enjektör ve ucundaki metalik iğne ve sonuncusu topraklanmış bir toplayıcı (alüminyum plaka-levha gibi). Buradaki toplayıcılar genellikle sabit düz plaka-levha şeklinde, dönen tambur şeklinde ya da döndürülen diskler şeklindedir.



Şekil 3.2. Elektroğirme sistemi düzeneğinin şematik görünümü

3.3.1. İpek Fibroin Doku İskelesi Hazırlanması

Sunulan tez kapsamında hazırlanması tasarlanan yapay timpanik mambranların temelini oluşturmak üzere bir önceki bölümde ayrıntılı bir şekilde açıklanmış olan yöntem ile ipek böceği kozalarından elde edilen ipek fibroin proteini/polimeri kullanılarak fibroin mikro-nanofiberler elektroğirme yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu amaçla Şekil 3.2.'de şematik olarak kullanılan düzenden yararlanılmıştır.

İpek fibroin fibriler doku iskelesi için gerekli yapıların hazırlanmasında öncelikle kullanılacak olan ipek fibroini trifluoroasetik asit (TFA, Sigma, ABD) içerisinde %15 w/v (gram / ml) oranında çözülmüş ve enjektöre doldurulmuştur. Daha sonra enjektör ucuna yüksek voltaj güç kaynağının (+) ucu ve toplayıcının bir kenarına (-) ucu takılmıştır. Sistemin çalıştırılması ile iğne ucunda oluşan çözelti saçılmaları karşı tarafa toplayıcı yüzeyine bir jet şeklinde püskürtülmüştür.

Yapılan çalışmalarda toplayıcı olarak düz alüminyum folyoları kullanıldığından oluşan mikro-nanofibriler yapılar toplayıcı üzerine randomize (rastgele) yığın şeklinde birikmiş ve hedeflenen membranımsı yapıların elde edilmesi sağlanmıştır.

Hazırlanan ipek fibroin doku iskelelerinin yapısal ve morfolojik özelliklerini değiştirmek ve hedeflenen yapıyı elde etmek üzere yapılacak olan optimizasyon çalışmalarında seçilen sistem parametreleri; uygulanan voltaj, iğne ucu ile toplayıcı arası mesafe ve kullanılan polimer derişimi olarak literatürde yer alan benzer çalışmalara uygun bir şekilde seçilmiştir. [63,64,65,66] Kullanılan parametreler ve uygulanan değerler Tablo 3.1.'de sunulmuştur.

Tablo 3.1. İpek fibroin ve PCL mikro-nanofiber doku iskeleleri için kullanılan parametreler

Deney No	Kullanılan Malzeme	Uygulanan Voltaj (kV)	İğne ucu ile Alüminyum toplayıcı arası (cm)
1	PCL-SF	20	20
2	SF	20	20
3	SF-Naylon 6/10	20	20
4	SF-Naylon 6/10	20	15
5	PCL	20	20

3.3.2. Polikaprolakton Doku İskelesi Hazırlanması

Sunulan tez çalışmasında hazırlanması planlanan doku iskelelerinin ipek fibroin ile hazırlanan yapıların mekanik dayanımının düşük olması ve yapay timpanik membran için uygun olmaması nedeniyle bu yapılar ile entegre edilebilecek ve yeterli mekanik dayanıma sahip olan yapıların hazırlanabilmesi için yine ipek fibroin gibi biyolojik olarak bozunabilen (biodegradable) bir polimer olan polikaprolakton (PCL, Aldrich, ABD) yapıları kullanılmıştır. %10 Polikaprolakton çözeltisi hazırlamak için 10 g PCL tartılıp kloroform ve DMF (Dimetil formamid) 4:1 oranındaki karışımla 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti manyetik karıştırıcıda 1 gece karıştırılarak homojen çözelti elde edildi. Polikaprolakton ile mikro-nanofiberlerin hazırlanmasında da 50 cc lik enjektöre 10 ml çözelti konularak 10 ml/sa hızda, 20 kv voltajda, 20 cm toplayıcı – iğne ucu mesafesi uzaklığı sağlanarak 1 saatlik elektroğirmeye tabi tutulmuştur.

3.3.3 İpek Fibroin Çözeltisine Nylon6, Nylon 6/10 Eklenmesi

İpek fibroin çözeltisinin elektroğirme yöntemiyle elde edilen membranda mukavemeti arttırmak amacıyla ipek fibroin sırasıyla nylon 6 ve nylon 6/10 ile ağırlık olarak %50- %50 oranında harmanlanarak TFA içinde %15 w/v oranında çözüldü [71] ve elektroğirme işlemine tabi tutuldu. Naylon 6 ile elde edilen doku iskelelerinin yeterli mukavemette olmaması üzerine dayanıklılığı attıracağı düşüncesiyle naylon 6/10 üzerinden elektroğirme işlemine devam edilmiş ve SEM görüntüleri alınmıştır.

3.3.4 Polikaprolakton ve İpek Fibroin Yapının Katmanlı Olarak Hazırlanması

Yapay kulak zarı oluşturma çalışmalarında ipek fibroin- nylon6/10 çözeltisinde de yeterli mukavemet elde edilememesi üzerine polikaprolakton çözeltisinden elektroğirme yöntemiyle membran hazırlandı. Hidrofobik karakterdeki polikaprolakton membran üzerine dokuya tutunmayı sağlamak amacıyla hidrofilik özellikteki ipek fibroin çözeltisi üst katman olarak elektroğirme yöntemiyle hazırlandı.

3.4. Elektroğirme ile Hazırlanan Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Tez kapsamında hazırlanan ve hedeflenen özelliklere sahip doku iskeleleri elde edilebilmesi için geliştirilen formülasyonlar önceki bölümlerde ayrıntılı bir şekilde sunulduğu gibi değişik proses parametreleri kullanılarak değerlendirilmiş ve gerekli optimizasyonların yapılabilmesi adına uygun karakterizasyon teknikleri ile karakterize edilmiştir. Söz konusu karakterizasyon uygulamalarının başında hazırlanan doku iskelelerinin morfolojik olarak değerlendirilmesi yer almıştır. Ayrıca hedeflenen doku iskelesinin uygulama konusu olan timpanik membran geliştirilmesinde ihtiyaç duyulacak olan mekanik yeterliliğin değerlendirilebilmesi için hazırlanan doku iskelelerinin mekanik testleri gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Morfolojik Değerlendirmeler

Tez kapsamında geliştirilen doku iskelelerinin morfolojik olarak değerlendirilmesinde taramalı elektron mikroskopundan (SEM) yararlanılmıştır. Yapılan çalışmalarda TESCAN (GAIA3, Çek Cumhuriyeti) marka SEM kullanılmıştır. Elektron mikroskopunda yapılan çalışmalarda tez kapsamında geliştirilen her bir doku iskeleleri çift taraflı iletken karbon bant yardımıyla alüminyum stublara alınmış ve Leica Ace200 cihazı kullanılarak 20 nm karbon ile kaplanmıştır. Sonrasında gerekli görüntüleme işlemlerine geçilmiş ve değişik

parametreler ile hazırlanan doku iskelelerinin görüntüleri alınmıştır. Daha sonrasında genel görsel morfolojik değerlendirmelerin yanında her bir örnek için alınan görüntülerde yer alan fiber yapılarının ortalama çapları imageMeter programıyla ölçeklendirilerek gerekli fiber çaplarının analizi gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamada her bir fotoğrafta yer alan fiberlerden ortalama 100 adedinin çapları belirlenerek her bir formülasyon için ortalama çap belirleme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. Mekanik Özelliklerin Değerlendirilmesi

Hazırlanan doku iskelelerinin mekanik özellikleri çekme test cihazı (Zwick Z10, Almanya) kullanılarak değerlendirilmiştir. Hazırlanmış olan doku iskelesinden 2x1 cm boyutunda numuneler alınarak mekanik teste tabi tutulmuştur. Bu kapsamda 100 N yük hücresinde uzatma değeri 10 mm/dak olarak ayarlanmış ve özellikle hedeflenen doku iskelesinin mekanik dayanımını sağlamak üzere yapıda yer alan PCL örneklerine bu testler uygulanmıştır.

Numuneler üç kez test edilmiş ve gerinim–gerilme eğrileri kaydedilmiştir. Çekme dayanımı, kopma uzaması ve Elastisite modülü sonuçlarının ortalaması alınarak raporlanmıştır.

3.5. Doku İskelelerinin Büyüme Faktörü ile Donatılması

Tez çalışmaları kapsamında ipek fibroin ve polikaprolakton polimerleri kullanılarak geliştirilen ve hedeflenen doku iskeleleri olarak hazırlanan yapıların uygulama konusu olan yapay timpanik membran dokusunu oluşturması aşamasında özellikle hücresel büyümeleri ve gelişmeleri desteklemek üzere literatürde de yer alan bilgilere göre söz konusu doku iskelelerine uygun hücresel büyüme faktörleri (Growth Factor) yüklenmesine karar verilmiştir. Bu amaçla yapılan literatür değerlendirmelerine göre yapılacak olan uygulamaya yönelik olarak en uygun büyüme faktörünün epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor, EGF) [67,68,68,70] olduğu değerlendirilmiştir.

3.5.1. Doku İskelelerine Büyüme Faktörü Yüklenmesi

Yapılan çalışmalar neticesinde uygun formülasyonlar ile üretilmiş olan ipek fibroin-polikaprolakton ve polikaprolakton mikro-nanofiberlerden oluşan doku iskelelerine EGF yükleme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için genel olarak literatürde iki farklı yaklaşımın hâkim olduğu belirlenmiştir. Bunlardan birincisi EGF vb. yapıların polimerik doku iskelelerinin hazırlanması esnasında formülasyona dahil edilmesi bir diğeri de hedeflenen doku iskelesinin geliştirilmesinden sonra uygun derişimlerde büyüme faktörünün doku iskelelerine emdirilmesi (impregnation) şeklinde gerçekleştirilen uygulamadır. Tez kapsamında kullanılan doku iskelelerinin hazırlanması esnasında kullanılan kimyasallardan (özellikle ipek fibroinin elektroegirme işlemleri sırasında çözündüğü TFA) dolayı büyüme faktörünün sahip olduğu biyolojik aktiviteyi yitirmesi riskinden dolayı ikinci yöntem, yani emdirme yöntemi tercih edilmiştir.

Hazırlanan doku iskeleleri prforatör yardımıyla çıkartılıp hassas terazide ağırlıkları ölçülerek polistiren hücre kültür kabına sırasıyla yerleştirilmiştir. Daha sonra EGF molekülü fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH: 7.4) çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlanan doku iskeleleri mg kütlesi başına 10-20-40 µg EGF olacak şekilde damlatılmıştır. Böylece EGF miktarları değiştirilerek uygun hücre kültürü için uygun EGF dozunun belirlenmesi planlanmıştır.

