FARZANEH MOGHTADER

Kök Hücre ve Doku Mühendisliği

İSTANBUL-2021

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

↓

← Yazılan tez hangi Yüksek Lisans / Doktora programına ait ise adı yazılacak.
Örn; “Kök Hücre ve Doku Mühendisliği” gibi...

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

# JELATİN MİKROKÜRELERE BAKTERİYOFAJ, FGF VE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE YÜKLEME ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

**FARZANEH MOGHTADER**

**DANIŞMAN**
**PROF. DR. ERDAL KARAÖZ**
**EŞ-DANIŞMAN**
**PROF. DR. YASUHIKO TABATA**

**KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ**

**İSTANBUL-2021**

**TEZ ONAYI**

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

| Anabilim Dalı Başkanı | Enstitü Müdürü |
|---|---|
| Prof. Dr. Erdal Karaöz | Prof. Dr. Semra Sardaş |

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Prof. Dr. Erdal Karaöz
Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri

| | |
|---|---|
| Prof. Dr. Erdal Karaöz<br>(Jüri Başkanı ve Danışman) | İstinye Üniversitesi<br>Histoloji ve Embriyoloji ABD |
| Doç. Dr. Nelisa Laçin Türkoğlu | Yıldız Teknik Üniversitesi<br>Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü |
| Dr. Öğretim Üyesi Hakan Darıcı | İstinye Üniversitesi<br>Histoloji ve Embriyoloji ABD |

## ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum, "Jelatin Mikrokürelere Bakteriyofaj, bFGF ve Mezenkimal Kök Hücre Yükleme Etkinliğinin Araştırılması" adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Farzaneh Moghtader

# İTHAF

Sevgili Annem Akram Kanz ve Babam Gholamali Moghtader'e ithaf ediyorum

## TEŞEKKÜR

Öncelikle benim bu tezi gerçekleştirmeme olanak sağlayan ve her türlü desteği veren - tez danışmanım - İstinye Üniversitesi Rektörü - çok değerli öğretim üyesi - sayın Prof.Dr. Erdal Karaöz'e en derin şükranlarımı arz ederim.

Tezimin deneysel çalışmalarının başlangıç bölümünü gerçekleştirdiğim, Kyoto Üniversitesi, (Kyoto, Japonya), "Frontier Medical Sciences" Enstitüsü, Biyomateryaller Bölümü öğretim üyesi - ortak tez danışmanım Prof.Dr. Yasuhiko Tabata ilgili tüm araştırmalarımda tam desteğini esirgememiş, doğru yönlenmemi sağlamış, tüm laboratuvar imkanlarını kullanmama izin vermiş ve gerekli tüm malzemeleri temin etmiştir - Kyoto'da bulunduğum sürede kişisel giderlerime destek sağlamıştır - minnettarım. Prof. Tabata grubunun tüm üyeleri / sevgili Japon dostlarım laboratuvar çalışmalarımı yürütmemde her türlü desteği vermişlerdir - sağ olsunlar.

Ar-Ge müdürü olarak çalıştığım - laboratuvarlarını tam zamanlı kullandığım, Bilkent Üniversitesi Teknoloji Geliştirme Bölgesinde - Bilkent-CYBERPARK'da yer alan Nanobiyomedtek Biyomedikal ve Biyoteknoloji Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti.'e sağladığı tüm imkanlar ve maddi desteği nedeniyle teşekkür ederim.

Tezimin şekillendirmesi, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında sürekli desteğini aldığım - her zaman yanımda duran - destek veren Nanobiyomedtek Yüneticisi, sayın Prof. Dr. Erhan Bişkin'e en derin saygılarımı sunarım.

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİİ
ETİK BEYANI ..... İV
İTHAF ..... V
TEŞEKKÜR ..... Vİ
İÇİNDEKİLER ..... Vİİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... X
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... Xİİİ
ÖZET ..... XV
ABSTRACT ..... XVİ
GİRİŞ ..... 1
1. GENEL BİLGİLER ..... 5
1.1. Diyabet ..... 5
1.2. Bakteriler ve Bakteriyofajlar ..... 9
1.2.1. Hedef Bakteri ..... 9
1.2.2. Bakteriyofajlar ..... 12
1.2.3. T4 Bakteriyofajı ..... 17
1.3. Jelatin ..... 19
1.4. Doku Mühendisliği: Mezenkimal Kök Hücreler ..... 23
1.5. Büyüme Faktörleri ..... 27
2. MATERYAL VE METOD ..... 31
2.1. Bakteri ve Bakteriyofajlar ..... 31
2.1.1. Bakterilerin Çoğaltılması ..... 31
2.1.2. Bakteriyofajların Çoğaltılması ..... 33
2.2. Jelatin Mikroküreler ..... 35
2.2.1. Jelatin Mikrokürelerin Hazırlanması ..... 35
2.2.2. Jelatin Mikrokürelerin Su Absorpsiyonu/Şişmesi ..... 37
2.2.3. Jelatin Mikrokürelerin Degredasyonu ..... 37
2.2.4. Jelatin Mikrokürelere Bakteriyofaj Yüklemesi ve Salımı ..... 38
2.2.5. Jelatin Mikrokürelere bFGF Yüklemesi ve Salımı ..... 39

2.3. Mezenkimal Kök Hücreler ve Hücre Kümeleri ..... 41
2.3.1. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ..... 41
2.3.2. 2D Kök Hücre Kültürü ..... 42
2.3.3. 3D Hücre Kümelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu ..... 43
3. BULGULAR ..... 47
3.1. Bakteri ve Bakteriyofajlar ..... 47
3.1.1. Escherichia coli ..... 47
3.1.2. T4 Bakteriyofajı ..... 48
3.2. Jelatin Mikroküreler ..... 51
3.2.1. Üretilen Jelatin Mikroküreler ..... 51
3.2.2. Jelatin Mikrokürelerin Suda Şişmesi ..... 52
3.2.3. Jelatin Mikrokürelerin Degredasyonu ..... 52
3.2.4. Jelatin Mikrokürelere Bakteriyofaj Yüklenmesi ve Salımı ..... 55
3.2.5. Jelatin Mikrokürelere bFGF Yüklenmesi ve Salımı ..... 57
3.3. Mezenkimal Kök Hücreler ve Hücre Kümeleri ..... 58
3.3.1. Adipoz Dokudan İzole Edilen Kök Hücreler ..... 58
3.3.2. Kök Hücre Kümeleri ..... 60
4. TARTIŞMA ..... 64
4.1. Bakteri ve Bakteriyofajlar Özellikleri ..... 65
4.1.1. *Escherichia coli* büyüme eğrisi ..... 65
4.1.2. Çoğaltılan T4 bakteriyofajı aktivitesi ..... 67
4.2. Jelatin Mikroküreler ..... 68
4.2.1. Jelatin mikroküre üretimi ..... 69
4.2.2. Jelatin mikroküre degredasyonu ..... 71
4.2.3. Jelatin mikrokürelerden bakteriyofaj salımı ..... 73
4.2.4. Jelatin mikrokürelerden bFGF salımı ..... 76
4.3. Mezenkimal Kök Hücreler ve Hücre Kümeleri ..... 79
4.3.1. Kök hücreler ..... 79
4.3.2. Kök hücre kümeleri ..... 80
5. SONUÇ ..... 84
KAYNAKÇA ..... 86
İNTİHAL RAPORU ..... 120

## TABLOLAR LİSTESİ

Table 3.1: Bazik jelatinden hazırlanan ve kimyasal yöntem ile - GA kullanılarak - üç farklı GA/jelatin oranında - farklı miktarlarda çapraz bağlı mikroküreleri̇n “yüzde su alma kapasiteleri” - SAY (%) ve kuru ortalama çap - D (μm) değerleri. ..... 52

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1: (A) Escherichia coli nin bir örnek SEM fotoğrafı; ve (B) E. coli'yi izole eden/tanımlayan Theodor Escherich (Shulman ve ark., 2007) ..... 9
Şekil 1.2: Dünyada E. coli enfeksiyonları ve buna bağlı ölümler (WHO, 2012) ..... 11
Şekil 1.3: E. coli kaynakları/bulaşma yolları İlgili kaynaktan uyarlanmıştır (Croxen ve ark., 2013) ..... 11
Şekil 1.4: Virüslere örnekler (Napa Valley, 2016) ..... 12
Şekil 1.5: Virüsler - canlı türüne özgün olarak hemen hemen tüm canlıları enfekte edebilirler. Sağ altta görülen fotoğraf bu tezde de incelenen E. coli ve üzerine biriken - ona özgün T4 fajlarını göstermektedir (Britannica, 2016; World Press, 2016a) ..... 12
Şekil 1.6: Frederick W. Twort (en soldakai fotoğraf - bakteriyofajleri bulan bir İngiliz bakteriyolog), Felix d'Herelle (ortadaki fotoğraf - "bakteriyofaj" adını koyan - bu alanda çok önemli katkıları bulunan bir bir Fransız-Kanadalı bilim adamı). Elena Makashvili, Felix D'Herelle ve George Eliava (en sağdaki fotoğraf) Gürcistan, Tiflis, Eliva Enstitüsü'nde faj konusunda tartışırken (Twort, 1915; D'Herelle, 1917) ..... 14
Şekil 1.7: Bakteriyofajlar: 3D yapıları/morfolojileri ve nükleik asit özellikleri. (Slide Share, 2016) ..... 15
Şekil 1.8: T2 fajının Luria ve Anderson tarafından 1942 çekilen SEM fotoğrafı ve diğer 4 farklı fajın elektron mikroskop görüntülerine örnekler (Slide Share, 2016; ASM Org, 2016; Britannica, 2016; Study Blue, 2016) ..... 15
Şekil 1.9: Bakteriyofajların "litik" ve "lizojenik" yaşam tarzları (World Press, 2016b) 16
Şekil 1.10: T4 fajının 3B yapısı (üst sol); T4'ün bakteri duvarına yapışması/yerleşmesi ve DNA'sını bakteri içine enjeksiyonu (alt sol); ve hedef bakteri E. coli 'yi konak (ev sahibi) olarak kullanıp, bir tipik altı adımlı litik çoğalma döngüsü (sağ) (ASM Org, 2016) ..... 17
Şekil 1.11: T4 fajının 3B yapısı. Temel bölümleri/bileşenleri: Kafa ("capsid"),kuyruk ("tail"), yaka ("collar"), bıyıklar ("whiskers") ve kuyruk fiberleri. İlgili kaynaktan uyarlanmıştır (Leiman ve ark., 2003; Yap ve Rossman, 2014) ..... 18
Şekil 1.12: Bazik ve asidik jelatin üretimleri. İlgili kaynaktan uyarlanmıştır (Tabata ve Ikada, 1998) ..... 21

Şekil 1.13: Adipoz dokudan izole edilen kök hücreler ile hücre tedavileri: (I) Rejeneratif tıp yaklaşımı; ve (II) doku mühendisliği yaklaşımı: Şeklin hazırlanmasında bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda elde edilen görüntüler kullanılmıştır. ..... 25
Şekil 2.1: Tez kapsamında uygulanan "Plaque Assay" yönteminin şematik tanımı. İlgili kaynaktan uyarlanmıştır (Plaque assay, 2018)..... 35
Şekil 2.2: Jelatin mikroküre lerin üretiminde kullanılan reaktör sistemi..... 36
Şekil 2.3: Deney hayvanı farelerden adipoz doku izolasyonu..... 41
Şekil 2.4: MKH + jelatin mikroküre biyohibrid kümelerinin oluşturulması.. ..... 45
Şekil 3.1: E. coli bakteri kolonilerini gösteren petri kabının örnek optik fotoğrafı..... 47
Şekil 3.2: LB sıvı besiyerinde E. coli kültürü - büyüme eğrisi..... 48
Şekil 3.3: T4 bakteriyofajı nanoemülsiyonlarında faj konsantrasyonunun bulunması için uygulanan "plaque assay" testinde elde edilen bakteriyofaj plaklarını gösteren petri kabının örnek optik fotoğrafı ..... 49
Şekil 3.4: Tipik E. coli yumuşak LB-agar overlay kültür testi sonuçlarına örnekler: Şeffaf bölgeler T4 fajı tarafından parçalanan bakteri bölgelerini göstermektedir: (A) Tekrar deneyinde aynı faj nanoemülsiyondan 3 farklı noktaya aynı miktarlarda faj ilave edilmiş; ve (B) beş farklı noktalya farklı miktarlarda faj nanoemülsiyonu damlatılmıştır ..... 50
Şekil 3.5: T4 bakteriyofajının E. coli üzerindeki etkisinin süspansiyonda izlenmesi. Her iki şişeye de başlangıçta 100 ml besiyeri + 100 µl bakteriyofaj ve soldaki 10 ml sağdakine ise 5 ml aynı konsantrasyonda bakteri konmuş ve 37ºC'de 7 saat inkübe edilmiştir ..... 50
Şekil 3.6: Tez kapsamında üretilen jelatin mikrokürelerin örnek görüntüleri ..... 51
Şekil 3.7: Kimyasal yöntemle - GA kullanılarak - farklı çapraz bağlanma derecelerinde bazik jelatinden hazırlanan mikrokürelerin HCl ile asidik hidrolizi/ degredasyonu: (A) Üç farklı çapraz bağlanma derecesine sahip (üç farklı GA/jelatin oranında GA kullanılarak çapraz bağlanmış) mikrokürelerin zamana karşı degredasyonları (kalan kütle yüzdeleri); ve (B) bu üç farklı mikrokürenin degredasyonunda 2 saat degredasyon süresi sonrasında kalan kütle yüzdeleri..... 53
Şekil 3.8: Kimyasal yöntemle - GA kullanılarak - farklı çapraz bağlanma derecelerinde bazik jelatinden hazırlanan mikrokürelerin kollajenaz ile enzimatik degredasyonu: (A) Üç farklı çapraz bağlanma derecesine sahip (üç farklı GA/jelatin oranında GA kullanılarak çapraz bağlanmış) mikrokürelerin zamana karşı degredasyonları (kalan

kütle yüzdeleri); ve (B) bu üç farklı mikrokürenin degredasyonunda 2 saat degredasyon süresi sonrasında kalan kütle yüzdeleri..... 55
Şekil 3.9: Kimyasal yöntemle - GA kullanılarak - farklı çapraz bağlanma derecelerinde bazik jelatinden hazırlanan bakteriyofaj yüklenmiş jelatin mikrokürelerde bakteriyofaj salımı: (A) Üç farklı çapraz bağlanma derecesine sahip (üç farklı GA/jelatin oranında GA kullanılarak çapraz bağlanmış) mikrokürlerden zamana karşı bakteriyofaj salımı; ve (B) bu üç farklı mikroküreden 6 saatlik sürede salınan bakteriyofaj yüzdeleri..... 56
Şekil 3.10: Kimyasal Üç farklı GA/jelatin oranında GA kullanılarak çapraz bağlanmış mikrokürlerden (JM1, JM2 ve JM3) zamana karşı bFGF salımı. Asidik jelatinden hazırlanan örnek mikrokürelerden (JM4) salınan bFGF yüzdeleri..... 57
Şekil 3.11: Farelerin abdominal bölgesinden alınan adipoz doku örnekleri..... 58
Şekil 3.12: Adipoz dokudan elde edilen MKH hücrelerin 2B kültürlerde gelişmesine/değişimine örnek görüntüler..... 59
Şekil 3.13: MKH ve jelatin mikroküre kümelerinin 7 günlük inkübasyonu süresince değişimini gösteren optik fotoğraf örnekleri: (A), (B) ve (C) MKH + jelatin mikroküre kümeleri - 24 saat, 2 gün ve 7 gün sonra ve (D) yalnızca MKHlerden oluşan kümelerin 7 gün sonra..... 61
Şekil 3.14: 2B tek tabakalı kültür ve 3B MKH kümelerinin (jelatin mikroküre olan veya olmayan) 7 günlük kültüründe - canlı hücre sayısında inkübasyonu süresince gözlenen değişimler..... 61
Şekil 3.15: 2B ve 3B kültürlerde 7 günlük inkübasyon süresince metabolik parametrelerin zamanla değişimi: (A) Glikoz kullanımı;(B) L-laktik asit üretimi; ve (C) L-laktik asit/glikoz oranı..... 63
Şekil 4.1: Diyabetik ayak ülserlerinin kombine tedavisinde kullanılmak üzere sunulan tezde kapsamında geliştirilmesi amaçlanan biyohibrid doku mühendisliği onarım malzemelerinin şematik tanımı..... 65

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

**PCR** : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**$LD_{50}$** : Lethal Doz 50

**MTD** : Maksimum Tolere edilen Doz

**ATCC** : American Type Culture Collection

**ASM Org** : American Society of Microbiology Organization

**αMEM** : Alpha minimum essential medium

**bFGF** : Temel fibroblast büyüme faktörü

**BMP, BMP 2-4** : Kemik büyüme faktörleri

**CFU** : Koloni oluşturma ünitesi

**2B** : İki boyutlu

**3B** : Üç boyutlu

**D** : Çap

**DB** : Diabetes mellitus

**DFI** : Diyabetik ayak enfeksiyonları

**DFO** : Diyabetik ayak osteomiyelit

**DNA** : Deoksiribonükleik asit

**DMEM** : Dulbecco's modified Eagle's medium

**DMF** : Dimethylformamide

**EDTA** : Etilendiamintetra asetikasit

***E. coli*** : *Escherichia coli*

**EU** : European Union

**FBS** : Fetal bovine serum

**FGF** : Fibroblast büyüme faktörü

**FITC** : Fluoresein 5-izosiyanat

**GA** : Glutaraldehit

**HGF** : Hepatosit büyüme faktörü

**IEP** : İzoelektrik nokta

**IGF** : İnsulin benzeri büyüme faktörü

**JM** : Jelatin mikroküreler

**LB** : Luria-Bertani

**Ltd** : Limited şirket

**M** : Molar

**$M_{kuru}$** : Kuru durumdaki ağırlık

**$M_{şişmiş}$** : Şişmiş durumdaki ağırlık

**MKH** : Mezenkimal kök hücre

**MRSA** : Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

**$N_k$** : Koloni sayısı

**$N_p$** : Plak sayısı

**OD** : Optik yoğunluk

**PBS** : Fosfat tampon çözeltisi

**PFU** : Plak oluşturma ünitesi

**PIGF** : Plasental büyüme faktörü

**RNA** : Ribonükleik asit

**PVA** : Polivinil alkol

**rpm** : Dakikada dönüş sayısı

**SAY** : Su alma yüzdesi

**SEM** : Taramalı elektron mikroskobu

**SF** : Seyreltme faktörü

***S. aureus*** : *Staphylococcus aureus*

**TGF-β** : Transforming büyüme faktörü

**UV** : Ultraviyole

**V** : Hacim

**VEGF** : Endotel büyüme faktörü

**WHO** : Dünya Sağlık Teşkilatı

**T4, 2-7** : *E. coli* türleri

# ÖZET

Moghtader, F. (2021). Jelatin mikroküreleree bakteriyofaj, bFGF ve mezenkimal kök hücre yükleme etkinliğinin araştırılması. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücreler ve Doku Mühendisliği ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Sunulan tezin temel amacı şiddetli enfeksiyon ve yumuşak ve sert doku kayıplarıyla seyreden "diyabetik ayak ülserleri" gibi patolojik durumlarda doku mühendisliği yaklaşımı ile kombine tedavisi için biyohibrid onarım malzemelerinin geliştirilmesidir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda - bu kombine tedavide bakteriyofajların antibakteriyal ajanlar olarak enfeksiyonun giderilmesi ve mezenkimal kök hücre (MKH) kümelerinin ise doku kayıplarının giderilmesi - doğru ve hızlı doku rejenerasyonu sağlaması amacıyla kullanılması öngörülmüştür. Ayrıca doku rejenerasyonuna katkı sağlamak üzere MKH kümeleri taşıyan jelatin mikrokürelere "temel fibroblast büyüme faktörü'nün" (bFGF) yüklenmesi ve salımı incelenmiştir. Tezde örnek bakteri olarak *Escherichia coli* (*E. coli*)'nin patojen olmayan bir suşu seçilmiş, satın alınmış ve istenilen miktarlarda çoğaltılması sağlanmıştır. Bu suşu özgün olarak tanıyan, enfekte eden T4 fajı yine satın alınma yoluyla temin edilmiş, yeteri kadar çoğaltılmış/ saflaştırılmış ve *E. coli* kültürlerinde etkinliği belirlenmiştir. Taşıyıcı olarak çapraz bağlı jelatin hidrojel mikrokürelerin kullanılması öngörülmüştür. Jelatin mikrokürelerin hazırlanmasında hem bazik hem de asidik jelatin kullanılmıştır. Jelatin mikroküreler glutaraldehit (GA) kulllanılarak kimyasal olarak çapraz bağlanmıştır. Birim jelatin kütlesi için kullanılan GA miktarı (GA/jelatin oranı, mg/mg) değiştirilerek farklı çapraz bağ yoğunluğunda mikroküreler elde edilmiştir. Bu farklı özelliklerdeki mikrokürelerin HCl için de hızlandırılmış asidik hidrolizi ve kollajenaz kullanılarak enzimatik degredasyonu incelenmiş/belirlenmiştir. Bu farklı çapraz bağ yoğunluğundaki jelatin mikrokürelere bakteriyofaj ve bFGF yüklenmesi ve salımı incelenmiştir. Son grup çalışmalarda, farelerin karın bölgesinden alınan adipoz dokudan MKHler izole edilmiş ve 2B hücre kültüründe yeteri kadar çoğaltılmıştır. Bu MHKlerin jelatin mikrokürelerle kümeleştirlerek 3B formda doku mühendisliği biyohibrid materyalleri oluşturulmuş ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere karakterize edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Jelatin mikroküreler, Bakteriyofajlar, Temel fibroblast büyüme faktörü, Mezenkimal kök hücreler

## ABSTRACT

Moghtader, F. (2021). Investigation of loading efficiencies of bacteriophages, bFGF and mesenchymal stem cells onto jelatin microspheres. Istinye University, Institute of Health Science, Stem Cells and Tissue Engineering Division. Master Thesis. Istanbul.

The main aim of this thesis is to develop biohybrid reconstruction materials for combined therapies of infected wounds by tissue engineering approaches - which also includes pathologies having both soft and hard tissue losses, such as diabetic foot ulcers. In the context of the thesis, in this combined therapy - the use of bacteriophages as antibacterial agents for the treatment of infections and mesenchymal stem cell (MSC) aggregates for fast and correct tissue regeneration were proposed. In addition, loading and release of "Basic Fibroblast Growth Factor"- bFGF into/from the gelatin microspheres were also studied/included in the formulations. In the thesis, a non-pathogenic strain of *Escherichia coli* (*E. coli*) was selected, purchased and propagated in desired amounts. A T4 bacteriophage which is specifically infects this strain was purchased and propagated large enough amounts/purified and activities were studied in the *E. coli* cultures. Gelatin hydrogel microspheres were aimed to be used as the carrier. Both basic and acidic gelatin were used to prepare the gelatin microspheres. Gelatin microspheres were chemically crosslinked by using glutaraldyde (GA). Gelatin microspheres with different crosslinking densities were obtained by using different amounts of GA for the unit mass of gelatin. Acidic hydrolysis and enzymatic degradation of these gelatin microspehers were studied/described by using HCl and collagenase, respectively. Loading and release of bacteriophages and bFGF into/from these gelatin microspheres with different crosslinking densities were investigated. In the last groups of studies, MSCs were isolated from the adipose tissues taken from rats and were 2D cultured to reach enough quantities. These MSCs were aggregated onto the gelatin microspheres to obtain 3D forms as tissue engineering biohybrids and characterized for further studies.



Key Words: Gelatin microspheres, Bacteriophages, Basic fibroblast growth factor, Mesencyhimal stem cells

# GİRİŞ

Sunulan tezin ve bununla ilgili son dönem çalışmalarımızın/projelerimizin temel amacı/hedefi enfekte yaraların - özel olarak "Diyabetik Ayak Enfeksiyonları" ("Diabetic Foot Infections" - DFI") ve bununla ilgili önemli doku kaybı ile birlikte yürüyen, iyileşmesi oldukça zor ülserlerin tedavisi için, bu konuda literatürde ilk kez uygulanacak bir kombine tedavi protokolunun ve bunu sağlayacak biyoaktif hibrid biyomateryallerin - doku mühendisliği ürünlerinin geliştirilmesidir.

Sunulan tez ve ilgili ve devam eden projemizde hedef olarak yalnızca DFI tedavisi seçilmiştir. Ancak bu kombine tedavi yaklaşımının hemen hemen tüm yumuşak ve sert doku kayıplarında - özellikle enfekte yara/doku kaybının tedavisinde kullanılabilecek universal/yenilikçi bir tedavi metodolojisi olacağı önemle not edilmelidir. Tez içeriğinin tanımlanması, kullanılan malzemelerin seçim ve uygulama şekilleri aşağıda kısaca açıklanmıştır. Bunlar ile ilgili daha geniş bilgi ise Bölüm 2'de sunulmuştur.

"Diabetes mellitus" (DM) - kısa adıyla diyabet, kronik bir metabolik hastalıktır - ölümle sonuçlanabilecek akut hiperglisemik durum ve uzun dönemde ortaya çıkan kalp ve damar hastalıkları, felç, kronik böbrek yetmezliği/kaybı, görme kaybı/körlük ve bu konudaki çalışmalarımızın temel konusu olan "DFI" gibi çok önemli komplikasyonları söz konusudur. Deri ve altındaki yumuşak ve ilerleyen durumlarda sert dokuda (kemikte) oluşan enfeksiyonlar diyabetik hastalarda en önemli/ciddi komplikasyonların başında gelir. Diyabetik hastalarda diyabetik ayak ülserleri çoğu kez kaçınılmazdır. Enfeksiyonlu bölgenin cerrahi olarak temizlenmesi gerekebilir, hatta çok olumsuz durumlarda hastanın kaybını (ölümü) önlemek için ayağın tamamının kesilmesi söz konusu olabilir – hastalığın seyri ölümle sonuçlanabilir.

Günümüzde tüm bakteriyal enfeksiyonlarda olduğu gibi diyabetik ayak ülserlerinin tedavisinde klinik olarak uygulanan birincil yaklaşım antibiyotik tedavisidir. Çok sayıda antibiyotik denenmiş/kullanılmıştır - başarılı olmak için hastaya özgün antibiyotiklerin/karışımlarının seçimi ve uygulama rejiminin belirlenmesi kritik öneme sahiptir. Ancak patojenik bakterilerin zaman içinde antibiyotiklere direnç geliştirme yetenekleri vardır - geliştirmişlerdir - antibiyotik dirençli olanların sayıları hızla artmaktadır - DFI'da da sıkça gözlenen "Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus"* -

MRSA) tipik bir örnektir. Bakteriyal enfeksiyonların giderilmesinde bakteriyofajların kullanılması önemli bir alternatiftir. Sunulan tezde incelenen/araştırılan temel yaklaşımda aktif ajan bakteriyofajları diyabetik ayak ülserlerinin (hem yumuşak hem de sert dokuda) tedavisinde/enfeksiyonların giderilmesinde - antibiyotiklerin yerine veya onlarla birlikte antibakteriyal ajanlar olarak kullanılmasıdır.

2. Bölüm'de ayrıntılı olarak tanıtılan bakteriyofajların keşfi yüz yıl önceye dayanır - ancak antibiyotiklerin bulunması ve çok aktif/başarılı türlerin yüksek kapasitelerde üretimi ve uygulanması bakteriyofaj gereksinimini/onlara ilgiyi nerdeyse ortadan kaldırmıştır - uzun yıllar unutulmuşlardır. Ancak önceki paragrafta da söz edildiği gibi antibiyotik direnci ve hızla artması/yayılması bakteriyofajları yeniden gündeme getirmiş - antibiyotiklere alternatif ve/veya onlara destek verecek - çok seçici ve güçlü antibakteriyal ajanlar olarak yeniden değerlendirilmelerine ve DFI'dahil bir çok enfekte yaraların/dokuların iyileştirilmesinde uygulamaların başlamasına yol açmıştır. Tüm bu yaklaşımlarda bakteryojaflar ile patojen bakterilerin yok edilmesi temel amaçtır. Bir kez daha ifade etmek gerekirse sunulan tez ve bununla ilgili projemizde ise yalnızca enfeksiyonların giderilmesi değil - yaralı dokunun düzgün/hızlı iyileşmesini sağlıyacak bakteriyofajlar ile birlikte, bFGF ve MHK kümelerinin kullanımı - bir kombine tedavi uygulaması söz konusudur - özgün ve yenilikçidir.