3.5.1. Doku İskelelerinden Büyüme Faktörü Salım Çalışmaları

Farklı miktarlarda EGF içeren doku iskelesi örneklerinin salım çalışmalarına geçilmeden önce çalışmalarda kullanılan EGF (CUTEGO, Çin Halk Cumhuriyeti) için PBS ortamında hazırlanan çözeltiler ile UV-Visible spektrofotometre ile bir dalga boyu taraması yapılmış ve sonrasında da farklı derişimlerde (10, 20, 40 mcg/mg doku iskelesi) hazırlanan EGF çözeltilerinin 280 nm dalga boyunda Derişim/Absorbans kalibrasyon grafiğı hazırlanmıştır. (EK 1)

EGF salım çalışmalarında farklı miktarlarda EGF içeren ve farklı formülasyonlarda hazırlanmış olan (ipek proteini+polikaprolakton ve polikaprolakton'dan) doku iskeleleri uygun salım ortamlarına (PBS içerisinde 37°C'ta) yerleştirilerek periyodik olarak doku iskelelerinden salınan EGF miktarı belirlenmiştir. Bu işlemler esnasında salım ortamlarından belirli aralıklarla belirli miktarda örnekler alınarak maksimum absorbansın gözlemlendiğı 280 nm dalga boyunda ölçümler yapılmış ve daha önceden hazırlanan kalibrasyon grafiğı

kullanılarak salınan EGF miktarı belirlenmiştir. Yapılan deneysel çalışmalar en az üç kez tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir (EK 2).

3.6. Doku İskeleleri ile Yapılan Hücresel Testler (Biyouyumluluk Testleri)

(Referans: TS EN ISO 10993-5)

Bilindiği üzere aşağıda test protokolü sunulan MTT sitotoksosite testi; hücrelerin metabolik aktivitelerinin ölçümü yoluyla yaşayabilirliğinin/canlılıklarının ölçülmesine dayanmaktadır MMT kapsamında sarı renkli ve suda çözünebilir bir boyar madde olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium bromid), canlı hücrelerde metabolik olarak mavi-mor arası renkli ve suda çözünmeyen formazana indirgenir. Yapılan deneysel çalışmalarda canlı hücrelerin sayısı, burada oluşan formazanın alkol içerisinde çözünmesinden sonra spektrofotometrik olarak yapılan ölçümlerle belirlenen renk yoğunluğu değeri ile orantılıdır.

Sunulan tez kapsamında yapılan temel uygulamada oksidatif stres kaynaklı sitotoksitenin araştırılmasında da yaygın olarak kullanılan L929 fare fibroblast hücreleri (NCTC klonu 929: CCL1, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu [ATCC], Manassas, VA, ABD; ECACC No. 88102702, Avrupa Hücre Kültürleri Koleksiyonu, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, İngiltere) kullanılmıştır. Burada öncelikle canlı olduklarından emin olunan L929 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve yarı birleşik bir tek tabaka oluşturmak için 24 saat (bir başka deyimle ikiye katlama süresi kadar) kültür ortamında tutulmuştur. Hücrelerin büyüme ortamı 90% DMEM Hi-glucose w L-glutamin 10% FBS ile %0.1 pen/strep çözeltisinden oluşmaktadır. %5 CO₂ içeren inkubatorde 37 derecede inkübe edilmiştir. Sterilizasyon etanole daldırılıp çıkarılan doku iskelelerinin UV ışık altında (265 nm) 20 dk bekletilmesi ile yapıldı. Sterilizasyon sonrası 48 well içindeki doku iskelelerine 1x10⁵ hücre ekildi, besiyeri daha önce belirtildiği gibi kullanıldı. 24 ve 72 saatlik analiz saatlerinden 4 er saat önce besiyeri fenolsüz PBS ile değiştirilip 200ul PBS içinde 20ul MTT çözeltisi (1mg/mL) inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ortam aspire edilmiş ve oluşan mor formazan kristalleri DMSO ile çözülmüştür. Ortamdan alınan 50uL örnekler duplike şekilde 96 well platelerde ELISA readerda (SpectraStar, BMG LABBiotech) 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Formazan oluşum miktarı belirlenmiş Negatif kontrol içinde sadece besiyeri bulunan kuyucuk, pozitif kontrol için ise %10 DMSO içeren besiyeri 570 nm dalga boyunda

okutularak karşılaştırılmıştır. Burada yapılan çalışmaların tamamında kullanılan çözeltiler, cam eşyalar vb. steril olarak kullanılmış ve tüm işlemler aseptik koşullarda ve bir laminar akış kabininin steril ortamında gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin büyüme ortamı 90% DMEM Hi-glucose w L-glutamin 10% FBS ile % 0.1 penisilin/streptomisin çözeltisinden oluşmaktadır. %5 CO2 içeren inkubatorde 37 derecede inkübe edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda daha önce belirtildiği gibi canlı hücre sayısındaki azalma, örneklerde yer alan hücrelerin metabolik aktivitelerinde bir azalmaya neden olmakta ve bu azalma, 570 nm’de yapılan optik yoğunluk ölçümleriyle (SpectraStar, BMG Lab Biotech,

Almanya) mavi-mor formazan miktarı ile doğrudan ilişkili olduğundan aşağıda verilen denklem yardımıyla örnek içerisinde yer alan hücrelerin canlılık değerleri belirlenmiştir.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = 100 \times \frac{\text{OD}_{570e}}{\text{OD}_{570b}}$$

Burada sunulan eşitlikte yer alan QD570e üzerinde çalışılan örneğin 570 nm’de vermiş olduğu optik yoğunluk olup QD570b ise çalışmalarda kullanılan blank çözeltinin aynı dalga boyunda ölçülen optik yoğunluğunu ifade etmektedir.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. İpek Böceği Kozalarından Elde Edilen İpek Fibroinin Özellikleri

Yapılan başlangıç çalışmalarında daha önce gerçekleştirilen çalışmalardan [71] yola çıkılarak elde edilen ipek fibroin yapılarının yapılmış olan karakterizasyon çalışmaları (FTIR-ATR incelemeleri) sonucunda spektrumda yer alan bantların (örneğin; 1620, 1514, 1266 ve 1053 cm^{-1} bölgelerindeki) karakterize edilen ipek fibroinin β tabakalarına diğer ilgili bantların (1.676 ve 600 cm^{-1} gibi) ise α sarmalına atfedildiği bildirilmiştir [72].

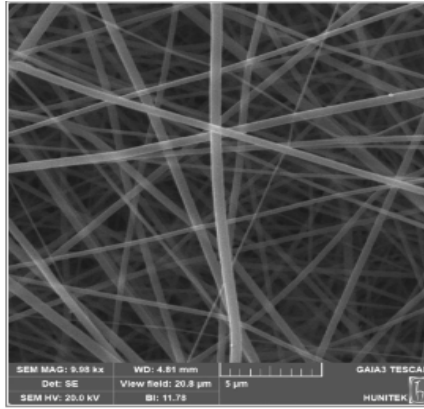
4.2. Elektroegirme ile Hazırlanan Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

4.2.1. Morfolojik değerlendirmeler

Sunulan tez kapsamında hedeflenen doku iskelelerinin hazırlanmasında yapılan literatür taramalarına göre [12,73,74,75,76] üzerinde araştırmalar yapılan polimer/biyopolimer grupları arasında yapılan çalışmalar dikkate alınarak timpanik membranı taklit etmek üzere özellikle mikro-nano ölçekli (fibriler formda) yapıların hazırlanmasına karar verilmiştir. Kullanılması planlanan polimerlerin seçiminde ve doğal dokuyu taklit etmesi planlanan yapının protein yapısında olması ve bu tabakanın yeterince mekanik dayanıma sahip olmaması nedeniyle mekanik dayanımı arttırmak ve protein tabakası ile örtüşen/entegre olabilen bir polimerik yapının tercih edilmesi söz konusu olmuştur. Bu amaçla öncelikle protein yapısı olarak ipek böceği kozasından elde edilen biyopolimerik yapı olarak ipek fibroin tercih edilmiştir. İpek fibroin kullanılarak hazırlanan nanofibriler doku iskelesi katmanının örnek bir SEM fotoğrafı Şekil 4.1.'de sunulmuştur. Fotoğraftan da görüldüğü üzere elde edilen matriks üzerinde hemen hemen hiçbir düğüm noktası (ya da düğüm) oluşumuna rastlanmamıştır. Söz konusu düğüm oluşumu, toplayıcıda istenen nanofiber formasyonunun oluşmaması, çözücünün yeterince buharlaşmaması gibi olumsuzluklar ilgili kaynaklarda [77,78,79.80,81] ayrıntılı olarak tartışılmış ve bu bilgiler dikkate alınarak ön denemeler yapılmış ve sorunsuz optimum koşullara ulaşılabilmektedir. İpek fibroin ile hazırlanan matriks yapılarına mekanik dayanımı arttırmak üzere ilgili kaynaklarda da benzer yapı olarak kullanılan naylon 6-10 ilavesi durumunda elde edilen matrislerdeki ortalama fiber çaplarının nispeten azalması olmuştur [71] (Şekil 4.2). Elde edilen bulgulara

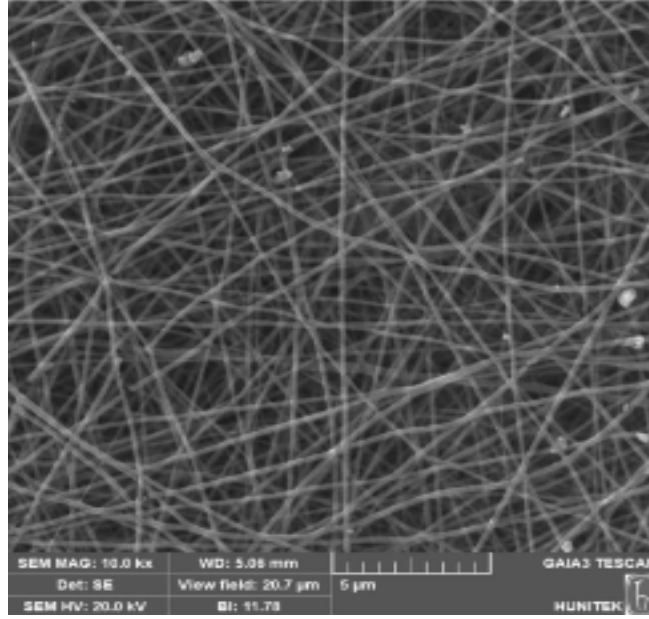
göre bir diğer dikkat çeken husus ipek fibroin ile elde edilen fibriler yapılarda yer alan fiberlerin ortalama çapları aynı koşullarda hazırlanan PCL matrikslerdeki fiberlerin ortalama çaplarından nispeten daha büyük olmuştur (Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.).

Sunulan tez çalışmaları kapsamında hedeflenen doku iskelesi formunun hem hücre yapışmasını desteklemesi hem de mekanik yönden dayanıklı olması gerekmektedir [74]. Bu nedenle üçüncü bölümde ayrıntılı bir şekilde açıklandığı gibi öncelikle PCL kullanılarak toplayıcı plaka üzerinde biriktirilen nanofibriler yapılar hazırlandıktan sonra ipek fibroin ile elektroğirme işlemi gerçekleştirilmiş ve böylece hedeflenen bilateral/çift katmanlı yapıya ulaşılmıştır. Elde edilen SEM fotoğrafı değerlendirmelerinde her iki katmanın ayrı ayrı görüntüleri alınmış ve yapılan değerlendirmelerde ayrı ayrı elektroğirme prosedürüne tabi tutulan yapılarda olduğu gibi aynı koşullarda elde edilen ipek fibroin matrikslerin ortalama fiber çaplarının PCL matrikslerin ortalama fiber çaplarından daha büyük olduğu dikkat çekmektedir. (Şekil 4.3.) Ancak her bir katmanın tek başına hazırlanması durumunda elde edilen matrikslerin bağıl olarak daha büyük çaplarda olması söz konusu olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.). Bunun nedeni olarak katman üstüne katman şeklinde yapılan matriks oluşumunda sağlanan elektriksel alanın mevcut katmandan dolayı azalması söz konusu olduğundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

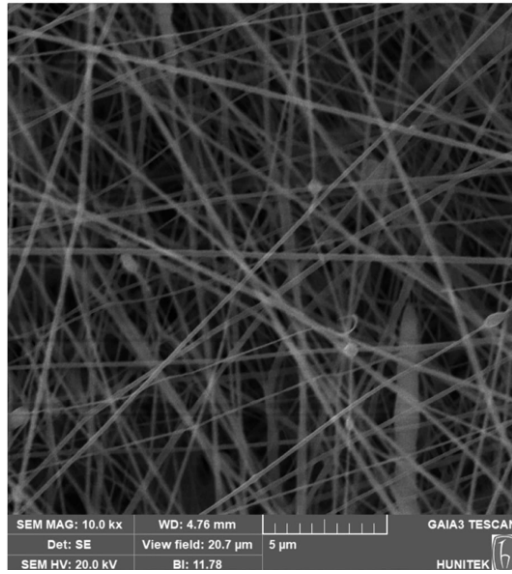


Şekil 4.1. İpek Fibroin Proteini ile Elde Edilen Nanofibriler Matriks SEM Fotoğrafi

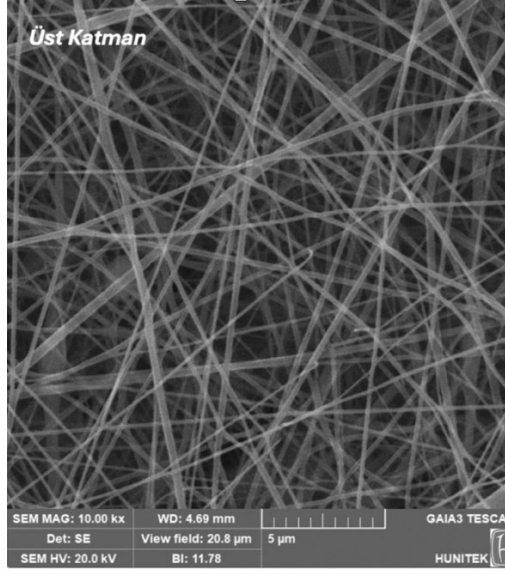
Ortalama fiber çapı 358 nm



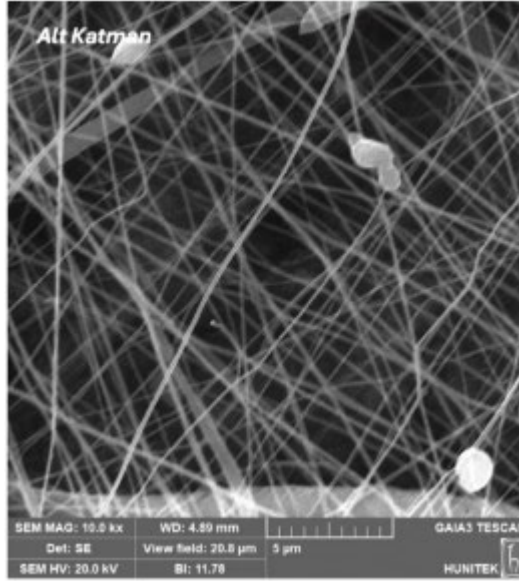
Şekil 4.2 SF Nylon-6/10 Nanofibriler Matriks SEM Fotoğrafi Ortalama fiber çapı 178 nm



Şekil 4.3 PCL ile Elde Edilen Nanofibriler Matriks SEM Fotoğrafi Ortalama fiber çapı 212 nm



Şekil 4.4 PCL Üzerine İpek Fibroin Nanofiberlerin Kaplanmasıyla Elde Edilen Nanofibriler Matriks SEM Fotoğrafi (İpek Fibroin fiber tarafı. Ortalama fiber çapı 206 nm)

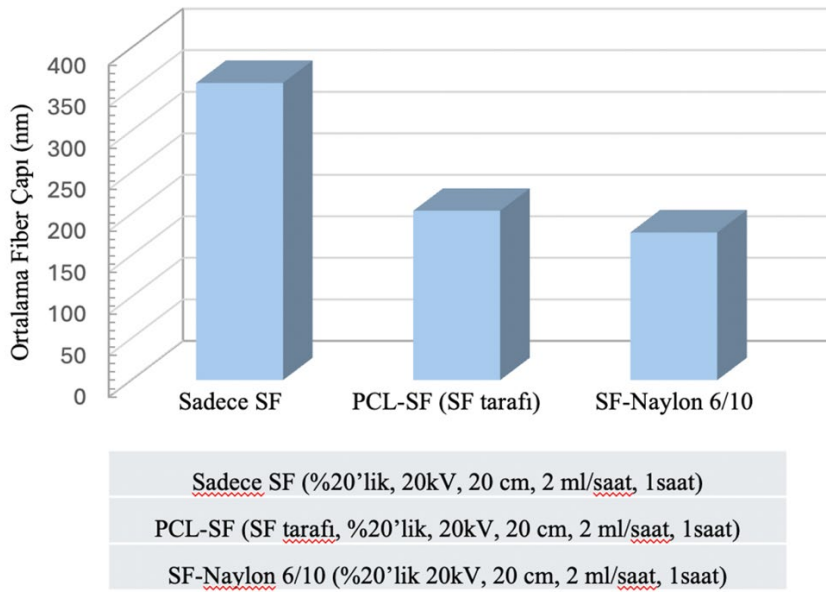


Şekil 4.5. PCL + SF Alt Katman (PCL tarafı) Ortalama fiber çapı 147 nm

Deneysel çalışmaların sonrasında elde edilen verilerin yeniden değerlendirilmesi ve öncelikle elektroçirime işlemlerinde kullanılan malzemelerin aynı koşullar altında değiştirilmesi sonucu elde edilen matrikslerin genel yapıları ve nanofiber çapları incelendiğinde ipek fibroin ile hazırlanan nanofiberlerin çaplarının PCL üzerine kaplanan

nanofiberlerin çaplarından da naylon 6/10 ile karıştırılarak (birebir kütle oranında) hazırlanan nanofiberlerin çaplarından da büyük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6.).

Öte yandan daha önce de belirtildiği gibi oluşan fibriler yapıların oldukça homojen kalınlıkta olduğu ve herhangi bir düğüm ya da benzeri bir olumsuz yapılanmanın meydana gelmediği belirlenmiştir.

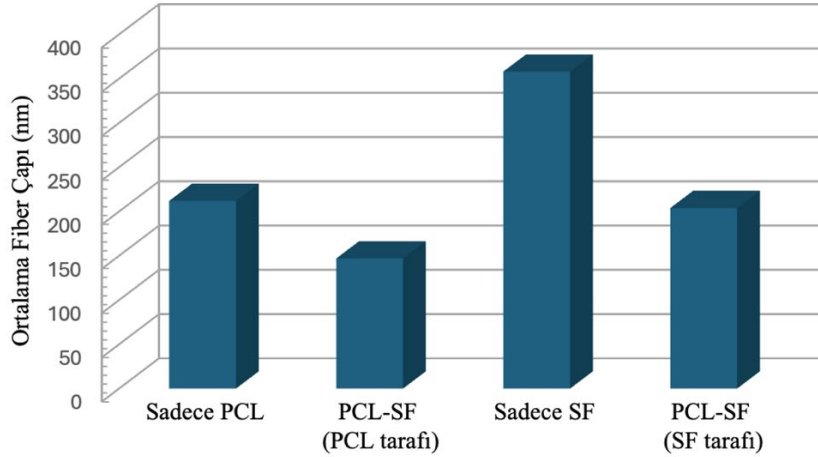


Şekil 4.6 İpek Fibroin Nanofiberlerin PCL ile ve Naylon 6/10 kullanımıyla Elde Edilen Nanofibriler Yapıların Değerlendirilmesi

Çalışmalar kapsamında hazırlanan nanofibriler yapıların hazırlanmasında kullanılan malzeme/malzemelerin değiştirilmesi sonucu elde edilen matriks yapıları ve nanofiber çapları incelendiğinde özellikle her iki tür malzemenin (ipek fibroin ve PCL) tek başlarına elektroğirme prosesine tabi tutulmuş halleri iki malzemenin bir arada (ya da ardışık olarak çift tabakalı olacak şekilde) elektroğirme prosesine tabi tutulmuş halinden daha büyük çaplara sahip olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.7.).

Yapılan çalışmalarda elde edilen bu farklılığa gerekçe olarak da daha önceki bölümde de belirtildiği gibi çok katmanlı yapı oluşturulmaya çalışıldığı zaman toplayıcı zemininde birikmiş olan bir başka malzemenin oluşturacağı bariyer etkisi ile elektriksel alanda zayıflama olacağından üzerine beirken ikinci bir malzemenin yapısında bir diğer malzeme olmaksızın gerçekleştirilen kaplamadaki yapı ile farklılıklar göstermiştir.