Sunulan tez kapsamında birinci bölümde enfeksiyonların giderilmesinde kullanılacak - bakteriyofajları taşıyan ve kontrollü salan jelatin mikrokülerin üretilmesi amaçlanmıştır. Tez kapsamında bir model bakteri olarak, özellikle - laboratuvarlarda kullanıcı ve çevre yönünden emniyetli çalışılmasını sağlamak amacıyla - patojenik riski olmayan bir *Escherichia coli (E. coli)* suşu ve bununla özgün olarak etkileşen T4 bakteriyofajı seçilmiş ve kullanılmıştır. Jelatin hidrojel mikrokürelere hedef bakteri *E. Coli'e* özgün T4 bakteriyofajı yüklenmiş ve *in vitro* salımı araştırılmıştır. Tez ile ilgili projenin - tezin kapsamında olmayan *ilerki dönemlerinde* DFI'lı hayvan modellerinde kullanılmak üzere hedef bakteri olarak DFI'da sıkça görülen ve tedavisi zor/önemli sorunlar yaratan *Staphylococcus aureus ve* özgün fajının kullanılmasının öngörüldüğü not edilmelidir.

Yukarıda da söz edildiği gibi, DFI enfeksiyonları/ülserleri iyileşmesi zor yaralardır. Enfeksiyon giderilse dahi önemli doku kaybı ve yara izi ("skar") oluşumu ile seyreder/sonuçlanır. Bunun nedenlerinin başında diyabetik hastalarda genel olarak

mikrovaskülarizasyonun önemli oranda düşmesi gösterilmektedir. Sunulan tez kapsamında yaralı bölgede "anjiyogenez" sağlanması, başka bir ifadeyle mikrovaskülarizasyonun artırılması ve böylece doku iyileşmesinin hızlandırılması amacıyla, jelatin mikrokürelere - ilgili literatürde de bu amaçla oldukça yaygın kullanılan - bFGF yüklenmesi/kontrollu salımı incelenmiştir.

DFI enfeksiyonları/ülserleri durumunda doku iyileşmesinin gerçekleşmesi/ hızlandırılması ve düzgün doku oluşumunun sağlanması için sunulan tezde ve bununla ilgili projemizde MKHlerin ve özellikle bunların 3B kümelerinin bir doku mühendisliği yaklaşımı olarak kullanılması öngörülmüştür. 2. Bölümde tanıtıldığı gibi günümüzde doku rejenerasyonunda primer kök hücreler izole edilip gerektiğinde sayıları istenilen düzeye çıkartılacak şekilde kültür edildikten sonra ve/veya yine *in vitro* koşullarda ön farklılaşma ile istenilen/hedef doku hücrelerine dönüştürüldükten sonra kullanılmaktadır. Rejeneratif tıp yaklaşımında hücrelerin doğrudan kullanımı söz konusudur - doku mühendisliğinde ise bu hücreler biyobozunur doku iskeleleri ile birlikte biyohibridler olarak değerlendirilmektir. Son yıllarda - 2B kültür ve uygulamalara alternatif olarak - hücreler, birçok farklı teknikle 3B kümeler haline ("sferoidler") getirildikten sonra uygulama yapılmaktadır. Bu yaklaşımın daha başlangıçta yoğun hücre-hücre kontakları nedeniyle çok daha başarılı olabileceği gösterilmiştir. Sunulan tez kapsamında yine 3B oluşumlar ve uygulamalar söz konusudur. Sonraki bölümlerde ayrıntılı olarak tanıtıldığı gibi, adipoz dokudan izole edilen MKHler 2B kültürde yeteri kadar çoğaltıldıktan sonra taşıyıcı matriks (jelatin mikroküreler) ile çok basit bir yöntemle kümeleştirildikten sonra 3B kültür ile geliştirilmekte ve biyobibrid doku mühendisliği onarım malzemeleri hazırlanmaktadır.

Kyoto Üniversitesi (Kyoto, Japonya), öğretim üyesi Prof. Y. Tabata'nın ve araştırma grubu jelatin mikrokürelerin hazırlanması; çeşitli biyoaktif ajanların (başta büyüme faktörleri olmak üzere) yüklenmesi ve kontrollü salımı; ve çeşitli hücrelerin (özellikle kök hücreler) jelatin mikroküreler ile kümeleştirerek biyohibrid materyallerin hazırlanması ve çok farklı tedavi modalitelerinde kullanılmaları konusunda çok sayıda başarılı çalışma yapmış ve makaleler yayınlamışlardır - bu konuda, Dünya da öncü durumundadırlar ve önemli bilgi birikimi ve deneyimine sahiptirler. Sunulan tez kapsamındaki çalışmalar da Prof. Y. Tabata'nın Kyoto Üniversitesindeki laboratuvarlarında (Kyoto, Japonya) başlatılmış daha sonra şirketimiz Nanobiyomedtek

’in Ar-Ge laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Sunulan tez de hem tez içeriği ve hedefleri oluşturulurken hem de çalışmalar gerçekleştirilirken Prof. Tabata’nın ve grubunun önemli deneyiminden yararlanılmış/destek alınmıştır. Jelatin 2.Bölümde tanıtıldığı gibi bir doğal polimer olan kollajenin denatüre formudur - ticari olarak medikal saflıkta satın almak mümkündür - çok farklı yöntemlerle şekillendiril-dikten ve genellikle çapraz bağlı hidrojel haline getirildikten sonra kullanılır. Bilinen en biyouyumlu ve biyobozunur malzemelerin başında yer alır. Doku mühendisliğinde çok yaygın olarak kullanılır, kontrollü aktif ajan (ilaç, büyüme faktörü, vb.) salan taşıyıcıların üretilmesi içinde hemen hemen ideal özelliklere sahiptir.

Sunulan tez kapsamında önce jelatin mikroküreler oluşturulmuş ve daha sonra kimyasal çapraz bağlama ajanı olarak glutareldehit (GA) kullanarak farklı derecelerde (yoğunluklarda) çapraz bağlanmış, suda çözünmeyen ancak şişen hidrojel mikroküreler üretilmiştir. Hem bakteriyofaj hem de bFGF yüklenmesi ve salımı incelenmiştir. Farelerin adipoz dokusundan MKHler izole edilmiş, 2B kültürlerde çoğaltılmış, bu MKHler jelatin mikroküreler ile kümeleştirilerek 3B biyohibridler hazırlanmıştır. Tabata grubunun önceki çok sayıda başarılı çalışmasından farklı olarak ilk kez tarafımca yapılan çalışmalarda - jelatin hidrojel mikrokürelere 3B MHK/jelatin biyohibrid formülasyonlarına antibakteriyal ajan bakteriyofaj yüklenmesi/salınması ile ilgili araştırmalar gerçekleştirilmiştir.

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Diyabet

"Diabetes mellitus" (DM) - kısa adıyla diyabet kronik bir metabolik hastalıktır - temel göstergesi uzun süreli yüksek kan şeker seviyesidir. Kandaki glükozun hücreler tarafından alınmasını düzenleyen temel hormon "insülin" dir. Pankreasın yeterli miktarda insülin üretememesi veya hücrelerin insüline istenilen cevabı verememesi (reseptörlerin insülin uyarısına duyarlılığını azalması/yok olması) diyabetin ortaya çıkmasına neden olur (Boultan, 2006; Blair, 2016; Kahn ve ark., 2018; https://en. wikipedia.org/wiki/Diabetes_mellitus). Ölümle sonuçlanabilecek akut hiperglisemik durum ve uzun dönemde ortaya çıkan kalp ve damar hastalıkları, felç, kronik böbrek yetmezliği/kaybı, görme kaybı/körlük ve - bu konudaki çalışmalarımızın temel konusu olan - "Diyabetik Ayak Enfeksiyonları" gibi çok önemli komplikasyonları söz konusudur (Boultan, 1996; Ryden ve ark., 2007; Sarwar ve ark., 2010; Bourne ve ark., 2013; Collins ve ark., 2018). Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) 2017 raporunda yer alan rakkamlar DM'nin tüm dünyada en önemli sağlık sorunlarından biri olduğunu çarpıcı bir şekilde göstermektedir (www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index 1.html). Tüm dünyada diyabetik hasta sayısınında çok hızlı bir artış söz konusudur - yapılan tahminlerde DM hastalarının sayısının 2030 da 400 milyona yaklaşacağını - ölüm nedenleri sıralamasında yedinci sırada olacağı ifade edilmektedir (Wild ve ark., 2004; Mathers ve Loncar, 2006; Zimmet ve ark., 2016) - yalnızca 2015'de yüksek glükoz seviyesi nedeniyle ölenlerin sayısı 5 milyon civarına ulaşması dahi diyabetin olumsuz önemini açık olarak ifade etmektedir.

Deri ve altındaki dokuda oluşan enfeksiyonlar, "diyabetik ayak enfeksiyonları" - "DFI" diyabetik hastalarda en önemli/ciddi komplikasyonların başında gelir - WHO tarafında şöyle tanımlanmıştır: "Diyabetik hastaların ayaklarında basit enfeksiyonla başlayan, kronik ülserleşme ve/veya dokuların derin bir şekilde bozulması şeklinde seyreden nörolojik bozukluklar, peripheral dolaşım kayıpları ve metabolik komplikasyonlar ile birlikte bacakların alt bölümünde gelişen bir patolojik durumdur" (Boultan ve ark., 2005; Boultan, 2006; Bader, 2008; Chammas ve ark., 2016; Piaggesi ve Apelqvist, 2018; www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en */index1.html*). Pryce 1887'de diyabete bağlı her iki ayakta gelişen kronik ülserleri tanımlamıştır **(**Pryce,

1887). 1996'da "International Working Group on the Diabetic Foot" kurulmuş - bu ve benzeri uluslararası ağ platformlarında daha organize tedavi yaklaşımları değerlendirilmeye başlanmıştır (Boultan, 1996; www.diabetesatlas.org/ across-the-globe.html). Deride - yumuşak dokuda ortaya çıkan diyabetik ayak enfeksiyonlarının %60'ında hatta daha fazlasında, enfeksiyonlar o bölgedeki kemik ve kıkırdak dokusuna da yayılabilir ve kronik ülser tedavisi çok daha zor hale gelir - sert doku ülserleri "diyabetik ayak osteomyelitis" (DFO) olarak tanımlanır (Game, 2010; Lipsky ve ark. 2012; Lipsky ve ark. 2016).

Diyabetik hastalarda ülser oluşumu önlemek için hastaları hatta doktorları ve diğer ilgili personeli eğitmek, erken tanı koymak ve tedaviye hızla başlamak çok önemli önlemlerdir - bu yönde yoğun ilgi/bilinçlenme vardır (Singh ve ark., 2005; Lipsky ve ark., 2012; Dorresteijn ve ark., 2014; Lipsky ve ark. 2016). Ancak, diyabetik ayak ülserleri çoğu kez kaçınılmazdır. Enfeksiyonlu bölgenin cerrahi olarak temizlenmesi gerekebilir, hatta çok olumsuz durumlarda hastanın kaybını (ölümü) önlemek için ayağın tamamının kesilmesi söz konusu olabilir. Erken tanı ve tedavilerde tüm çaba bu çok olumsuz tablonun oluşumunu engellemektir.

Günümüzde tüm bakteriyal enfeksiyonlarda olduğu gibi diyabetik ayak ülserlerinin tedavisinde klinik olarak uygulanan birincil yaklaşım antibiyotik tedavisidir (Powlson ve Coll, 2010; Ekim ve Ekim, 2016; Lipsky ve ark., 2016; Senneville, 2018). Çok sayıda alternatif antibiyotik kullanılmıştır - örneğin: Clindamycin, Levofloxacin, Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Linezolid, Metronidazole, Cephalosporin, Amikacin, ve Tobramycin - bazıları kullanımdan kaldırılmış yenileri piyasaya sürülmüştür. Diyabet son derece karmaşık, hastadan hastaya değişen faklı semptomları olabilen, farklı seviyelerde seyreden bir kronik metabolik hastalıktır - buna bağlı gelişen diyabetik ayak ülserlerinin de özelliği/derecesi hastadan hastaya değişir - yalnızca enfekte yara bölgesinde oluşan bir sorun olarak görmek çok yanlış olur - tüm sistemi, hastanının tüm fonksiyonlarını - genel durumunu değerlendirmek gerekir. Başarılı olabilmesi için gereken hastanın durumu, enfekte yaralarda bakteriyal kontaminasyon türü ve boyutları ve antibiyotik tedavi yaklaşımı (türü, dozu, kombine kullanılması, uygulama şekli: oral, intravenöz, topical, vb.) çok dikkatle seçilmeli uygulanmalıdır. Birçok uluslararası ve ulusal kılavuz ("guidelines") oluşturulmuş/yayınlanmıştır - çok dikkatli izlenmeleri ve önerilere göre hareket edilmesi gerekmektir (Ergör ve Öztek, 2000; Liu ve ark., 2011;

Tatar, 2013; Lipsky ve ark., 2016; Selva Olid ve ark., 2015; Senneville, 2018). Antibiyotikler uzun yıllar birçok enfeksiyonun giderilmesinde/tedavisinde başarılı/ yaygın olarak kullanılmışlardır - "yaygın" sözcüğünün - aslında bunun yanına birde "bilinçsiz" sözcüğü ilave edilince - antibiyotik kullanımında son derece "negatif" bir anlam taşıyabileceği önemle vurgulanmalıdır. Bakteriler akıllıdır - hepimizin tanık olduğu gibi zaman içinde antibiyotiklere direnç geliştirme yetenekleri vardır - geliştirmişlerdir - antibiyotik dirençli olanların sayıları hızla artmaktadır (Chhipper ve ark., *2013;* Xavier ve ark., 2014; Lipsky ve ark., 2016; Chhipper ve ark., 2018; Senneville, 2018*)*. DFI'da en sık raslanan bakteriler başta *Staphylococcus aureus grubu olmak üzere Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa ve Enterobacteriaceae* diğer türleri ve suşlarıdır - bunların antibiyotik dirençli suşları diyabetik ayakta da sıkça görülür ve tedavileri oldukça zordur (örneğin MRSA).