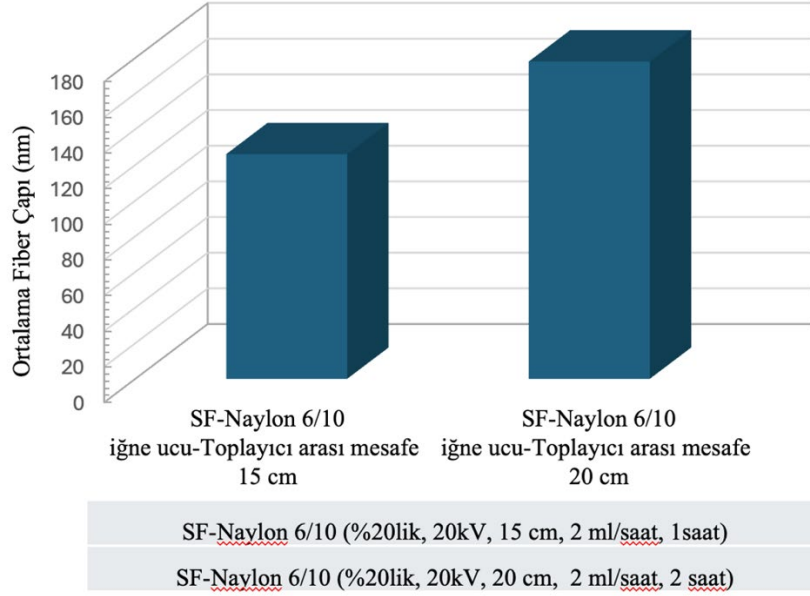
Yapılan diğer çalışmalarda ilgili literatür [77] bilgilerine dayanılarak hazırlanması planlanan ve ileri uygulamalarda ideal özelliklere sahip olması istenen matrikslerin oluşturulmasında etkin olan bir diğer parametre elektroğirme sistemindeki enjektörün ucundaki iğne ile toplayıcı arasındaki mesafe olmuştur.



Sadece PCL (%20lik, 20kV, 20 cm, 2 ml/saat, 1saat)
PCL-SF (PCL tarafı, %20lik, 20kV, 20 cm, 2 ml/saat, 1saat)
Sadece SF (%20lik, 20kV, 20 cm, 2 ml/saat, 1saat)
PCL-SF (SF tarafı,%20lik, 20kV, 20 cm, 2 ml/saat, 1saat)

Şekil 4.7 İpek fibroin nanofiberlerin PCL ile kullanımıyla elde edilen çift tabakalı matrikslerde nanofibriler yapıların değerlendirilmesi

Bu bağlamda iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe iki farklı değerde (15 ve 20 cm olacak şekilde) sabitlenerek elektroğirme işlemi gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.7.'de verilmiştir. Grafiktende görüldüğü üzere söz konusu mesafenin artmasıyla elde edilen matrikste yer alan nanofiberlerin çaplarının arttığı belirlenmiş ve bu durumun mesafenin artması ile toplayıcıya doğru ilerleyen fiberlerin havada kalma süresi uzadığından çözücü uzaklaşmasının devam ettiği ve böylece daha kalın fiberlerin oluştuğu düşünülmüş ve elde edilen bu sonucun ilgili kaynaklarda [77] yer alan bulgular ile örtüştüğü anlaşılmıştır.



Şekil 4.8. İğne Ucu ile Toplayıcı Arasındaki Mesafenin Elde Edilen Matrikslerdeki Nanofiber Çaplarına Etkisi

4.2.2. Mekanik Testler

Yapılan deneysel çalışmalar kapsamında hazırlanan doku iskelelerinin sahip olduğu mekanik dayanımların değerlendirildiği bu bölümde ileri uygulamalarda kullanılmak üzere optimize edilmiş koşullarda hazırlanmış olan yapılar mekanik teste tabi tutulmuştur.

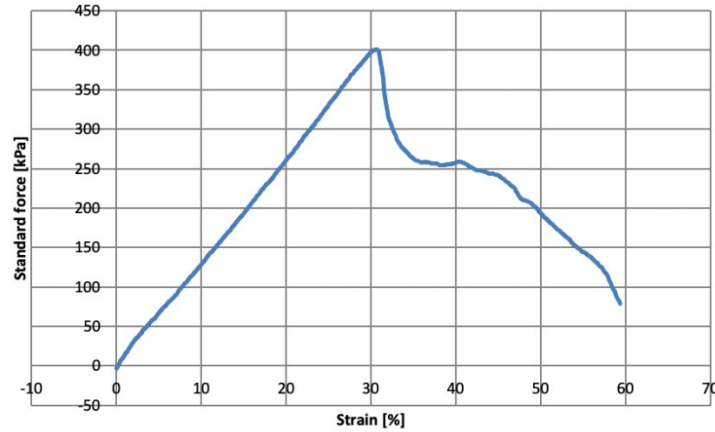
Bu kapsamda polikaprolakton nanofiber yapıları mekanik testlere tabi tutulmuş, elde edilen verilere göre oluşturulan uygulanan kuvvete karşılık ölçülen gerinim değerleri şekil 4.9.'de sunulmuştur. Ayrıca sistemden elde edilen veriler tablo 4.1.' verilmiştir.

Tablo 4.1 PCL mekanik test sonuçları

Specimen ID	F (50 %)	E _{mod}	F at 0.2% plastic strain	F _{max}	dL(plast.) at F _{max}
	MPa	MPa	N	MPa	mm
PCL 1	0,19369	1,649311	0,042679	0,401334	0,609251

dL at F _{max}	F _{Break}	dL at break	a ₀	b ₀	S ₀
%	MPa	%	mm	mm	mm ²
30,56127	0,078778	59,39754	0,1	11,11	1,111

Yapılan incelemelere göre hazırlanan PCL matrikslerin sahip olduğu yaklaşık 1,65 MPa değerindeki elastisite modülü (E_{mod}) değeri literatürde yapılan benzer çalışmalarda elde edilen değerler ile yakın büyüklüklere sahip olduğu belirlenmiştir [81].



Şekil 4.9 PCL Doku İskelesine Uygulanan Kuvvete Karşılık Gerinim Eğrisi

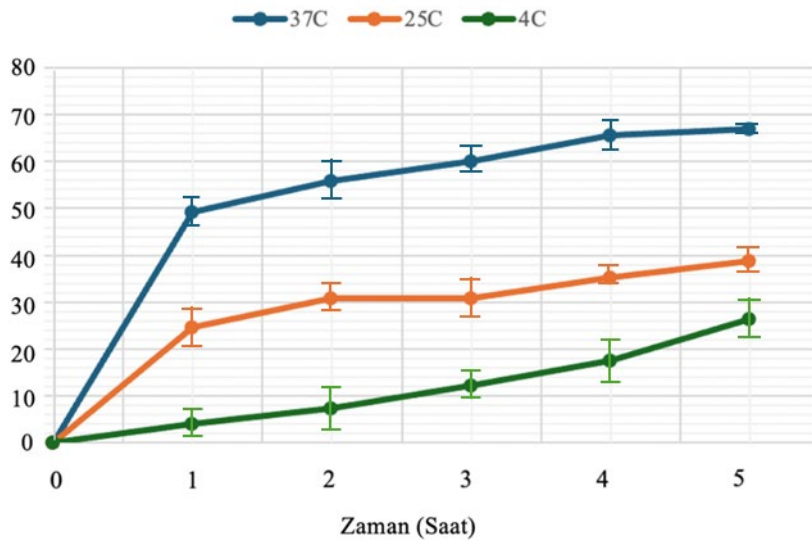
4.3. Doku İskelelerinden EGF Salım Davranışları

Yapılan deneysel çalışmalar kapsamında geliştirilmesi hedeflenen doku iskelesinin etkinliğini arttırmak ve hücre matriks etkinliğini güçlendirmek adına söz konusu iskele yapılarına materyal Metod bölümünde ayrıntılı bir şekilde belirtilen prosedürler ile EGF yüklenmiştir. Hazırlanan EGF yüklü doku iskelelerinde yer alan EGF'nin özellikle kullanım

ya da saklama koşulları ile iskele yapılarına yüklenen EGF derişimi ilgili olarak yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen *in vitro* salım sonuçları aşağıda alt başlıklar halinde ayrı ayrı sunulmuştur.

4.3.1. Doku İskelelerinden EGF Salımına Ortam Sıcaklığının Etkisi

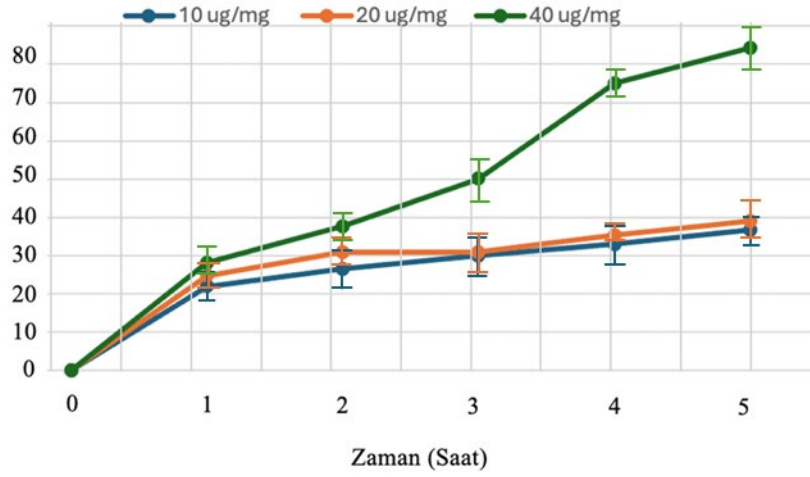
Bu bölümde ilk olarak hazırlanan EGF yüklü doku iskeleleri farklı üç sıcaklıkta (+4°C , 25°C ve 37°C şeklinde) koşullandırılmış ortamlarda fosfat tampon çözeltileri (PBS, pH: 7,4) iöçerisinde izlemeye alınmıştır. Belirli zaman aralıklarında yapılan EGF ölçümleri neticesinde elde edilen bulgular Şekil 4.10.'da sunulmuştur. Grafikten de anlaşılacağı üzere salım çalışmalarının ilk 5-6 saatlik bölümünde elde edilen salım profillerine göre sıcaklık arttıkça EGF salım hızının ilgili kaynaklarda yer alan çalışmalara [79] benzer şekilde artmış olduğu çok net olarak anlaşılmıştır. Yapılan çalışmaların devamında yaklaşık olarak 72 saatlik bir zaman diliminde doku iskelelerinde yer alan EGF'nin hemen hemen tamamının salınmış olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak özellikle doku iskelesi ve hücre etkileşimlerinde ilk 6-12 saatlik dönemde (hücrelerin yüzeylere tutunması ve büyümeye/yayılmaya doğru ilerlemesi evrelerinde) ihtiyaç duyulan salım profilinin elde edilebileceği, öte yandan düşük sıcaklıklarda (+4°C ve altında) ise salımın oldukça yavaşlayacağı ve bu tür koşulların stoklamada önemli avantaj olacağı düşünülmüştür.



Şekil 4.10 Doku İskelesinden EGF Salımına Ortam Sıcaklığının Etkisi

4.3.2. Doku İskelelerinden EGF Salımına EGF Yükleme Miktarının Etkisi

Bu bölümde ise EGF içeren doku iskelelerinin hazırlanması aşamasında prosese ilave edilen EGF miktarları değiştirilmiş (10, 20 ve 40 mg/mg doku sikelesi şeklinde) ve elde edilen doku iskelelerinden fosfat tampon ortamında ve hedef salım ortamı olarak değerlendirilen vücut sıcaklığında gerçekleştirilen *in vitro* salım deneylerinden elde edilen bulgular Şekil 4.11.'da sunulmuştur. Sunulan grafikten de çok net görüldüğü üzere doku iskelelerine ilave edilen EGF miktarının artması ile salım hızının bir miktar arttığı ve EGF içeriğinin daha da artmasıyla söz konusu salım hızının önemli oranda arttığı belirlenmiş ve bu bulguların literatürde yer alan benzer çalışmalar [79] ile örtüştüğü anlaşılmıştır.



Şekil 4.11 Doku İskelesinden EGF Salımına EGF Yükleme Miktarının Etkisi

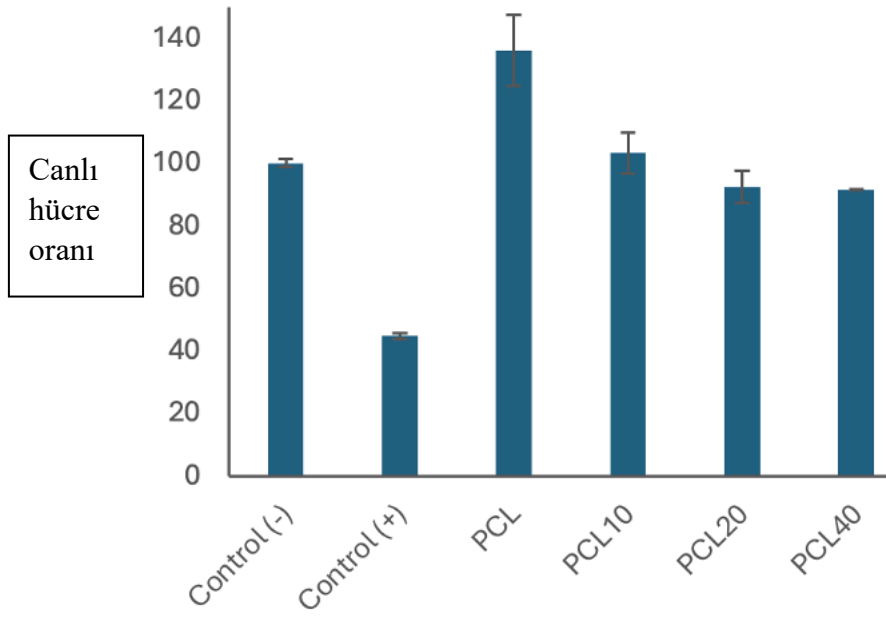
4.4.Doku İskeleleri-Hücre Etkileşimleri (MTT Testleri)

Sunulan tez çalışmaları kapsamında hazırlanan tüm doku iskeleleri (PCL ve PCL-İpek fibroin ile bunların değişik oranlarda EGF içeren formları) TS EN ISO 10993-5 “Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi-bölüm 5: Vücut dışı sitotoksikite deneyleri” başlıklı standarda uygun olarak standard kapsamında yer alan L-929 hücre hattı ile etkileştirilmiştir.

Çalışmalardan elde edilen bulgular ayrı ayrı değerlendirilmiş ve bu kapsamda sırasıyla, PCL doku iskelesi üzerinde EGF derişiminin etkisi, PCL-SF Doku İskelesi üzerinde EGF derişiminin etkisi, eşit EGF içerikli PCL ve PCL-SF doku iskelelerinin etkisi ve EGF içeren PCL ve PCL-SF doku iskelelerinin hücre canlılığına etkisi ile ilgili genel değerlendirmeler aşağıda ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir.

4.4.1. PCL Doku İskelesinde Yer Alan EGF Derişiminin Hücre Canlılığına Etkisi

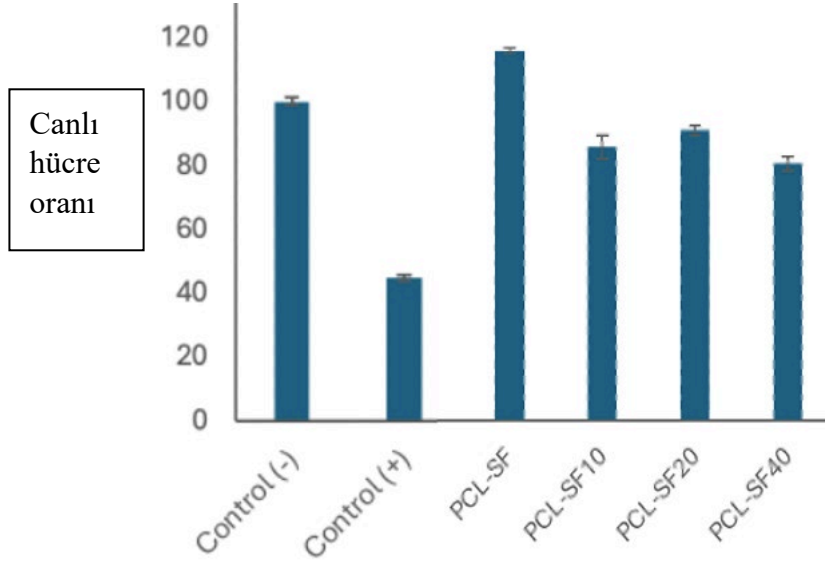
Geliştirilen doku iskelelerinden yapısında sadece PCL ve değişik oranlarda EGF içeren örneklerin L-929 hücreleri ile etkileştirilmesi sonucu genel olarak tüm örneklerin negatif kontrole yakın oranda bir hücre canlılığı sergilediğı ortaya konulmuştur. Öte yandan yapısında sadece PCL içeren formların oldukça yüksek bir canlılığa sahip olması söz konusu olmasına rağmen diğer EGF yüklü (farklı oranlarda) PCL esaslı doku iskelelerinde % 90'lar dolayında bir canlılık değerine doğru azalmalar (Şekil 4.12.) belirlenmiştir. Burada belirtilen canlılık değerlerindeki azalmaların (az da olsa) yapılan çalışmalarda kullanılan ticari EGF'ün sahip olduğı safsızlıklardan kaynaklandığı (satın alınan EGF'ün yaklaşık olarak % 98 saflıkta olduğı bildirilmiştir) düşünölmektedir. Ayrıca yine Şekil 4.12'den anlaşılacağı üzere doku iskelesindeki EGF miktarı arttıkça bu değer bir miktar daha azalmaktadır ve bu eğilim öngörölen olumsuzluk görüşünü desteklemektedir (Ek 3).



Şekil 4.12 Farklı Miktarlarda EGF İçeren PCL Doku İskelelerinin Hücre Canlılığına Etkisi

4.4.2. PCL-SF Doku İskelesi üzerinde EGF derişiminin Hücre Canlılığına Etkisi

Bir önceki bölümde gerçekleştirilen deneysel çalışmaların çift katmanlı (PCL ve ipek fibroinden oluşan) doku iskeleleri ile tekrarlanması durumunda Şekil 4.13.'de verilen değerler elde edilmiştir.



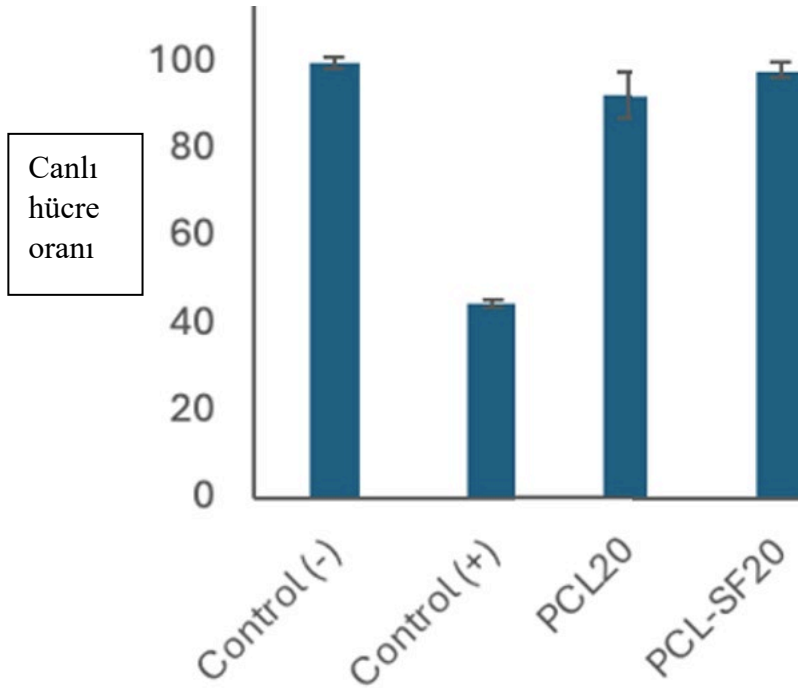
Şekil 4.13. Farklı Miktarlarda EGF İçeren PCL-İpek Fibroin Doku İskelelerinin Hücre Canlılığına Etkisi

Elde edilen verilere göre burada da genel olarak tüm doku iskelelerinin negatif kontrole oldukça yakın değerlerde canlılık değerlerine sahip olduğu gözlemlenmektedir. Ancak burada EGF içeren örnekler arasında özellikle 20 µg EGF/mg doku iskelesi değerinde içeriğe sahip PCL-İpek protein değerine sahip örnek için diğerlerinden daha yüksek bir canlılık değeri elde edildiği anlaşılmaktadır. Bunun nedeni olarak EGF yüklü örneklerin genel olarak saf PCL-İpek Fibroin doku iskelelerinden bir miktar düşük olması burada da kullanılan EGF'nin sahip olduğu safsızlık ile ilgili olumsuzluk burada da geçerli olmasına rağmen kullanılan EGF'nin optimal değere sahip olmasından kaynaklanabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

4.4.3. Eşit EGF İçerikli PCL ve PCL-SF Doku İskelelerinin Hücre Canlılığına Etkisi

Hücre etkileşim testlerinden eşit oranlarda EGF'ün kullanılarak hazırlandığı PCL ve PCL-İpek Protein doku iskelelerinin sahip olduğu hücre canlılık değerlerinin karşılaştırıldığı bölümde elde edilen canlılık değerleri Şekil 4.14.'te sunulmuştur.