Bakteriyal enfeksiyonların giderilmesinde bakteriyofajların kullanılması önemli bir alternatif olarak değerlendirilmektedir. Sunulan tez de incelenen/araştırılan temel yaklaşımda bakteriyofajlardır antibakteriyal aktif ajanlar olarak kullanılmıştır. Aşağıda ayrı bölüm olarak tanıtılan bakteriyofajların keşfi yüz yıl önceye dayanır (Twort ve Lond, 1915; D'Herelle, 1917) - ancak antibiyotiklerin bulunması ve özellikle etkin türevlerinin geliştirilmesi ve yüksek teknolojiler ile yüksek kapasitelerde ticari olarak üretilmeleri bakteriyofaj gereksinimini/onlara ilgiyi nerdeyse ortadan kaldırmıştır - uzun yıllar unutulmuşlardır. Ancak önceki paragrafta da söz edildiği gibi antibiyotik direnci ve hızla artması/yayılması bakteriyofajları yeniden gündeme getirmiş - antibiyotiklere alternatif ve/veya onlara destek verecek - çok seçici ve güçlü antibakteriyal ajanlar olarak yeniden değerlendirilmelerine yol açmıştır (Adams, 1959; Smith ve Huggins, 1982; Radetsky, 1996; Barrow ve Soothhill, 1997; Pirisi, 2000; Summers, 2001; Kutter ve Sulakvelidze, 2005; Hausler, 2006; Hanlon ve ark., 2007; Chanishvili, 2012; Keen, 2012; Chan ve ark., 2013; Chhipper ve ark., *2013;* Abedon ve ark., 2014; Borysowski ve ark., 2014; Readon, 2014; Chanishvili, 2016; Gortsky ve ark., 2016; Lipsky ve ark., 2016; Abedon ve ark., 2017; Lin ve ark., 2017; Azerado ve Sillakorva, 2018; Chhipper ve ark., 2018; Furfaro ve ark., 2018; Senneville, 2018). Diyabetik ayak enfeksiyonları da dahil olmak üzere özellikle antibiyotik dirençli enfekte yaraların iyileştirilmesinde hayvan modellerinden başlıyan çalışmalar örnekleri az da olsa klinik uygulamalara ulaşmıştır (Rhoads ve ark., 2009; Vandenheuvel ve ark., 2015; Fish *ve ark.,* 2016;

Gorski ve ark., 2016; Abedon *ve ark.,* 2017; Fish ve ark., 2018; Azerado ve Sillankorva, 2018; Morozova ve ark., 2018).

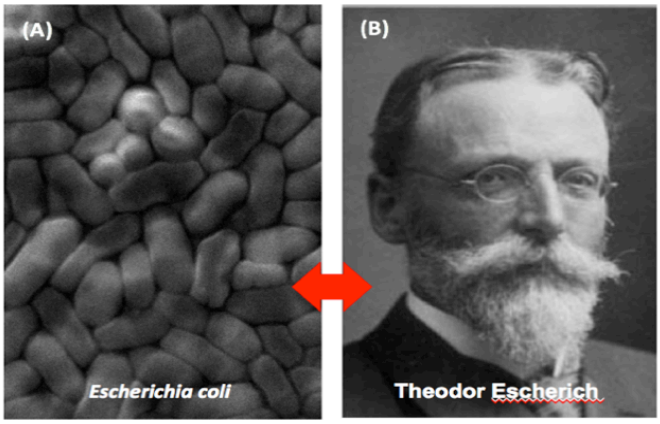
Diyabetik ayak enfeksiyonlarında olduğu gibi enfekte yara bölgelerinin tedavi sırasında yara örtü materyalleri ile örtülmesi önemli önlemler arasındadır. Örtü materyalinin biyobozunur olması tercih nedenlerinden biridir - yaraya yapışmama, kaldırılmasında yeniden yara oluşumu, vb. gibi önemli avantaj sağlar. Genel olarak biyobozunur biyomateryallerin hazırlanmasında birçok doğal (kollojen, jelatin, fibrin, polisakkaritler, vb.) ve sentetik (PLLA, PGA, PCL, vb.) biyobozunur polimer kullanılmıştır (Hutmacher, 2000; Middleton ve Tipton, 2000; Lee ve ark., 2001; Lee ve Mooney, 2001; Yang ve ark., 2001; Gunatillake ve Adhikari, 2003; Atala, 2004; Sung ve ark., 2004; Hollister, 2005; Lutolf ve Hubbell, 2005; Boccaccini ve Gough, 2007; Nair ve Laurencin, 2007; Lee ve ark., 2008; Gloria ve ark., 2010; Berthiaume ve ark., 2011; Park ve ark., 2011; Piskin, 2012; Chua ve Yeong, 2015; Pina ve ark., 2015; Asghari ve ark., 2016; Yanagawa ve ark., 2016; Perala and Hilborn, 2017; Roseti ve ark., 2017). Sunulan tez ile ilgili çalışmalarımızda olduğu gibi "elektroeğirme" ile üretilen biyobozunur filmler benzer uygulamalarda olduğu gibi önemli yara örtücüler olarak kullanılmaktadır (Piskin ve ark., 2007; Yoshimoto ve ark., 2003; Pham ve ark., 2006; Ahmed ve ark., 2015; Jiang ve ark., 2015; Dhand ve ark., 2016; Rediguieri ve ark., 2016; Rezvani ve ark., 2016; Cheng ve ark., 2017; Patil ve ark., 2017).

"İnsan deri ekivalentleri" yara ve yanık tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen yara örtü malzemeleri olarak tanımlanabilir. Ticari üretime ulaşma başarısı göstermiş - doğal ve sentetik materyaller ve hücre/dokulardan/graftlardan oluşan örnekleri (Apligraf®, AlloDerm™, BioTemporizing Matrix, "BTM", DermaGraft®, Hyalomatrix®, MatriDerm®, StrataGraft®, vb.) en başarılı olanlar arasındadır. Bu konuda çok geniş bir literatür bulunmaktadır. Boyce ve Lalley in 2018 tarihli derlemelerinde konuyu oldukça başarılı bir şekilde tanıtmış ve gelecek kuşak olası modelleri/yaklaşımları tartışmışlardır (Boyce ve Lalley, 2018). Yara örtü materyalleri ve ticari örnekleriyle "insan deri ekivalentleri" nin - DFI ve DFO'da - yukarıda tanımlanan antibakteriyal ajanlar (antibiyotikler ve bakteriyofajlar) ile birlikte kullanılması önemli yaklaşımlar arasındadır.

## 1.2. Bakteriler ve Bakteriyofajlar

### 1.2.1. Hedef Bakteri

Tez kapsamında kullanılan hedef bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*), enterobakter ailesinin önemli bir üyesi - gram-negatif/anaerobik/çubuk şeklinde (2-3 µm uzunluğunda ve 0.5-1 µm çapında) - spor oluşturmayan bir bakteridir - çok sayıda alt grup üyesi (türü/suşu) vardır (Şekil 1.1A) (Kaper ve ark., 2004; Croxen ve ark., 2013; Kotloff ve ark., 2013; Gomez ve ark., 2016; *E. coli*-facts sheet, 2016). Bir Alman-Avusturya asıllı çocuk doktoru/bakteriyolog Theodor Escherich tarafından 1885'de tanımlanmıştır (Şekil 1.1B). Avusturya'da bir akademisyen olarak çalıştığı üniversite kliniğinde çocukların bağırsak florasından *E. coli* izole etmiş/tanımlamış daha sonra onun onuruna bu grup bakteriye *Escherichia coli* adı verilmiştir (Escherich, 1988; Shulman ve ark., 2007; Joan ve Slonczewski, 2017).




**Şekil 1.1: (A) Escherichia coli nin bir örnek SEM fotoğrafı; ve (B) E. coli'yi izole eden/tanımlayan Theodor Escherich (Shulman ve ark., 2007)**

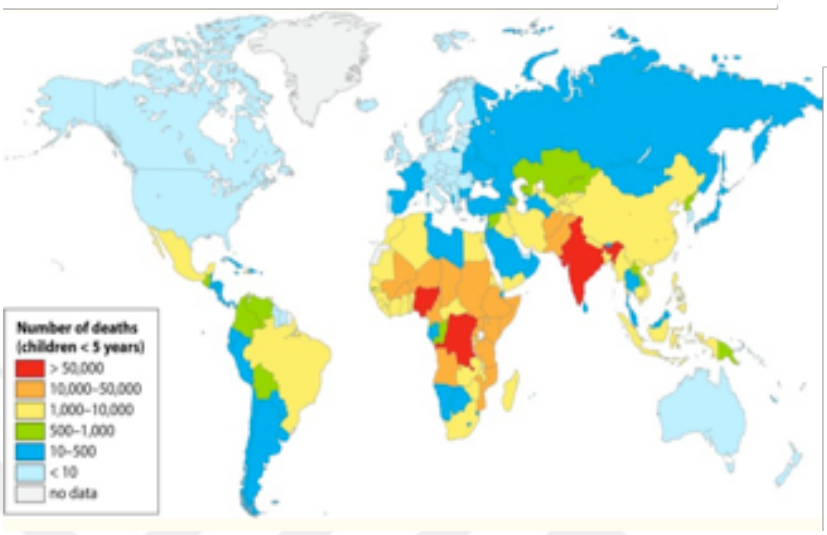
*E. coli* ailesinin üyeleri genellikle sıcak kanlı organizmaların - işşnsan hayvan barsağının alt bölümlerinin florasında bulunur ve dolayısıyla dışkılarında çok sık raslanır. Yüzlerce türü vardır, bazı türleri insan bağırsak florasının önemli bir sakini (ikamet edeni) olup besinlerin ve atıkların parçalanmasında/absorspsiyonunda yardımcı rol alırlar - vitamin K gibi önemli biyokimyasalların sentezine katkıda bulunurlar. *E. coli* rekombinant DNA teknolojisinde çok önemli ve yaygın kullanıma sahiptir. Genetik modifikasyon ile DNA sı değiştirilmiş ("rekombine edilmiş") *E. coli* bir çok kıymetli biyokimyasal bileşiğin teknolojik boyutta üretiminde temel rol alır. Beklendiği gibi 37°C'de vücut sıcaklığında ürer ve yaşar, dolayısıyla suyun kaynatılması ile uzaklaştırılabilir, klasik strelizasyonla - örneğin buhar sterilizasyonu ile kolaylıkla yok

edilebilir. Ancak bazı türleri "Shiga-benzeri toksinler" üretirler, son derece tehlikeli patojenlerdir - bunlar günlük tükettiğimiz süt ve süt ürünleri (yoğurt, peynir, vb.), et ürünleri - hem ham/pişmemiş hem de iyi pişmemiş son ürünler (hamburgerler, sosisler, vb.), iyi yıkanmamış sebzeler (salatalar, marul, ıspanak, vb.) ve en önemlisi içme suyundan kolaylıkla bulaşabilirler - özellikle çocukları ve yaşlıları etkilerler - ölümcül olabilirler (Mckeinzie ve ark., 1994; Gomez ve ark., 2016). *E. coli* O157:H7 bu tür bir patojendir özellikle Kuzey Amerika'da salgınlara ("outbreaks") neden olmuştur - buna karşın *E. coli* O104:H4 yine benzer toksin üreten bir tür olup Avrupa'da salgınlara yol açmıştır - örneğin 2011'deki salgın (Buchholtz ve ark., 2011) önemli bir örnektir. Bu tür *E. coli* kontaminasyonu/enfeksiyonu, ateş, barsak krampları, kusma, ishal hatta kanlı ishal şeklinde kendini gösterir (WHO, 2017). Genellikle 10 gün içinde iyileşme görülür ancak bazı durumlarda enfeksiyon vücuda yayılıp örneğin böbreklere ulaşıp ölümcül böbrek yetmezliğine yol açabilir. "Haemolytic uremic syndrome" (HUS) olarak tanımlanan bu durum bu bakteriler ile enfekte olan hastaların %10 unda ortaya çıkar – bu önemli bir yüzdedir - özellikle çocuk ve yaşlılarda nörolojik bozukluklara, inme ve koma haline yol açabilir (Qadri ve ark., 2005). Bazılarının, özellikle hastahanelerdeki *E. coli* türlerinin önemli antibiyotik direnci geliştirdikleri ve dolayısıyla tablonun çok daha ciddi bir hal aldığı önemle not edilmelidir (Blair ve ark., 2015; Khalil ve ark., 2016).

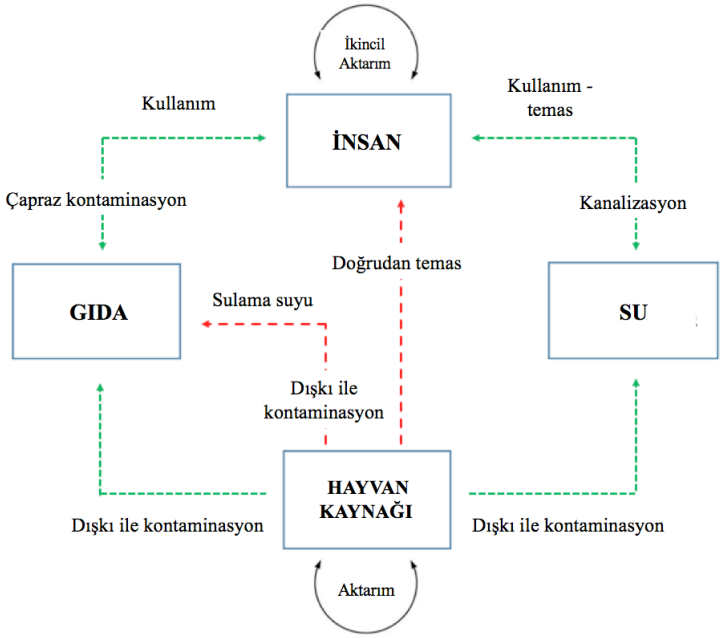
Tüm dünyada bakteriyal kontaminasyon sonucu yılda milyonlarca insanda gastrointestinal enfeksiyon gözlenmektedir (WHO, 2012). Şekil 1.2'de görüldüğü gibi *E. coli* 'nin neden olduğu hastalıklar özellikle Güney Asyada (başta Hindistan) ve Afrika da çok daha ciddi boyutlardadır ve ölümcüldür. "Centers for Diseases Control and Prevention" (CDC) Raporuna göre yalnızca ABD'de patojenik *E. coli* nin neden olduğu vaka sayısı yılda 300.000 civarındadır - bunun yaklaşık %36'sı *E. coli* O157 vakasıdır (CDC - 2019). Gelişmiş bir ülke olan ABD'de - bu rakkamlar ürkütücüdür - gelişmekte olan veya az gelişmiş ülkelerde - sayısal veriler yeteri kadar olmasada durumun ciddiyeti kolaylıkla tahmin edilebilir.

Şekil 1.3'de insana pathojenik *E. coli* bulaşma yolları şematik olarak gösterilmiştir - bulaşma çok farklı kaynaklardan farklı şekillerde olabilir ancak yiyecek ve içilen/kullanılan su öncelikle çok dikkatle izlenmesi gereken kontaminasyon kaynaklarıdır. Genellikle dışkı ile kontamine olmuş yiyecek ve su kullanımı önde gelen kontaminasyon kaynaklarının başında gelir (Croxen ve ark., 2013). İnsan ve hayvanın doğrudan teması çapraz kontaminasyona yol açmaktadır. İnekler, insanlara patojenik *E.*

*coli* taşımada birinci sıradadır. Koyun, keçi, domuz, at, geyik, tavşan ve kuşlar da potensiyal taşıyıcılar arasındadır.



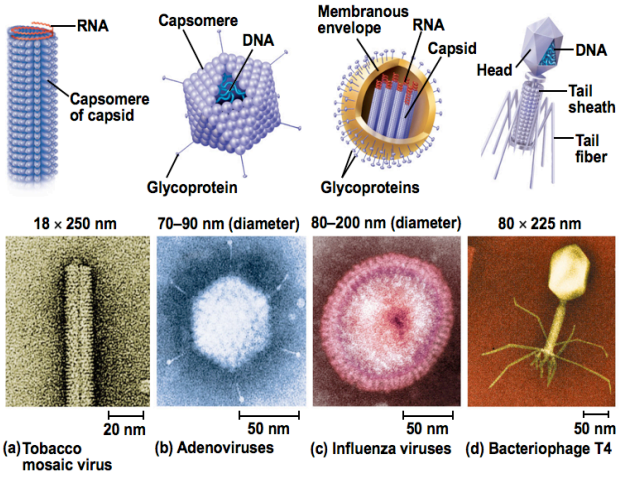

**Şekil 1.2: Dünyada E. coli enfeksiyonları ve buna bağlı ölümler (WHO, 2012)**



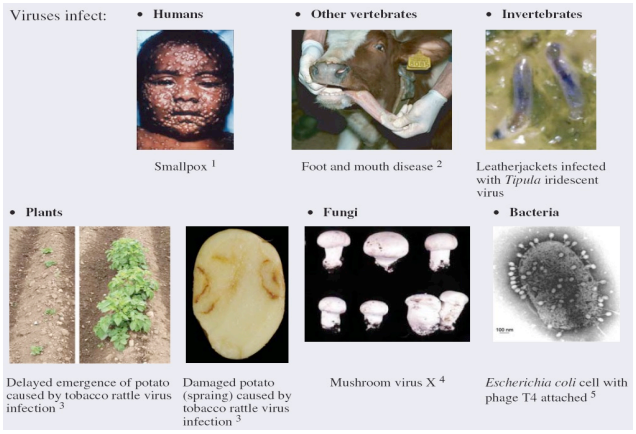

**Şekil 1.3: E. coli kaynakları/bulaşma yolları İlgili kaynaktan uyarlanmıştır (Croxen ve ark., 2013)**

### 1.2.2. Bakteriyofajlar

Virüsler en basit şekilde hastalığa neden olan bakteriden daha küçük partiküller olarak tanımlanır - nanoboyutlu - hücresel olmayan - çeşitli proteinlerden oluşan bir kılıf ("capsid") ile çevrelenmiş bir nükleik asit genomu (tek veya çift sarmal DNA veya RNA) den oluşan yapılardır. Şekil 1.4 ve 1.5'de örneklendiği gibi farklı boy, şekil ve yapıda çok sayıda - hemen hemen her canlıyı enfekte eden farklı virus türleri vardır. Günümüzde yaşadığımız Korona pandemik virüsü gibi insan sağlığını/yaşamını son derece olumsuz etkileyen - patojenik bakteriler gibi temel düşmanlarımızdır.




**Şekil 1.4: Virüslere örnekler (Napa Valley, 2016)**



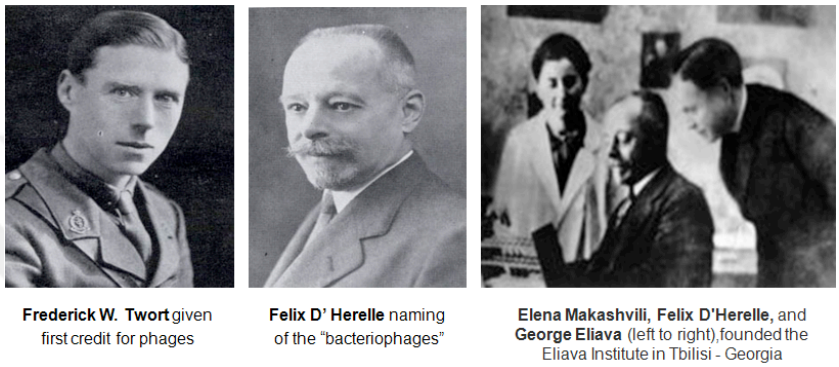

**Şekil 1.5: Virüsler - canlı türüne özgün olarak hemen hemen tüm canlıları enfekte edebilirler. Sağ altta görülen fotoğraf bu tezde de incelenen E. coli ve üzerine biriken - ona özgün T4 fajlarını göstermektedir (Britannica, 2016; World Press, 2016a)**

Dünyadaki sayı/tür olarak en çok bulunan canlı organizmalardan biri olan bakteriyofajlar (kısaca fajlar) tipik virüslerdir. Fajlar hedef bakterilerini oldukça özgün enfekte eder, içlerine DNA/RNA'larını enjekte edip - bir yandan kendilerini çoğaltır bir yandan da bakteriyi yerler/öldürürler. Bakteriyofaj Eski Yunanca'da bakteri yiyen anlamına gelir. İnsan hücrelerini enfekte etmezler - bize zarar veren bakterileri yok ederler - dolayısıyla düşmanımızın düşmanı bizim dostumuzdurlar. Başka bir ifadeyle çok değerli/özgün antibakteriyal ajanlardır - uzun yıllardır antibiyotiklerin önemli alternatifleri olarak değerlendirilmeleri tartışılmaktadır. Özellikle günümüzde antibiyotik dirençli bakteri suşlarının gelişmesi son yıllarda bakteriyofajlara ilgiyi önemli oranda artırmıştır.

Frederick W. Twort - bir İngiliz bakteriyolojist olup - bakteriyofajları ilk kez 1915'de ilk tanımlayan/keşf edendir (Twort, 1915). Felix D'Herelle (bir Fransız-Kanadalı) Paris'de 1917'de Pasteur Enstitüsünde *Shigella* nın fajlar tarafından parçalanmasını/yok edilmesini gözlemiştir (D'Herelle, 1917). Twort, bakteriyofajları ilk tanımlayan olmasına karşın bu alandaki çalışmalarına buluşundan sonraki yıllarda devam etmemiştir. Ancak D'Herelle bilimsel hayatının hemen hemen tamamını bakteriyofajlar ile ilgili çalışmalar ile geçirmiştir. Bakteriyofaj ismini veren, isim babası D'Herelle fajların bakteriyal enfeksiyonların tedavisinde ("faj terapisinde") kullanılabileceklerini göstermiş, bu alana çok önemli katkılar yapmıştır (D'Herelle, 1918). Sonraki yıllarda faj terapisinde liderliği eline alan Sovyet Rusya ve özellikle Gürcistan'a bu tedaviyi tanıtan taşıyan kendisidir. Şekil 1.6'da Twort ve D'Herelle in fotoğrafları verilmiştir. Üçüncü fotoğraftaki D'Herelle laboratuvarlarında yetişen George Eliava - "Tiflis-Gürcistan" da kendi adıyla anılan hemen hemen 100 yıllık Eliava Enstitüsü'nü kurmuştur. Dünya'da en önemli faj ensititülerinden biri olan bu enstitü uzun yıllardır antibakteriyal ajan olarak tedavi amaçlı faj kokteyleri üretemekte/ satmaktadır. Sunulan tezin sahibi Dr. Farzaneh Moghtader'de - bir uluslararası projenin kapsamında (EU-NanobacterphageSERS) bu enstitüde yaklaşık 5 ay çalışma şansı bulmuş bakteriyofajlar konusunda önemli deneyim kazanmıştır.

Faj tedavisi ile ilgili tarihsel gelişme oldukça ayrıntılı olarak ilgili kaynaklarda bulunabilir (Summers, 2001; Sulakvelidze ve Kutter, 2005; Hausler, 2006; Housby ve Mann, 2009). Bakteriyofajların enfeksiyonların tedavisinde kullanımlarına ilgi - çok sayıda başarılı antibiyotik bulunması/yüksek kapasiteler ile ticarileştirilmesi nedeniyle

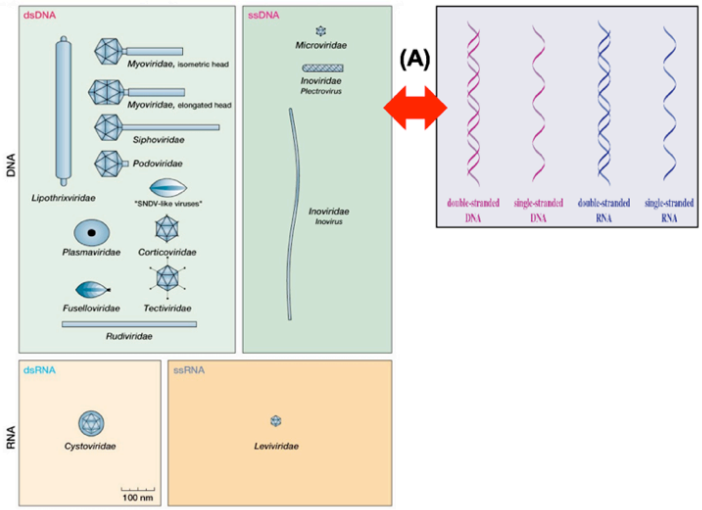
uzun yıllar askıya alınmıştır. Ancak özellikle patojenik bakterilerin antibiyotik direnci oluşturmaları - hiçbir antibiyotiğe cevap vermemeleri - bakteriyofajlara ilgiyi yeniden güçlü bir şekilde uyandırmıştır. Sunulan bu tezin temel hedefi olan diyabetik ayak enfeksiyonları önemli uygulamaları arasında olacaktır. Bakteriyofajların yalnızca antibakteriyal ajanlar olarak tedavide değil bunun yanısıra hedef bakterilerin çok özgün tanısında da biyotanıma ajanları olarak kullanılabilir olmaları önemle not edilmelidir (Moghtader ve ark., 2016, Moghtader ve ark., 2017; Moghtader ve ark., 2018).




**Şekil 1.6: Frederick W. Twort (en soldakai fotoğraf - bakteriyofajleri bulan bir İngiliz bakteriyolog), Felix d'Herelle (ortadaki fotoğraf - "bakteriyofaj" adını koyan - bu alanda çok önemli katkıları bulunan bir bir Fransız-Kanadalı bilim adamı). Elena Makashvili, Felix D'Herelle ve George Eliava (en sağdaki fotoğraf) Gürcistan, Tiflis, Eliva Enstitüsü'nde faj konusunda tartışırken (Twort, 1915; D'Herelle, 1917)**

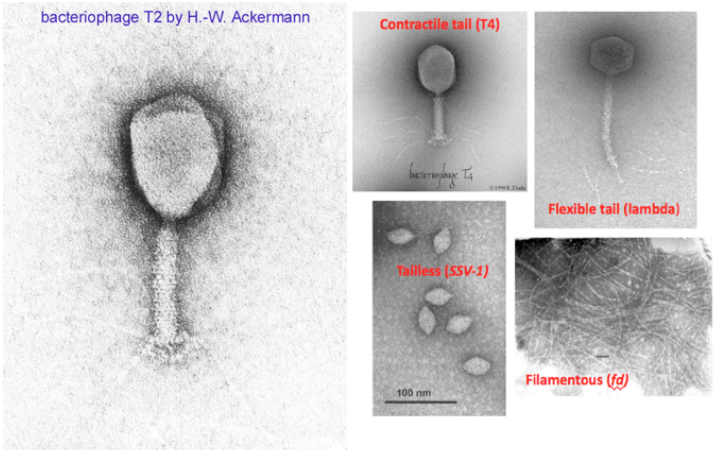
Tüm virüslerde olduğu gibi bakteriyofajlarda kendi başlarına yaşayamaz, çoğalamazlar, mutlaka bir konağa gereksinim duyarlar - bu nedenle "yaşamayan" ("non-living") organizmalar olarak da tanımlanırlar - hücreleri ve hücresel elemanları/ organelleri yoktur - bakteriyofajlar için konak bakterilerdir. Her bakteriyi çok özgün veya daha az özgün tanıyan, onları konak olarak kullanıp kendini çoğaltan çok sayıda bakteriyofaj vardır.

Bakteriyofajlar Şekil 1.7'de örneklendiği gibi farklı 3B yapılarda (morfolojilerde) ve farklı genetik/nükleik asit (çoğunlukla dsDNA, fakat ssDNA; dsRNA veya ssRNA) özelliklerine sahip olabilirler. Bakteriyofajların ilk elektron mikroskop görüntüsü 1942'de Luria ve Anderson tarafından çekilmiştir. Bu fotoğraf ve diğer 4 farklı bakteriyofajın elektron mikroskobi görüntülerine örnekler Şekil 1.8'de verilmiştir.

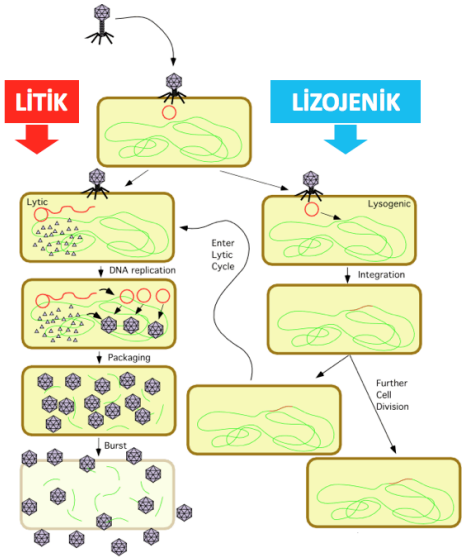



**Şekil 1.7: Bakteriyofajlar: 3D yapıları/morfolojileri ve nükleik asit özellikleri. (Slide Share, 2016)**

Bakteriyofajlar yaşam tarzlarına göre şu iki grupta değerlendirilir: (A) Litik (örneğin T4 fajı) ve (B) Lizojenik (örneğin Lambda fajı) (Şekil 1.9). Litik yaşamda faj konak bakteri içine girer kendini çoğaltırır daha sonra bakteriyi öldürüp dışarı çıkar (genellikle bakteri duvarını parçalayarak). Lizojenik yaşam tarzında faj genomu konağın (bakterinin) genomuna entegre olur - gerektiğinde (istediğinde) litik faza geçip litik fajlarda olduğu gibi kendisini çoğaltır ve bakteriyi öldürerek dışarı çıkar.