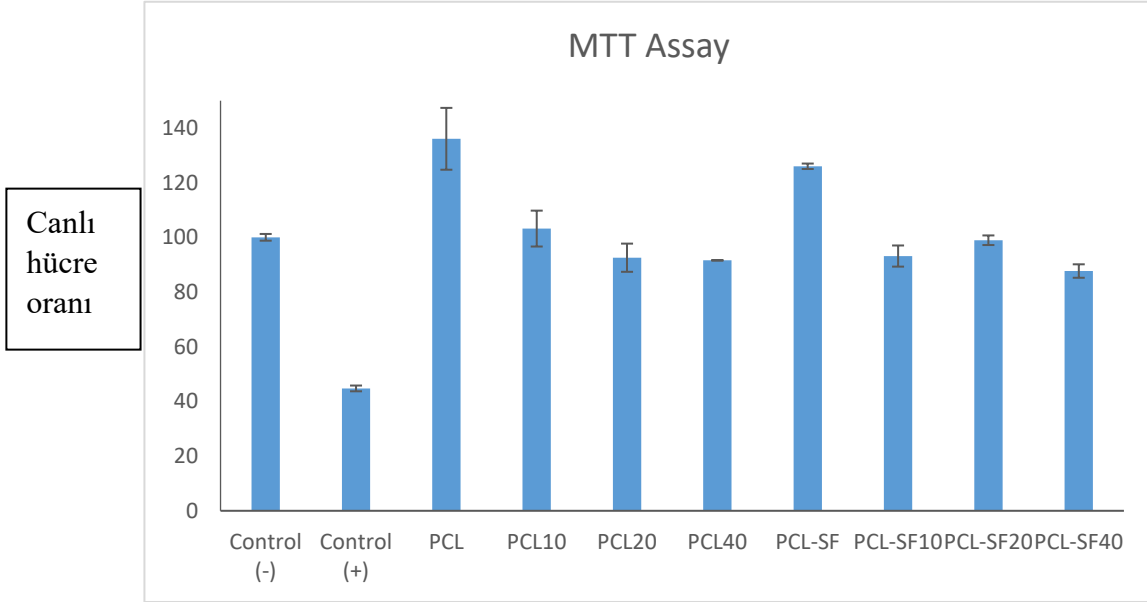
Şekil 4.14.'ten anlaşılacağı üzere kullanılan EGF değeri PCL ve PCL-İpek Fibroin doku iskelelerinde aynı orana sahip olmasına rağmen (her iki örneğin hazırlanmasında da 20 mg EGF/mg doku iskelesi kullanılmıştır) PCL-İpek Fibroin yapılarının hücre canlılığını bir miktar daha fazla desteklediği anlaşılmıştır. Bunun gerekçesi olarak ilgili örnekte yer alan PCL ve İpek Fibroin katmanlarının daha az oranda EGF içermesinin (burada özellikle katmanlardan biri olan ipek fibroinin daha kalın çaplı nanofiberler oluşturmasından dolayı EGF emdirilebilecek boşlukların az da olsa düşmesi nedeniyle) safsızlık etkisinin daha az olabileceği ve böylece daha yüksek hücre tutunması/canlılığı değerlerine ulaşılmasının söz konusu olduğu düşünülmektedir.



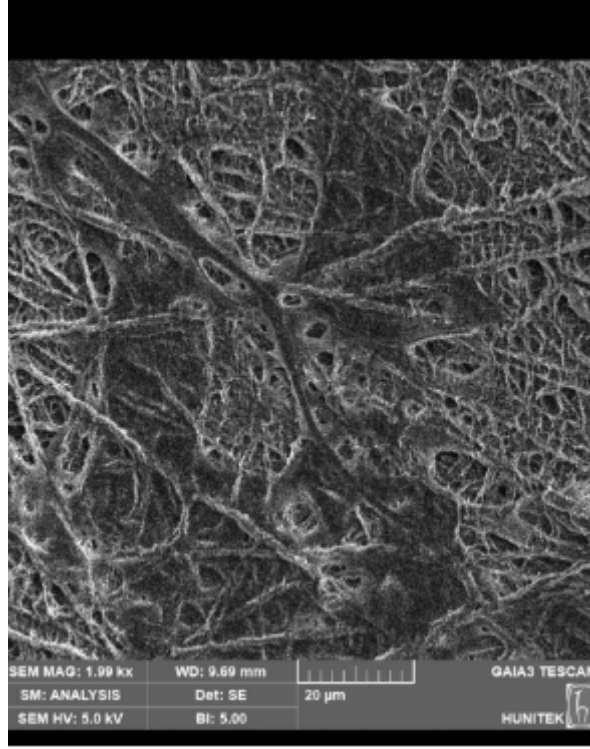
Şekil 4.14. Eşit Miktarlarda EGF İçeren PCL ve PCL-İpek Fibroin Doku İskelelerinin Hücre Canlılığına Etkisi

4.4.4. EGF İçeren PCL ve PCL-SF Doku İskelelerinin Hücre Canlılığına Etkisi Genel Değerlendirmeler

Bu bölümde buraya kadar elde edilen ve ayrı ayrı değerlendirilen doku iskeleleri ve hücre etkileşim çalışmaları verilerine göre genel birtakım değerlendirmeler yapılmıştır. Buna göre genel hatlarıyla yapılan çalışmalarda geliştirilen tüm örneklerde hücre canlılıklarının ilgili kaynaklarda işaret edildiği gibi negatif kontrole göre %80’li değerlerin üzerinde olduğu [82] belirlenmiştir (şekil 4.15). Ayrıca tek katmanlı ya da çift katmanlı tüm örneklerde doku iskelelerine EGF ilave edilmediği durumlarda EGF içeren iskelelere göre daha yüksek hücre canlılıkları değerlerinin elde edildiği bunun da önceki bölümlerde ayrıntılı olarak ifade edildiği gibi yapılan çalışmalarda kullanılan EGF’n sahip olduğu bilinen safsızlıklardan dolayı olduğu dşnlmektedir.



şekil 4.15. EGF İçeren ve İçermeyen PCL ve PCL-İpek Fibroin Doku İskelelerinin Hücre Canlılığına Etkilerinin genel değerlendirilmesi



Şekil 4.16. Polikaprolakton doku iskelesinde gözlenen L929 fibroblast hücreleri SEM görüntüsü

5. SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmaları kapsamında özellikle orta kulak iltihabı vb rahatsızlıklardan dolayı meydana gelen kulak zarı (timpanik membran) hasarlarının onarılmasında kullanılmak üzere yapay kulak zarı geliştirilmesi ve geliştirilen membranın hücre etkileşimleri gibi klinik öncesi testlerin yapılması sağlanmıştır. Bu kapsamda yapılan deneysel çalışmalar başlıca dört ana bölümde değerlendirilmiştir. Bunlar sırasıyla membran geliştirilmesinde kullanılacak olan materyal seçimi ve proses edilmeleri, elektroegirme yöntemiyle yapay kulak zarı geliştirilmesi ve gerekli karakterizasyon çalışmaları, membranlara büyüme faktörleri ilavesi ve bu faktörlerin salım çalışmaları ile membranların hücreler ile etkileşimlerinin incelenmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen/ulaşılacak başlıca sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

Öncelikle literatürde kullanılan yapılar arasından doğal bir polimer olması ve hedeflenen hücre etkileşimlerinde iyileşme açısından katkı sağlaması beklenen ipek proteinlerinden ipek fibroin seçilmiş ve özellikle doku iskelesi açısından fibriler formda yapılar elde edilmesi için elektroegirme yöntemi kullanılarak hedef doku iskelelerinin hazırlanması sağlanmıştır. Söz konusu yöntemin kullanıldığı ve literatürde yer alan bilgilere göre daha sonrasında elde edilen çözelti karakterize edildiğinde polimerik yapının molekül ağırlığının 100 kDa dolayında olduğu ifade edilmiştir [61]. Yapısal olarak ipek fibroinin mekanik dayanımı düşük bulunmuş ve bu yapıyı güçlendirmek adına önce naylon6 ve naylon 6/10 ile harmanlama yapılmış mekanik yeterlilik sağlanamadığından dolayı yine ilgili kaynaklarda farklı doku iskelelerinin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan polikaprolakton (PCL) ile ikinci bir tabaka oluşturulmuş ve gerekli mekanik dayanım sağlanabilmiştir.

Elde edilen mikro-nanofiber formundaki yapılar gerekli optimizasyon çalışmaları yapılarak hedeflenen doku iskelesi adayları olarak yaklaşık 100-500 nm aralığında kullanılan değişik parametrelere göre istenilen çaplarda hazırlanabilen fibriler matris formunda yapıların hazırlanması başarı ile sağlanmış ve yapılan morfolojik değerlendirmeler ile gerekli teyidler yapılmıştır.

Geliştirilen doku iskelelerine hedef uygulama olan yapay kulak zarı modelinde katkı sağlamak üzere büyüme faktörü ilavesi (Epidermal Growth Factor, EGF) gerçekleştirilmiş

ve yapılan çalışmalarda EGF başlangıç yükleme oranları ile salım ortamı sıcaklıklarının etkileri değerlendirilmiş ve gerek başlangıç oranları ve gerekse salım ortamı sıcaklıklarının artması ile EGF salımının artmış olduğu belirlenmiştir.

Yapılan mekanik test değerlendirme çalışmalarında elde edilen temel matriksin özellikle mekanik dayanımı sağlamak üzere kullanılan PCL yapısındaki membranlar üzerine yoğunlaşmış ve elde edilen elastiklik modülünün literatürde yer alan benzer çalışmalardaki hedef büyüklüklere ulaşılabilirdiği anlaşılmıştır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen son bölüm çalışmalarında, geliştirilen doku iskelelerinin tamamı hücresel etkileşimlere tabi tutularak in vitro testler uluslararası uygun standartlara göre gerçekleştirilmiştir. Buradan elde edilen sonuçlara göre doku iskelesi hazırlanmasında kullanılan tüm formülasyonlar ile elde edilen matrikslerin/doku iskelelerinin hücreler ile (L929 fibroblast hücreleri) etkileştirildiklerinde herhangi bir olumsuzluk oluşturmadığı ve hücre canlılıklarını % 90'ların dolayında ve üzerinde sağladığı belirlenmiştir. Yapılan hücre etkileşim testleri arasında özellikle EGF'nin kullanıldığı formlarda bir miktar canlılık düşüşü yaşandığı bunun da çalışmalarda kullanılan EGF'nin ticari form olarak içerdiği safsızlıklardan (% 2 oranında) kaynaklandığı düşünülmektedir. Öte yandan canlılık değerlerinin değişimi konusunda özellikle yapısal özelliklere (başta malzeme türü ve elde edilen fiber çapları ve dolayısıyla doku iskelesi formundaki fiberler arası boşluklar nedeniyle EGF yükleme oranları değiştiğinden bu değişiklik hücre canlılıklarına da yansımıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Y. Vayısoğlu, H. Söken(2008) Prevalence of chronic suppurative otitis media in recruits who underwent a routine health examination at Güzelyalı Military Hospital between May 2007 and September 2007 *Gulhane Med J* 2008;50(4):238-240
- [2] Brar S, Watters C, Winters R. Tympanoplasty. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021
- [3] Bhat NA, Ranit De Retrospective Analysis of Surgical Outcome, Symptom Changes, and Hearing Improvement Following Myringoplast *J Otolaryngol.* 2000 Aug;29(4):229-32. PMID: 11003075.
- [4] A.P.S. Immich, P.C. Pennacchi, A.F. Naves, S.L. Felisbino, R.L. Boemo, S.S. Maria Engler, L. Catalani Improved tympanic membrane regeneration after myringoplastic surgery using an artificial biograft *Materials Science and Engineering: C* Volume 73 1 April 2017
- [5] Mozaffari M, Jiang D, Tucker A.S. Developmental aspects of the tympanic membrane: Shedding light on function and disease onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/dvg.23348
- [6] Isaacson B Anatomy and Surgical Approach of the Ear and Temporal Bone *Head and Neck Pathology* 12(1) September 2018 DOI:10.1007/s12105-018-0926-2
- [7] Akkoca Ö, Kaytez S, Kaptan Z, Coşkun Özdemir C, The effectiveness of repairment of traumatic tympanic membrane perforations with cigarette paper. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2022; 28(2): 217–221.
- [8] Huang P, Zhang S, Gong X, Wang X, Lou Z.H. Endoscopic observation of different repair patterns in human traumatic tympanic membrane perforations. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2018;84:545–52.