**Şekil 1.8: T2 fajının Luria ve Anderson tarafından 1942 çekilen SEM fotoğrafı ve diğer 4 farklı fajın elektron mikroskop görüntülerine örnekler (Slide Share, 2016; ASM Org, 2016; Britannica, 2016; Study Blue, 2016)**




**Şekil 1.9: Bakteriyofajların "litik" ve "lizojenik" yaşam tarzları (World Press, 2016b)**

Şekil 1.10'da bu tezde de kullanılan *E. coli* T4 fajının yapısı, hedef bakteriyi enfekte etmesi ve onu konak olarak kullanıp 6 adımlı litik çoğalma prosesi şematik olarak verilmiştir ve bu adımlar şöyle özetlenebilir:

**Adım 1.** *Bakteri yüzeyini bulma ve yerleşme:* Fajlar bakteri hücre duvarı üzerindeki reseptörleri (genellikle proteinlerler, liposakkaritler, karbohidratlar, vb.) oldukça özgün olarak tanır ve duvar üzerine yerleşirler.

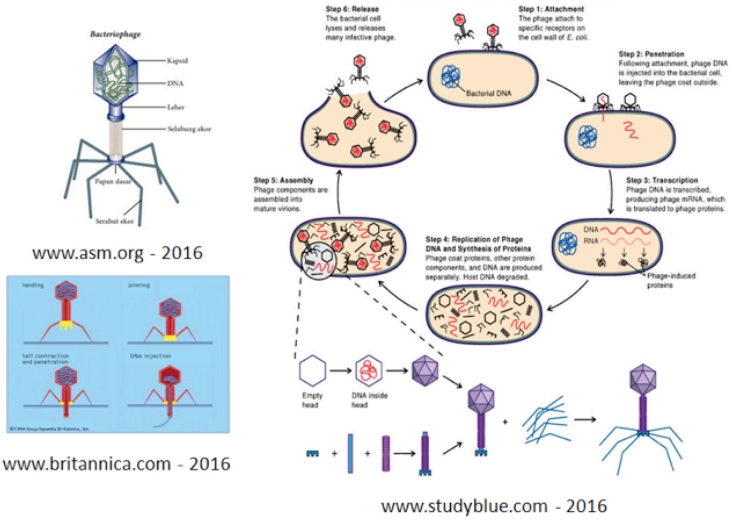
**Adım 2.** *Penetrasyon:* İkinci adımda faj DNA/RNA sını bakteri içine enjekte eder. Örneğin bu tezde de kullanılan T4 fajı kuyruğunu şıkıştırarak enjeksiyon yapar. Yalnızca faj nükleotidinin hücre içine alındığı not edilmelidir.

**Adım 3.** *Yazılım (Transkripsiyon):* Faj DNA'sını oluşturan nükleotit dizini bakteri RNA polimeraz enzimi ile bir RNA dizini olarak kopyalanır/yazılır (transkripte edilir) ve mRNA üzerinden faj proteinleri (viral enzimler de dahil olmak üzere) sentezlenir. Görüldüğü gibi burada faj konuk olduğu bakteriye yalnızca DNA'sını göndererek bakteriye kendisini çoğalttırmaktadır.

**Adım 4.** *DNA replikasyonu ve protein sentezi:* Fajın kapsidini oluşturacak proteinler ve DNA/RNA sentezlenir ve ev sahibinin konak DNA'sı yok edilir.

**Adım 5.** *Biraraya getirilme:* Faj bileşenleri bir araya getirilir - şimdi çok sayıda yavru faj (virions) bakteri dışına çıkmaya hazırdır.

**Adım 6.** *Salım*: Litik bakteriyofajlar durumunda bakteri duvarı parçalanır ("lisiz") ve yeni fajların salımı gerçekleşir. Birçok faj bakteriyi liz ederken bazıları (örneğin flament/iplikçik şeklinde olanları) bakteri duvarını parçalamadan da dışarı salına bilirler/çıkarlar.



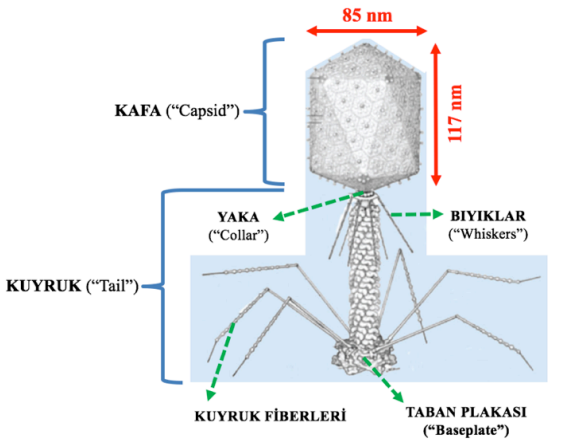

**Şekil 1.10: T4 fajının 3B yapısı (üst sol); T4'ün bakteri duvarına yapışması/yerleşmesi ve DNA'sını bakteri içine enjeksiyonu (alt sol); ve hedef bakteri E. coli 'yi konak (ev sahibi) olarak kullanıp, bir tipik altı adımlı litik çoğalma döngüsü (sağ) (ASM Org, 2016)**

### 1.2.3. T4 Bakteriyofajı

T4 bakteriyofajı *E. coli*'nin 7 fajından (T1-T7) biridir - burada T "Türü" ifade etmektedir. "T-even" fajları olan T2, T4 ve T6 yapısal ve genetik özellikleri antijenik cevapları çok benzerdir. T4 fajı - kuyruklu fajlar arasında en karmaşık ailesi olan "Myoviridae" ailesinin en çok araştırılan dolayısıyla bugün oldukça ayrıntılı bilgilere sahip olduğumuz bakteriyofajdır. Genel anlamda virus ve bakteriyofaj çalışmalarına - moleküler düzeyden 3B yapılarına/fonksiyonlarına ve morfogenez aydınlatmasına ışık tutabilecek kadar ayrıntılı uzun yıllardır devam eden çok sayıda kaynak bulmak mümkündür (Bradley, 1963; Blattner ve ark., 1997; Leiman ve ark., 2003; Miller ve ark., 2003; Kutter and Sulakvelidze, 2005; Aksyuk ve ark., 2009; Black ve Rao, 2012; Fokine ve ark., 2013; Yap ve Rossman, 2014).

Sunulan tezde temel bakteriyofaj T4 fajıdır. İlgili literatürden adapte edilen T4 fajının bileşeneleri ve boyutlar Şekil 1.11'de verilmiştir (Leiman ve ark., 2003; Yap ve Rossman, 2014). T4 fajı şu üç temel bölümde değerlendirilir: (i) Kafa ("capsid"): 117 nm uzunluğunda 85 nm genişliğinde hegzamerik kafa çok sayıda farklı fonksiyonları olan proteinden (ve enzimden) oluşur - temel görevi fajın DNA sını korumaktır - yerleşmesini ve yer değiştirmesini de yönlendirirler. Morfogenez sürecinde içi boş elipsoid/kubbe formundan ("prohead") olgun ("mature") DNA yı paketlemiş

hegzagonal son formuna dönüşüm; (ii) Kuyruk: Kuyruk tübüler protein çapı 52 nm ve yüksekliği 270 nm dir. Kuyruk tüpünün etrafını saran proteinler tübün kasılmasını ve bakteriye DNA enjeksiyonunu sağlarlar. Kuyruğun en alt tarafında "taban plakası" ("baseplate") bulunur burada bakteri duvarını delecek - matkap görevini üstlenen peptid gruplarından oluşan bir bölüm vardır. Fajın bakteriyi enfekte etmesi sürecinde taban plakası kubbe ("dome") formundan "yıldız" formuna geçer, kasılma olur, kuyruk tübü tam bir tur döner - delme gerçekleşir kapsid içindeki DNA bakteri hücre içine enjekte edilir. (iii) Kuyruk fiberleri: Taban tabakasına bağlı herbiri 145 nm uzunluğunda uzun kuyruk fiberi vardır. Her birinin ucundaki gp37 proteinin C-terminallerindeki bölümler bakteri üzerindeki hedef reseptörleri özgün tanıyan uçları oluşturur. Fajın boyun bölümündeki 12 fibritin molekülü yaka ("collar") ve bıyık ("whisker") bölümleri olarak adlandırılır - bunlar optimum enfeksiyon koşullarının oluştuğunu algılayarak sürecin başlamasını sağlarlar.




**Şekil 1.11: T4 fajının 3B yapısı. Temel bölümleri/bileşenleri: Kafa ("capsid"),kuyruk ("tail"), yaka ("collar"), bıyıklar ("whiskers") ve kuyruk fiberleri. İlgili kaynaktan uyarlanmıştır (Leiman ve ark., 2003; Yap ve Rossman, 2014)**

T4 fajı proteinleri moleküler düzeyde çok ayrıntılı olarak incelenmiştir. Ancak hala pH a bağlı net yük değişiminin ve bunun dağılımını tam olarak ifade etmek mümkün değildir. Yalnızca kapsidin isolektrik noktasının (pKa değerinin) 4.8-6.2 arasında olduğu ifade edilmektedir - kuyruk ve fiberler de dahil edildiğinde T4 fajının ortalama pKa değerinin 4 civarında olduğu rapor edilmiştir (Cummings ve ark., 1970; Child ve Bimboim, 1975; Showe ve ark., 1978; Archer ve Liu, 2009; Michen ve Graule, 2010). Kapsid üzerinde negatif/pozitif yük dağılımını tam olarak bilmesek dahi fizyolojik pH değerlerinde kapsid net yükünün negatif olduğunu söylemek mümkündür

- buna karşın bakteriyi tanıyan ve bakteri üzerine yerleşen kuyruk fiberlerinin ucu pozitif yüklü olup negatif yüzey yüküne sahip *E. coli* ile elektrostatik etkileştiği not edilmelidir (Kutter ve Sulakvelidze, 2005).

Önceki çalışmalarımızda bakterilerin özgün tanısında bakteriyofajların tanıyıcı element ("biyoprob") olarak kullanımları çeşitli yöntemler (SERS, LSPR, MALDI-TOF MS ve floresans spektroskopi) ile araştırılmıştır (Moghtader ve ark., 2016; Moghtader ve ark., 2017; Moghtader ve ark., 2018). Hedef bakterilerden birisi bu tezde de kullanılan *E. coli*'dir ve bunu özgün tanıyan T4 fajı biyoprob olarak değerlendirilmiştir. Benzer birçok tanı çalışmasında temel hedef bir taşıyıcıya/ yüzeye bakteriyofajı başından immobilize ederek bakteriyi tanıyacak ayak bölümü dışarı yönde oryante olmuş şekilde immobilize etmektir. Tanı amaçlı kullanılmak üzere faj immobilizasyonu ile ilgili literatürde ayrıntılı çalışmalar bulmak mümkündür (Balasubramanian ve ark., 2007; Gervais ve ark., 2007; Lakshmanan ve ark., 2007a; Lakshmanan ve ark., 2007b; Nanduri ve ark., 2007; Handa ve ark., 2008; Shabani ve ark., 2008; Singh ve ark., 2009; Cademartiri ve ark., 2010; Handa ve ark., 2008; Tolba ve ark., 2010; Anany ve ark., 2011; Arya ve ark., 2011, Singh ve ark., 2013; Xu ve ark., 2019). Sunulan tez de T4 fajlarının jelatin mikrokürelere yüklenmesi amaçlanmıştır. Ancak tanı uygulamalarından çok farklı olarak yüklenen fajın saklama/depolama sırasında matriks içinde kalması ancak uygulamada jelatin matriksten dışarı salınarak antibakteriyal etki göstermesi hedeflenmiştir. Dolayısıyla tezin ilerliyen bölümlerinde tartışılacağı gibi bakteriyofajın hem etkin yüklenmesi hem de salımı için tez kapsamında yapılan öngörüler/deney planları gerçekleştirilmiş.

### 1.3. Jelatin

Jelatin hayvan kökenli kollajenin hidroliz ile denature edilmiş formudur - günümüzde özellikle gıdalarda jelleştirici bileşen olarak çok yaygın kullanılır (Francis, 2000; Djagnya, ve ark., 2010; Liu ve ark., 2015). Tıpta sunulan tez içeriği benzeri uygulamalarda biyoesaslı, biyobozunur ve biyouyumlu biyomateryal olarak (genelikle çapraz bağlı suda şişen hidrojel formunda), ilaç/aktif ajan taşıyıcı/kontrollu salım formülasyonlarında, ilaç ve vitamin kapsüllenmesinde, birçok kozmetik üründe, fotoğraf film ve kağıtlarının hazırlanmasında en yaygın kullanılan maddelerin başında gelir (Ward ve Courts, 1977; https://en.wikipedia.org/wiki/Gelatin#Technical_uses) Bir polipeptiddir. Kaynağına ve proses edilme yöntemine göre bileşimi değişse de yaklaşık

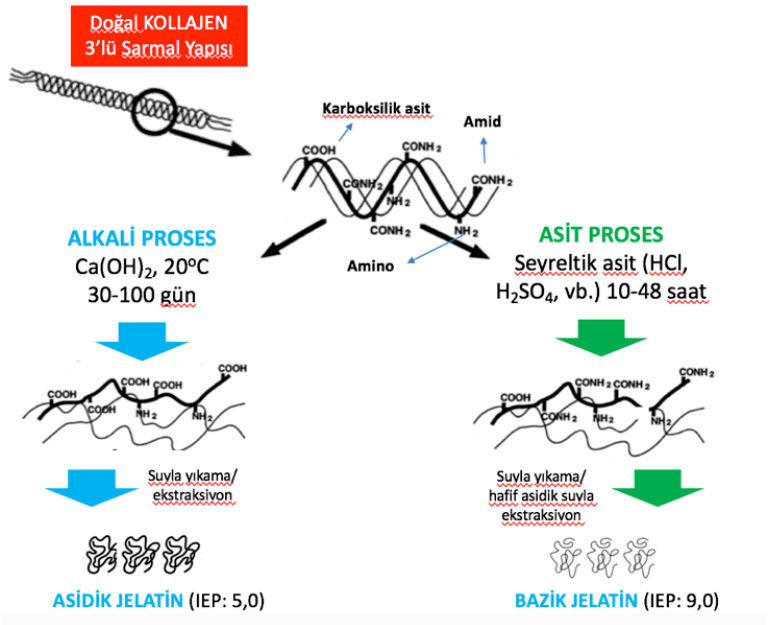
amino bileşimi şöyledir (Veis, 1964; Francis, 2000): %21 glisin, %12 prolin, %12 hidroksiprolin, %10 glutamik asit, %9 alanin, %8 arjinin, %6 aspartik asit ve %22 diğer.

Jelatin birçok hayvanın dokularından - örneğin, domuz, sığırlar ve balıkların derileri, kemikleri, tendonları, kıkırdakları, vb. kollajen içeren dokuların kontrollu hidroliz ile (asidik, bazik veya enzimatik) elde edilir/üretilir (Jamilah ve Harvinder, 2002; Gómez-Guillén ve Montero, 2011; Hafidz ve ark., 2011; Suvarnapathaki ve ark., 2019). Üretimde doğal dokudaki genellikle çapraz bağların parçalandığı ve jelatin dışındaki diğer bileşenlerin temizlenip uzaklaştırıldığı not edilmelidir - ürün genellikle 100 bin molekül ağırlığında suda çözünen polipeptid zincirleri - jelatin molekülleri - dir (Veis, 1964). İlk kez domuz derisinden 1930'lu yıllarda ekstrakte edilmiştir - bu kaynak günümüzde de en önemli jelatin kaynaklarının başında gelir. Balık jelatini derilerinden ve kemiklerinden elde edilir - balığın türüne göre oldukça farklı özelliklerde olabilir. Kaynağına göre ve ekstraksiyon yöntemine/koşullarına göre elde edilen jelatinlerin çok farklı olacağı dolayısıyla bunlardan üretilen jelatin hidrojellerinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin çok farklı olacağı önemle not edilmelidir. Başka bir açıdan bakılınca bunun aslında farklı özelliklerde hidrojel üretimi için önemli bir avantaj olarak değerlendirilmesi gerekir. Örneğin domuz ve sığır jelatinlarinden hazırlanan jellerin gücü ve sertliği çok farklıdır. Hem sığır hem de domuz derisinden elde edilen jelatin jellerin mekanik özellikleri pH ile değişir ancak pH etkisi oldukça farklıdır. Sığır dersinden elde edilen jelatin ile hazırlanan jeller daha esnektir ve bu da örneğin hücre yayılmasını olumlu etkiler (Hafidz ve ark., 2011).

Jelatinin dünya genelinde üretim kapasitesi yılda yarım milyon tona yaklaşmıştır. Üretimde hayvansal kaynaklı kollajen kullanılır, üretimin yarıya yakını domuz derisinden diğer yarısıda domuz ve inek kemiklerinden şu genel adımlar izlenerek üretilir: (i) Ön işlemler: Burada hayvansal hammadde kaynağına göre tüy uzaklaştırma, yıkama, boyut küçültme, vb. gibi işlemler ile hammadeler hidrolize hazırlanır; (ii) Hidroliz: Kollajen hidrolizi asit, alkali veya enzimatik olarak gerçekleştirilir. Asit hidrolizi deri gibi daha basit yapıda (çapraz bağlanması düşük) kollajen kaynaklarına (örneğin domuz derisi) uygulanır - yaklaşık birkaç günde tamamlanır - ürün Tip A ("bazik") jelatin olarak adlandırılır. Alkali ile hidroliz daha karmaşık yapıda kollajen içeren kaynaklara (örneğin kemik dokuları) uygulanır, çok daha yüksek çapraz bağ derecesi nedeniyle hidroliz süresi birkaç hafta hatta daha uzun olabilir - ürün Tip B ("asidik") jelatin olarak adlandırılır. Enzimatik hidroliz oldukça saf

ürün elde edilmesini sağlar alkali hidrolizden daha kısa süre de gerçekleşir. Enzim maliyeti ve sıcaklığa duyaralılıkları olumsuz yönler olarak değerlendirilmelidir; (iii) Ekstraksiyon: Hidroliz işlemleri sonucu elde edilen fazdan jelatin genellikle asidik ekstraksiyon ile ayrılır, çok adımlı bu proseste sıcaklık kademeli olarak artırılır - ısıl degredasyon olabilir - dikkat edilmesi edilmesi gerekir; ve (iv) Bitirme işlemleri: Filtrasyon, buharlaştırma, kurutma ve öğütme bitirme işlemleri ard arda uygulanarak saf, kuru jelatin tozları son ürün olarak elde edilir.

Yukarıda açıklandığı gibi doğal kollajen kaynaklardan farklı yöntemler ile şu iki tür jelatin ticari olarak yüksek miktarlarda üretilmektedir: (i) Bazik ve (ii) asidik. Bu iki türün elektrostatik özellikleri oldukça farklıdır. Şekil 1.12'de asidik ve bazik jelatin üretiminde doğal jelatinin polipeptid zincirlerinde oluşan değişiklikler şematik olarak özetlenmiştir. Alkali prosesde, doğal jelatin kaynağı, oda sıcaklığında (20ºC civarı), $Ca(OH)_2$ gibi alkali oratamda (birkaç ay: 30-100 gün) etkileştirilir. Amid gruplarının parçalanması ve karboksilik asit gruplarına dönüşme söz konusudur - bu da jelatinin asidik özellik kazanmasına ve bunun sonucu düşük IEP değerine (IEP: 5,0) neden olur. Asit proseste ise primer amin grupların ($NH_2$) sayısının artması söz konusudur, buda bazik özelliği sağlar, IEP si 9,0 dır.




**Şekil 1.12: Bazik ve asidik jelatin üretimleri. İlgili kaynaktan uyarlanmıştır (Tabata ve Ikada, 1998)**

IEP değerlerinden - fizyolojik koşullarda (pH:7,4) bazik jelatinin net yükünün pozitif, asidik olanın ise negatif olduğu söylenebilir. Bu özellikle net yükü pH a göre değişen, örneğin proteinler gibi biyolojik moleküllerin fizyolojik koşullarda jelatin matrikslere yükleme ve salım davranışlarının kullanılan jelatin türüne göre çok farklı olacağı anlamına gelir (Ozeki ve Tabata, 2005). Sunulan çalışmada biyoaktif ajan olarak bakteriyofaj salım matriksleri olarak bazik jelatin mikroküreler, bFGF ve kök hücre kümelerinin hazırlanmasında ise asidik jelatinden hazırlanan jelatin mikroküreler kullanılmıştır.

Farklı formlarda şekillendirilmiş jelatin hidrojelleri hücre kültür substratı (Hori ve ark., 2004; Takahashi ve ark., 2005; Narita ve ark., 2009), doku rejenerasyonu için hücre/doku yapı iskeleleri (Okamoto ve ark., 2004; Hiraoka ve ark., 2006; Igai ve ark., 2006; Akagawa ve ark., 2008; Watanabe ve ark., 2010), ve aktif ajan (örneğin ilaçlar ve büyüme faktörleri) taşıyıcı/kontrollu salım formülasyonları (Tabata ve ark., 1994; Hong ve ark., 1998a; Hong ve ark., 1998b; Tabata ve Ikada, 1998; Tabata ve ark., 1998a; Tabata ve ark., 1998b; Tabata ve Ikada, 1999; Tabata ve ark., 1999a; Tabata ve ark., 1999b; Tabata ve ark., 1999c; Hong ve ark., 2000, Tabata, 2000; Tabata ve ark., 2000a; Tabata ve ark., 2000b; Tabata ve ark., 2000c; Ozeki ve ark., 2001, Balamurugan ve ark., 2003, Yamamoto ve ark., 1998; Yamamoto ve ark., 2000; Yamamoto ve ark., 2003; Ozeki ve Tabata, 2005; Kushibiki ve ark., 2006; Yamamoto ve ark., 2006; Tabata ve ark., 2006; Esaki ve ark., 2007; Takahashi ve ark., 2007; Ichinohe et al., 2008; Kikuchi ve ark., 2008; Patel ve ark., 2008a; Patel ve ark., 2008b; Kimura ve Tabata, 2010; Odabaş ve ark., 2013; Inci ve ark., 2014; Alıcı-Garipcan ve ark., 2019) olarak birçok çalışmada yer almış ve başarısı deneysel olarak gösterilmiştir. Sunulan tez kapsamında MHK kümeleri taşıyan, bakteriyofaj ve bFGF yüklü/kontrollu salımı sağlayan biyohibrid materyallerin geliştirilmesinde taşıyıcı matriks olarak jelatin hidrojel mikroküreleri kullanılması öngörülmüştür/kullanılmıştır.

Bu uygulamalarda jelatin hidrojellerinin kullanılmasının önemli avantajları vardır. Jelatin doğal bağ dokusunu oluşturan kollajenin denature formudur. Vücudda biyodegrede olur - kendisi ve degredasyon ürünlerinin biyouyumluluğu tahmin edilebileceği gibi çok yüksektir. Ticari olarak mevcuttur - kolaylıkla temin edilebilir - düşük fiyatlı bir hammadedir. Jelatin suda çözünen bir doğal polimer/polipeptiddir -

kolaylıkla şekillendirilebilir. Çeşitli çapraz bağlanma yöntemleriyle suda çözünmeyen ancak şişen - hidrojel yapısında matriksler kolaylıkla hazırlanabilir. Çapraz bağlanma derecesi - başka bir ifadeyle çapraz bağ yoğunluğu değiştirilerek mekanik/fiziksel özellikleri ve şişme (su alma) kapasitesi kolaylıkla ayarlanabilir. Kontrollu salım matriksi olarak düşünüldüğünde çapraz bağ yoğunluğunun değiştirilmesi ile özellikle suda çözünen/dağılmış aktif ajan yüklemesi ve salımı kontrollu bir şekilde yapılabilir. Özellikle suda çözünen büyüme faktörleri gibi fiziksel çevre koşullarından (örneğin, sıcaklık, vb.) çok olumsuz etkilenen - aktivitesini kaybeden biyoesaslı moleküllerin - bu tez kapsamında da uygulandığı gibi - kuru hidrojeler biyoaktif ajanın bulunduğu sulu fazı - oda sıcaklığında basitçe emdirilerek %100 yüklenebilmesi çok önemli bir avantaj olarak değerlendirilmektedir.

Jelatin ve benzeri polipeptid matrikslerin çapraz bağlanması için çeşitli çapraz bağlanma yöntemleri kullanılmaktadır. Fiziksel (dehidrotermal, UV irradiyasyonu, vb.), çeşitli çapraz bağlanma ajanlarının kullanıldığı (glutaraldehit, 1,4-butandiol diglisidil eter, epiklorhidrin, lisin diizosiyanat etil esteri, vb.) kimyasal ve enzimatik (genapin, transglutaminaz, vb.) bir çok yaklaşım başarıyla uygulanmıştır - ilgili literatürde çok sayıda bilgi bulunabilmektedir (Tabata ve Ikada, 1989; Damink ve ark., 1995; Weadock ve ark., 1995; Weadock ve ark., 1996; Peppas ve ark., 2000; Bigi ve ark., 2001; Lee ve ark., 2001; Lee ve Mooney 2001; Bigi ve ark., 2002; Crescenzi ve ark., 2002; Chang ve ark., 2003; Liang ve ark., 2003; Lie ve ark., 2003; Ueda ve ark., 2003; Ozeki ve Tabata 2005; Tronci ve ark., 2010; Hennick ve van Nostrum 2012; Hoffman, 2012; Fonseca ve ark., 2014; Maitra ve Shukla, 2014; Manickam ve ark., 2014; Reddy ve ark., 2015; Jaipan ve ark., 2017; Bakvari ve ark., 2018; Oryan ve ark., 2018; Tajima ve Tabata, 2018). Sunulan tez kapsamında çapraz bağlayıcı olarak bu amaçla çok yaygın olarak uygulanan - altı karbonlu iki ucunda aldehit grubu bulunan - proteinlerdeki peptidlerin yan zincirlerinde bulunan amino grupları ile kimyasal reaksiyona girerek çapraz bağ oluşmasını sağlıyan - glutaraldehit (GA) kullanılmıştır.

### 1.4. Doku Mühendisliği: Mezenkimal Kök Hücreler

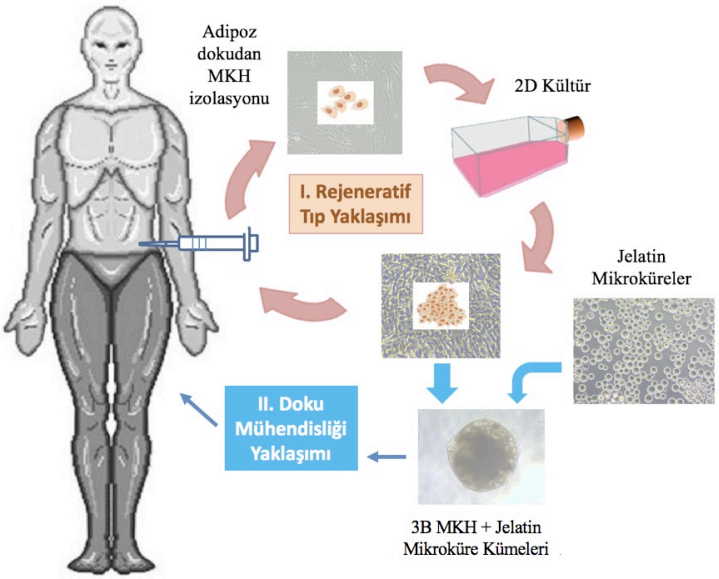
Başta yaralanmalar, cerrahi işlemler, kanserli dokuların uzaklaştırılması, vb., gibi nedenlerle önemli bir miktarda doku kaybı olduğu durumlarda yumuşak ve sert dokunun onarımı için ilk akla gelen şüphesiz sağlıklı doku temini ve kayıp bölgenin bunlar ile onarımıdır. Bu amaçla doğal kaynaklardan elde edilen dokular - altın standard

olarak “otogreftler” başta olmak üzere allogreftler ve zenogreftler yaygın olarak kullanılmıştır/kullanılmaktadır. Alternatif olarak ve/veya daha çok düzgün doku onarımına destek vermek üzere doğal ve sentetik polimerler yapılmış biyomalzemelerin de değerlendirildiği - klinik olarak uygulandığı da önemle vurgulanmalıdır. Bu doğal veya sentetik tüm malzemelerin uygulanmasının hem olumlu/başarılı yönleri vardır, hem de çoğunda olumsuz/sınırlayıcı sorunlar söz konusudur.