- [9] Bayram A, Muluk N, Cingi C, Bafaqeeh S Success rates for various graft materials in tympanoplasty - A review *J Otol.* 2020 Sep;15(3):107-111. doi: 10.1016/j.joto.2020.01.001. Epub 2020 Jan 7. PMID: 32884562; PMCID: PMC7451680.
- [10] Luers JC, Hüttenbrink KB. Surgical anatomy and pathology of the middle ear. *J Anat.* 2016 Feb;228(2):338-53.
- [11] Akyigit A, Sakallioğlu O, Karlidag T. Endoscopic tympanoplasty. *J Otol.* 2017 Jun;12(2):62-67.
- [12] Villar-Fernandez, M. A., & Lopez-Escamez, J. A. (2015). Outlook for tissue engineering of the tympanic membrane. *Audiology Research*, 5(1). doi: 10.4081/audiores.2015.117
- [13] Moholkar D.N., Sadalage P.S., Peixoto D., Paiva-Santos A.C., Pawar K.D. Recent advances in biopolymer-based formulations for wound healing applications. *Eur. Polym. J.* 2021;160:110784. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110784
- [14] Prete S, Dattilo M, Patitucci F, Pezzi G Natural and Synthetic Polymeric Biomaterials for Application in Wound Management, *J Funct Biomater.* 2023 Sep; 14(9): 455.
- [15] Reddy M.S.B., Ponnamma D., Choudhary R., Sadasivuni K.K. A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds. *Polymers.* 2021;13:1105. doi: 10.3390/polym13071105.
- [16] Sıvacı K, Özgüvenç E, Bozkurt Y. Biyomedikal uygulamalarında eklemeli imalat teknolojileri *Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, Cilt 27, Sayı 1, 2022

- [17] Ahangar P, Cooke, M.E., Weber M.H., Rosenzweig, D. (2019) Current Biomedical applications of 3D printing and additive manufacturing, *Applied Sciences*, 9(8):1713. doi:10.3390/app9081713.
- [18] Mota C, Puppi D, Chiellini F and Chiellini E Additive manufacturing techniques for the production of tissue engineering constructs *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 9 174–90
- [19] Ciardelli G, Chiono V, Vozzi G, et al. 2005; Blends of poly-(ε-caprolactone) and polysaccharides in tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 6(4): 1961–1976
- [20] Şimşek, M. (2018). Elektroçirime Yöntemi ile Fibröz Doku İskelelerinin Üretimi. *Natural and Applied Sciences Journal*, 1(1), 31-34.
- [21] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, “Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique,” *Biotechnol Adv*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, May 2010, doi: 10.1016/J.biotechadv.2010.01.004.
- [22] Taylor Geoffrey, “Disintegration of water drops in an electric field,” *Proc R Soc Lond A Math Phys Sci*, vol. 280, no. 1382, pp. 383–397, Jul. 1964, doi: 10.1098/rspa.1964.0151.
- [23] A. K. Haghi and M. Akbari, “Trends in electrospinning of natural nanofibers,” in *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials Science*, Jun. 2007, vol. 204, no. 6, pp. 1830–1834. doi: 10.1002/pssa.200675301.
- [24] Dai X Tian X, Gu S,¹ Yang Y Hybrid biofabrication of neurosecretory structures as a model for neurosecretion *Int J Bioprint.* 2023; 9(2): 659
- [25] Güneri EA, Tekin S, Yılmaz O, Ozkara E, Erda TK, İkiz AO, et al. The effects of hyaluronic acid, epidermal growth factor, and mitomycin in an experimental

model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol* 2003;24:371-6.

- [26] Kakehata S, Hirose Y, Kitani R, Futai K, Maruya S, Ishii K, et al. Autologous serum eardrops therapy with a chitin membrane for closing tympanic membrane perforations. *Otol Neurotol* 2008;29:791-5.
- [27] Lou Z, Xu L, Yang J, Wu X. Outcome of children with edge-everted traumatic tympanic membrane perforations following spontaneous healing versus fibroblast growth factor-containing gelfoam patch-ing with or without edge repair. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2011;75:1285-8.
- [28] Hakuba N, Iwanaga M, Tanaka S, Hiratsuka Y, Kumabe Y, Konishi M, et al. Basic fibroblast growth factor combined with atelocollagen for closing chronic tympanic membrane perforations in 87 patients. *Otol Neurotol* 2010;31:118-21.
- [29] Koba R, Kawabata I. Immunohistochemical study of transforming growth factor-expression in normal and perforated tympanic membrane. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995;104:793-7.
- [30] Ramsay H, Heikkinen E, Laurila P. Effect of epidermal growth factor on tympanic membranes with chronic perforations: a clinical trial *Otolaryngol. Neck Surg* 1995;113:375-9.
- [31] Kaftan H, Herzog M, Mieke B, Hosemann W. Topical application of transforming growth factor beta-1 in acute traumatic tympanic membrane perforations: an experimental study in rats. *Wound Repair Regen* 2006;14:453-6.
- [32] Eken M, Ates G, Sanli A, Evren C, Bozkurt S. The effect of topical insulin on the healing of acute tympanic membrane perforations: a histopathologic study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264:999-1002.

- [33] Hong P, Bance M, Gratzner PF. Repair of tympanic membrane perforation using novel adjuvant therapies: a contemporary review of experimental and tissue engineering studies. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2013;77:3-12.
- [34] Knutsson J, Von Unge M, Rask-Andersen H. Localization of progenitor/stem cells in the human tympanic membrane. *Audiol Neurootol* 2011;16:263-9.
- [35] Hussain Z, Pei R Necessities, opportunities, and challenges for tympanic membrane perforation scaffolding-based bioengineering *Biomed. Mater.* 16 032004
- [36] Huang G, Li F, Zhao X, Ma Y, Li Y, Lin M, Jin G, Lu T J, Genin G M and Xu F 2017 Functional and biomimetic materials for engineering of the three-dimensional cell microenvironment *Chem. Rev.* 117 12764–850
- [37] O'Neill J.O. Brett K., Frank J.A Middle Ear Barotrauma Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-
- [38] 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.
- [39] Chasin, M., Langer, R., 1990. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems, *Marcel Dekker*, New York.
- [40] Ashton, H., Mertz, J.A.M., Harper, J.L., Slepian, M.J., Mills, J.L., McGrath, D.V., Vande Geest, J.P., 2011. Polymeric endoaortic paving: Mechanical, thermoforming, and degradation properties of polycaprolactone/polyurethane blends for cardiovascular applications, *Acta Biomaterialia*, 7, 287-294
- [41] Gaucher, G., Dufresne, M.H., Sant, V.P., Kang, N., Maysinger, D., Leroux, J.C., 2005. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 109, 169-188.

- [42] G. Pitt Poly- ϵ -caprolactone and its copolymers, biodegradable polymers as drug delivery systems *Marcel Dekker*, New York (1990), pp. 71-120
- [43] Middleton, J.C., Tipton, A.J., 2000. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices, *Biomaterials*, 21, 2335-2346.
- [44] Alani A., Knowles, J.C., Chrzanowski, W., Ling Ng, Y., Gulabivala, K., 2009. Ion release characteristics, precipitate formation and sealing ability of a phosphate glass–polycaprolactone-based composite for use as a root canal obturation material, *Dental Materials*, 25, 400-410.
- [45] Hutmacher, W., 2001 Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues-state of the art and future perspectives, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 12, 107-124.
- [46] Jeong, S.I., Kim, B.S., Kang, S.W., Kwon, J.H., Lee, Y.M., Kim S.H., Kim, Y.H., 2004. In vivo biocompatibility and degradation behavior of elastic poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) scaffolds, *Biomaterials*, 25, 5939-5946.
- [47] Lu, X.L., Sun, Z.J., Cai, W., Gao, Z.Y., 2008. Study on the shape memory effects of poly (L-lactide-co-epsilon-caprolactone) biodegradable polymers, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 395-399.
- [48] Dai, N.T., Williamson, M.R., Khammo, N., Adams E.F., Coombes, A.G.A., 2004. Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin, *Biomaterials*, 25, 4263-4271.
- [49] D. Chouhan and B. B. Mandal, “Silk biomaterials in wound healing and skin regeneration therapeutics: From bench to bedside,” *Acta Biomater*, vol. 103, pp. 24–51, Feb. 2020, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2019.11.050.
- [50] P. P. Patil, M. R. Reagan, and R. A. Bohara, “Silk fibroin and silk-based biomaterial

derivatives for ideal wound dressings,” *Int J Biol Macromol*, vol. 164, pp. 4613–4627,

Dec. 2020, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.08.041.

- [51] M. Gholipourmalekabadi, S. Sapru, A. Samadikuchaksaraei, R. L. Reis, D. L. Kaplan, and S. C. Kundu, “Silk fibroin for skin injury repair: Where do things stand?,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 153, pp. 28–53, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.ADDR.2019.09.003.
- [52] Castro-Domínguez C., Lozano-Picazo P., Álvarez-López A., Garrote-Junco J., Panetsos F., Guinea G.V., Elices M., Rojo F.J., González-Nieto D., Colchero L., et al. Axonal Guidance Using Biofunctionalized Straining Flow Spinning Regenerated Silk Fibroin Fibers as Scaffold. *Biomimetics*. 2023;8:65. doi: 10.3390/biomimetics8010065.
- [53] Nguyen T.P., Nguyen Q.V., Nguyen V.H., Le T.H., Huynh V.Q.N., Vo D.V.N., Trinh Q.T., Kim S.Y., Van Le Q. Silk Fibroin-Based Biomaterials for Biomedical Applications: A Review. *Polymers*. 2019;11:1933. doi: 10.3390/polym11121933.
- [54] Zhou J., Wu N., Zeng J., Liang Z., Qi Z., Jiang H., Chen H., Liu X. Chondrogenic Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells Induced by Decellularized Cartilage Matrix/Silk Fibroin Secondary Crosslinking Hydrogel Scaffolds with a Three-Dimensional Microstructure. *Polymers*. 2023;15:1868. doi: 10.3390/polym15081868
- [55] Lovati A.B., Lopa S., Bottagisio M., Talò G., Canciani E., Dellavia C., Alessandrino A., Biagiotti M., Freddi G., Segatti F., et al. Peptide-Enriched Silk Fibroin Sponge and Trabecular Titanium Composites to Enhance Bone Ingrowth of Prosthetic Implants in an Ovine Model of Bone Gaps. *Front Bioeng. Biotechnol*. 2020;8:563203. doi: 10.3389/fbioe.2020.563203.
- [56] Tan G., Jiang F., Jia T., Qi Z., Xing T., Kundu S.C., Lu S. Glucose-Responsive Silk Fibroin Microneedles for Transdermal Delivery of Insulin. *Biomimetics*. 2023;8:50. doi: 10.3390/biomimetics8010050.

- [57] Tanzi M.C., Marcolin C., Draghi L., Farè S. 2D and 3D Electrospun Silk Fibroin Gelatin Coatings to Improve Scaffold Performances in Cardiovascular Applications. *Mater. Proc.* 2020;2:20. doi: 10.3390/CIWC2020-06843.
- [58] Shokri R., Fuentes-Chandía M., Ai J., Habibi Roudkenar M., Reza Mahboubian A., Rad Malekshahi M., Nasser Ostad S. A Thermo-Sensitive Hydrogel Composed of Methylcellulose/Hyaluronic Acid/Silk Fibrin as a Biomimetic Extracellular Matrix to Simulate Breast Cancer Malignancy. *Eur. Polym. J.* 2022;176:111421. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111421.
- [59] Soriful Islam S, Greco S, Janjusevic M et. al. Growth factors and pathogenesis *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* Volume 34, July 2016, Pages 25-36
- [60] Dvorak D, Abbas G, Ali T, Stevenson S, Welling DB. Repair of chronic tympanic membrane perforations with long-term epidermal growth factor. *Laryngoscope* 1995;105:1300-4.
- [61] Kaplan et.al. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin *Nat Protoc.* 2011 Sep 22;6(10):1612-31. doi: 10.1038/nprot.2011.379. PMID: 21959241; PMCID: PMC3808976.
- [62] E. Yalçın, “Sulardan Ağır Metal Giderimi İçin Nanofibriler Filtrelerin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara Hacettepe Üniversitesi, 2012.
- [63] Mma Sill, T. J., & Von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989-2006.
- [64] Ahmadi Bonakdar, M., & Rodrigue, D. (2024). Electrospinning: Processes, structures, and materials. *Macromol*, 4(1), 58-103.

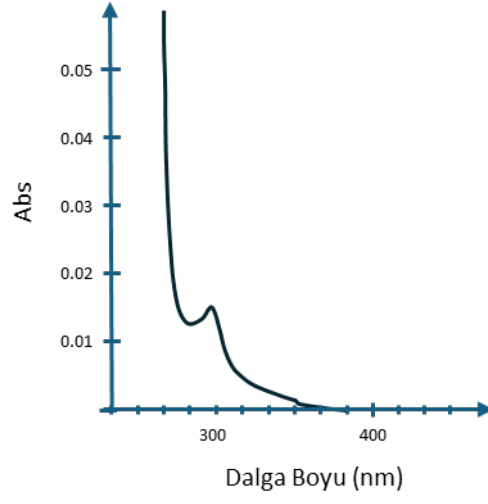
- [65] Singh, Y. P., Dasgupta, S., Nayar, S., & Bhaskar, R. (2020). Optimization of electrospinning process & parameters for producing defect-free chitosan/polyethylene oxide nanofibers for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 31(6), 781-803.
- [66] Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J., Harris, D. E. A., & Tan, N. B. (2001). The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, 42(1), 261-272.
- [67] Anand, S., Danti, S., Moroni, L., & Mota, C. (2022). Regenerative therapies for tympanic membrane. *Progress in Materials Science*, 127, 100942.
- [68] Hakuba, N., Hato, N., Okada, M., Mise, K., & Gyo, K. (2015). Preoperative factors affecting tympanic membrane regeneration therapy using an atelocollagen and basic fibroblast growth factor. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 141(1), 60-66.
- [69] Seonwoo, H., Shin, B., Jang, K. J., Lee, M., Choo, O. S., Park, S. B., ... & Chung, J. H. (2019). Epidermal growth factor–releasing radially aligned electrospun nanofibrous patches for the regeneration of chronic tympanic membrane perforations. *Advanced healthcare materials*, 8(2), 1801160.
- [70] Lou, Z., Lou, Z., Jiang, Y. & Chen, Z. (2021). FGF2 and EGF for the regeneration of tympanic membrane: a systematic review. *Stem Cells International*, 2021(1), 2366291.
- [71] Yalçın, E., Gedikli, S., Çabuk, A., Karahaliloğlu, Z., Demirbilek, M., Bayram, C., Şam, M., Sağlam, N., Denkbaş, E. B. (2015). Silk fibroin/nylon-6 blend nanofilter matrix for copper removal from aqueous solution. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 17, 921-934. doi.10.1007/s10098-014-0845-1

- [72] Zhang, F., Zuo, B. Q., & Bai, L. (2009). Study on the structure of SF fiber mats electrospun with HFIP and FA and cells behavior. *Journal of Materials Science*, 44, 5682-5687. Doi. 10.1007/s10853-009-3800-5.
- [73] Feenstra, L., Kohn, F. E., & Feyen, J. (1984). The concept of an artificial tympanic membrane. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, 9(4), 215-220.
- [74] Sainsbury, E., do Amaral, R., Blayney, A. W., Walsh, R. M., O'Brien, F. J., & O'Leary, C. (2022). Tissue engineering and regenerative medicine strategies for the repair of tympanic membrane perforations. *Biomaterials and Biosys.*, 6, 100046. <https://doi.org/10.1016/j.bbiosy.2022.100046>.
- [75] Hutmacher, D., Hürzeler, M. B., & Schliephake, H. (1996). A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 11(5).
- [76] Feenstra, L., Kohn, F. E., & Feyen, J. (1984). The concept of an artificial tympanic membrane. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, 9(4), 215-220.
- [77] Kalluri L, Satpathy M, Duan Y. Effect of Electrospinning Parameters on the Fiber Diameter and Morphology of PLGA Nanofibers. *Dent Oral Biol Craniofacial Res.* 2021;4(2):10.31487/j.dobcr.2021.02.04. doi: 10.31487/j.dobcr.2021.02.04. Epub 2021 May 20. PMID: 36970249; PMCID: PMC10035641.
- [78] Ahmadi Bonakdar M, Rodrigue D. Electrospinning: Processes, Structures, and Materials. *Macromol.* 2024; 4(1):58-103. <https://doi.org/10.3390/macromol4010004>
- [79] Singh, Y. P., Dasgupta, S., Nayar, S., & Bhaskar, R. (2020). Optimization of electrospinning process & parameters for producing defect-free chitosan/polyethylene oxide nanofibers for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 31(6), 781-803.

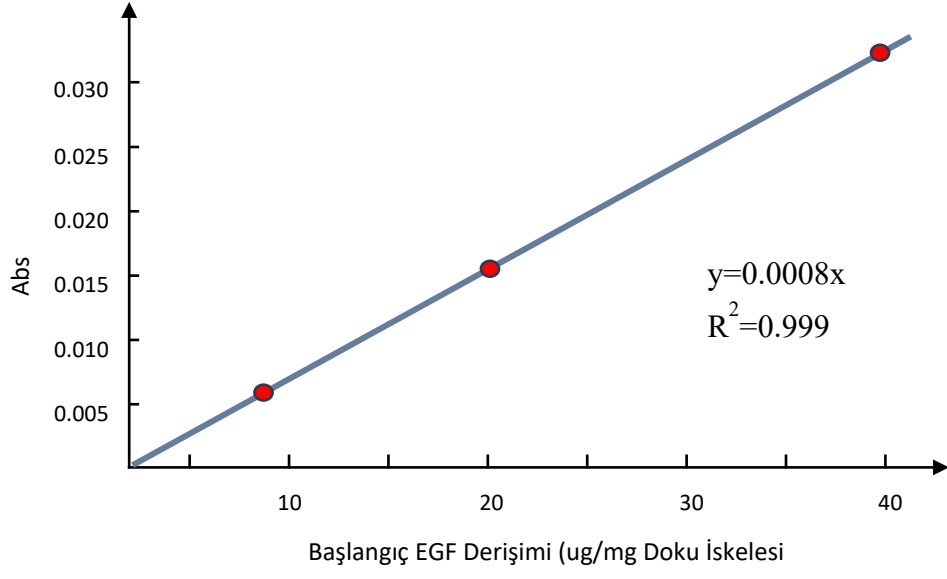
- [80] Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J., Harris, D. E. A., & Tan, N. B. (2001). The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, 42(1), 261-272.
- [81] Yaseri, R., Fadaie, M., Mirzaei, E., Samadian, H., & Ebrahimezhad, A. (2023). Surface modification of polycaprolactone nanofibers through hydrolysis and aminolysis: a comparative study on structural characteristics, mechanical properties, and cellular performance. *Scientific Reports*, 13(1), 9434.
- [82] Jung O, Smeets R, Hartjen P, Schnettler R, Feyerabend F, Klein M, Wegner N, Walther F, Stangier D, Henningsen A, Rendenbach C, Heiland M, Barbeck M, Kopp A. Improved In Vitro Test Procedure for Full Assessment of the Cytocompatibility of Degradable Magnesium Based on ISO 10993-5/-12. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 10;20(2):255. doi: 10.3390/ijms20020255. PMID: 30634646; PMCID: PMC6359522

EKLER

EK 1:EGF SPEKTROFOTOMETRİK DALGA BOYU TARAMA GRAFİĞİ



EK 2: EGF SALIM DENEYLERİNDE KULLANILAN ABSORBANS/DERİŞİM KALİBRASYON GRAFİĞİ



EK 3; DOKU İSKELESİ-HÜCRE ETKİLEŞİMLERİNDE ELDE EDİLEN MTT DEĞERLERİ

OD 595									ortalama	std sapma
Control (-)	0,975	0,996	0,9855	101,4713	100,0	0,012124	1,230622	Control (-)	100,0283	1,230622
Control (+)	0,432	0,45	0,441		44,8	0,010392	1,054819	Control (+)	44,7615	1,054819
PCL	1,437	1,244	1,3405		136,1	0,111429	11,31	PCL	136,0608	11,31
PCL10	1,073	0,961	1,017		103,2	0,064663	6,563318	PCL10	103,2255	6,563318
PCL20	0,868	0,956	0,912		92,6	0,050807	5,156893	PCL20	92,568	5,156893
PCL40	0,902	0,903	0,9025		91,6	0,000577	0,058601	PCL40	91,60375	0,058601
PCL-SF	1,25	1,233	1,2415		126,0	0,009815	0,996218	PCL-SF	126,0123	0,996218
PCL-SF10	0,885	0,951	0,918		93,2	0,038105	3,867669	PCL-SF10	93,177	3,867669
PCL-SF20	0,99	0,96	0,975		99,0	0,017321	1,758032	PCL-SF20	98,9625	1,758032
PCL-SF40	0,843	0,885	0,864		87,7	0,024249	2,461244	PCL-SF40	87,696	2,461244