Günümüzde “Doku mühendisliği” ve “Rejeneratif tıp” yaklaşımları iki yenilikçi tedavi uygulamasıdır. Şekil 1.13’de bu iki yaklaşımı sunulan tez kapsamında elde edilen fotoğraflar/yaklaşımlar kullanılarak şematik olarak açıklanmıştır. “Doku mühendisliği” hemen hemen 30 yıl önce tanımlanmış - doku onarımında hücre ve biyomateryalleri bir arada - “hücre/biyomateryal” hibrid ürünleri olarak kullanıldığı bir yaklaşımdır (Langer ve Vacanti, 1993). Öncellikle sağlıklı dokulardan izole edilen primer hücreler (son yıllarda kök hücreler) *in vitro* besi ortamlarında kültür edilir, sayıları artırılır (yeteri miktara getirilir), istenirse/gerekiyorsa - örneğin kök hücreler durumunda - onarılacak doku türüne göre istenilen yönde farklılaştırma sağlanır. “Rejeneratif tıp“ yaklaşımında bu hücreler doğrudan hasarlı bölgeye transfer edilip kullanılır - “Rejeneratif Tıp” sözcüğü temel olarak hücreler ile rejenerasyonu ifade eder - modern tıpda - hemen hemen her hücre türüne farklılaşma ve hızlı rejenerasyon sağlama yetenekleriyle - kök hücrelerin kullanımı gelecek kuşak tedavi yaklaşımı olarak kurgulanmaktadır - klinik uygulamaları hızla artmaktadır. Doku mühendisliğinde ise hücreler biyobozunur gözenekli taşıyıcı matriksler - “doku iskeleleri” - (“scaffolds”) ile birlikte kullanılır. Doku iskeleleri - esas olarak - narin/kırılgan, fiziksel olarak taşınması/korunması zor memeli hücrelere geçici olarak ev sahipliği yapar - bunların zaman içinde biyobozunarak yok olması ve yerini yeni oluşan dokuya bırakması beklenir.

Sunulan çalışmada adipoz dokudan izole edilen mezenkimal kök hücreleri ile doku onarımı hedeflenmiştir. Bunların doğal polimerler olan jelatin mikroküreler üzerinde/etrafında 3B hücre kümelerinin oluşturulması ve bu biyoaktifhibridlerin doku mühendisliği onarım amacıyla kullanımları söz konusudur - değişik/özgün bir doku mühendisliği yaklaşımıdır. Aşağıda daha ayrıntılı olarak tanımlanacağı gibi jelatin esaslı mikroküreler basit taşıyıcılar değildir - kök hücre farklılaşması, gelişmesi ve doku onarımda önemli rol aldıkları dolayısıyla biyoaktif malzemeler olarak

değerlendirilmeleri gerektiği dikkatle not edilmelidir (Hayashi ve Tabata, 2011; Hirayama ve ark., 2018; Inoo ve ark., 2018).




**Şekil 1.13: Adipoz dokudan izole edilen kök hücreler ile hücre tedavileri: (I) Rejeneratif tıp yaklaşımı; ve (II) doku mühendisliği yaklaşımı: Şeklin hazırlanmasında bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda elde edilen görüntüler kullanılmıştır.**

Hücre tedavilerinde ve doku mühendisliğinde son yıllarda primer hücrelerin yerini kök hücreler almıştır (Atala, 2004; Polak ve Bishop, 2006; Lee ve ark., 2008; Lin ve Chang, 2008; Berthiaume ve ark., 2011; Bratt-Leal ve ark., 2011; Yoon ve ark., 2012; Sart ve ark., 2014; Akyurekli ve ark., 2015; Chua ve Yeong, 2015; Laschke ve Menger, 2017a; Laschke ve Menger, 2017b; Domnina ve ark., 2018; Egger ve ark., 2018; Madigan ve Atoui, 2018). Özellikle multipotent mezenkimal kök hücrelerin (MKHler) klinik uygulama potansiyeli çok yüksektir. Kolaylıkla çoğaltılabilirler, birçok hücre türüne farklılaşabilirler, hatta immun sistemden kaçabilirler ve immunbaskılayıcı özellikleri vardır. Otojenik elde edilebilecekleri gibi, allojenik kullanmaya hazır, "off-the shelf" türü hücrelerdir, terapötik uygulamalarda doğrudan kullanılabilirler (Owen ve Friedenstein, 1988; Pittenger ve ark., 1999; Abdallah ve Kassem, 2008; Mironov ve ark., 2009; Cesarz ve Tamama, 2015; Santos ve ark., 2015). MKHlerin izolasyonu başta kemik iliği olmak üzere yağ dokusu, göbek bağı ve plasenta gibi bir çok dokudan yapılabilmektedir (Gnecchi ve Melo, 2009; Cesarz ve Tamama, 2015; Santos ve ark.,

2015) - araştırma amaçlı hücre hatları geliştirilmiştir ve bunların "American Type Culture Collections" (ATCC) gibi kaynaklardan sağlanması mümkündür.

Hücre tedavilerinde ve doku mühendisliğinde kullanılan hücreler çok uzun yıllar hücre yapışması ve üremesine izin veren yüzeylerde "2B kültürlerde" (doku kültür kaplarında) hazırlanmıştır. Bunun için optimum koşullar tanımlanmış, çok sayıda protokol geliştirilmiştir. 2B kültürlerde hücrelerin bir katı yüzeyle yapışması, yayılması ve üremesi söz konusudur. Ancak son yıllarda doku rejenerasyonda kullanılacak memeli hücrelerin 2B kültürlerinde üretimlerinin, özellikle kök hücreler durumunda farklılaştırılması ve çoğaltılmalarının iyi bir yaklaşım olup olmadığı konusunda önemli tartışmalar vardır. Buna karşın canlı organizmada olduğu gibi 3B kültürlerde hücreler birbirleriyle ve ekstraselular matriksle temas ederler/etkileşirler - dolayısıyla doğru/hızlı doku oluşturma şansları çok daha yüksektir (Kelm ve ark., 2006; Achilli ve ark., 2012; Sart ve ark., 2014; Laschke ve Menger, 2017a; Laschke ve Menger, 2017b). Çok katmanlı küresel hücre kümeleri "sferoidlerin" olarak da adlandırılır - ilk tanımlanmaları üzerinden çok uzun zaman geçmiştir (Moscona ve Moscona, 1952) - günümüzde yeniden keşfedilmiş, yoğun bir ilgiyle karşılanmış ve birçok uygulamada 2D kültürlerde geliştirilen hücrelerin yerine kullanılmaya başlamıştır (Lin ve Chang, 2008; Hayashi ve Tabata, 2011; Tajima ve Tabata, 2012; Sart ve ark., 2014; Antoni ve ark., 2015; Chatzinikolaidou, 2016; McKee ve Chaudhry, 2017; Laschke ve Menger, 2017a; Laschke ve Menger, 2017b; Yang ve ark., 2020). Çok basit olarak 3B kültürlerde hücreler yapışmayacakları/sevmedikleri bir yüzey bulunan ortamda bir araya getirilip kendiliğinden düzene girmeleri ve kümelenmeleri sağlanır ve böylece 3B yapılar - "sferoidler" oluşturulur. Hücre kümelerinin oluşturulması ve yalnız başlarına veya doku iskeleleri ile birlikte biyohibridler olarak uygulanmaları için ilgili literatürde çok sayıda alternatif yöntem tanımlanmış/rapor edilmiştir (Mironov ve ark., 2009; Park ve ark., 2011; Achilli ve ark., 2012; Bajaj ve ark., 2014; Olsen ve Alexis, 2014; Sart ve ark., 2014; Antoni ve ark., 2015; Cesarz ve Tamama, 2015; Santos ve ark., 2015; Costa ve ark., 2016; Mandryck ve ark., 2016; Cornelissen ve ark., 2017; Laschke ve Menger, 2017a; Laschke ve Menger, 2017b; Mckee ve Chaudhry, 2017; Yang ve ark., 2020).

Sunulan çalışmada da kök hücre kümelerinin oluşturulması/kullanılması söz konusudur - ancak bunlar tam olarak yalnızca hücrelerden oluşan hücre kümeleri - "sferoidler" değildir. Araştırma ortağımız Tabata grubu (Kyoto Üniversitesi, Japonya)

geliştirdiği uzun yıllar çok farklı uygulamalar için kullandığı/kullanmaya devam ettiği oldukça basit bir yaklaşım ile hazırlanan - esas olarak jelatin mikrokürelerin etrafında oluşturulan 3D hücre kümeleridir (Tabata ve ark., 1999a; Tabata ve ark., 1999b; Hori ve ark., 2004; Takahashi ve ark., 2005; Hiraoka ve ark., 2006; Lin ve Chang, 2008; Mohan ve ark., 2009; Narita ve ark., 2009; Kimara ve Tabata, 2010; Bratt-Leal ve ark., 2011; Hayashi ve Tabata, 2011; Baraniak ve ark., 2012; Tajima ve Tabata, 2012; Tajima ve Tabata, 2017; Hirayama ve ark., 2018; Inoo ve ark., 2018; Sulaiman ve ark., 2020). Jelatin ekstraselular matriksin temel bileşeni olan kollajenin denature formudur - bir polipeptiddir - dolayısıyla medikal amaçlı en yaygın olarak kullanılan biyobozunur doğal polimerin başında gelir. Tabata grubununun yaklaşımı ilginçtir - bu yaklaşımda jelatin mikroküreler, hücreler ile kümeleştirerek sferoid benzeri tek bir kütle/yığın olan biyohibrid yapılar elde edilmektedir. Bunlar sferoidlerde olduğu gibi kültür ortamına koyulur ve kültür edilirler. Jelatin mikroküreler kümeleştirilme öncesinde hücre kültür besiyerinde şişirildikleri için - etraflarına biriken ve birbiri ile temas eden hücre kümelerinin çok daha hızlı gelişmesini sağlarlar. Jelatin mikrokürelerin varlığı nedeniyle yüksek kütle transferi söz konusudur, dolayısıyla - özellikle büyük boyutlu sfreoidlerin iç bölümünde ortaya çıkan hücre ölümleri burada çok daha azdır. Jelatin tabakası zamanla biyobozunur - bozunma ürünleri olan peptidler ortaya çıkar ve bunlar da hücre canlılığını ve gelişmesine çok olumlu yönde etkilerler (Groebe ve Mueller-Klieser, 1996; Kelm ve ark., 2006).

### 1.5. Büyüme Faktörleri

Doku onarımında önemli stratejilerden biri de büyüme faktörlerinin ("growth factors") kullanılmasıdır. Büyüme faktörleri hücreler tarafından sentezlenen ve gerektiğinde hücreden dışarı salınan suda çözünen proteinlerdir. Hedef hücre transmembran reseptörlere bağlanıp, hücre migrasyonu, yayılması, gelişmesi ve farklılaşması ve dolayısıyla doku rejenerasyonunda önemli rol alırlar (Nakamura ve ark., 1995; Lind, 1996; Stocum, 1997; Taipale ve Keski-Oja, 1997; Hong ve ark., 2000; Tabata, 2000; Liberman ve ark., 2002; Wenger ve ark., 2004; Young ve ark., 2005; Kelm ve ark., 2006; Kushibiki ve ark., 2006; Rouwkema ve ark., 2006; Tabata, 2006; Esaki ve ark., 2007; Alajati ve ark., 2008; Patel ve ark., 2008a ve 2008b; Tayalia ve Mooney, 2009; Saleh ve ark., 2011; Odabas ve ark., 2013; Inci ve ark., 2014; Sung ve ark., 2014; Li ve ark., 2015; Nguyen ve ark., 2015; Khademhosseini ve Langer, 2016; Laschke ve Menger, 2017a; Laschke ve Menger, 2017b; Turner ve ark., 2017; Wang ve

ark., 2017; Caballero Aguilar ve ark., 2019; Buie ve ark., 2020). Büyüme faktörünün türü, birden fazla kullanıldığında türlerin bağıl miktarları, uygulama miktar ve süreleri, uygulandığı ekstraselüler matrikste hücre davranış/ gelişmesi/farklılaşması dolayısıyla uygulandıkları dokunun rejenerasyonu/onarımında kritik öneme sahip parametreler arasındadır. Özellikle doku mühendisliği/hücresel tedavilerde en yaygın olarak kullanılan büyüme faktörlerinin başında fibroblast büyüme faktörü (FGF), vasküler endotel büyüme faktörleri (VEGF) ve plasental büyüme faktörleri (PIGF) gelir - bunlar anjiyogenez oluşumuna yol açtıkları için birçok dokunun iyileşmesinde kritik role sahiptirler (Yancopoulos ve ark., 2000; Brandi ve Collin-Osdoby, 2006; Fei ve ark., 2013; Martino ve Briquez, 2015; Wang ve ark., 2017; Caballero Aguilar ve ark., 2019; Buie ve ark., 2020). Kemik morfojenik proteinler (BMP) - özellikle BMP2, BMP4 ve BMP7, transforming büyüme faktörü (TGF-β), insülin-benzeri büyüme faktörleri (IGF) çok yaygın olarak kullanılan osteogenik proteinlerdir, kemik oluşumunu uyarırlar ve kök hücrelerin kemik hücrelerine farklılaşmalarını yönlendirir ve dolayısıyla kemik onarımına önemli katkı sağlarlar (Kirker-Head, 2000; Seeherman ve Wozney, 2005; Ripamonti, 2006; Fisher ve ark., 2011; Wang ve ark., 2017). Platelet (trombosit) kaynaklı büyüme faktörleri-BB (PDGF-BB) periodontal doku oluşumu ve osteoblast öncüleri ve kök hücrelerin oluşum ve çalışmasını yönlendirirler (Hollinger, 2008; Fei ve ark., 2013).

bFGF ("basic Fibroblast Growth Factor") en yaygın, başarılı uygulamaları olan ve klinik uygulama seviyesine gelmiş en önemli büyüme faktörleri arasında ilk sıralarda yer alır - FGF'ler ile ilgili ayrıntılı bilgiyi ilgili makalelerde/derlemelerde bulmak mümkündür (Broadley ve ark., 1989; Werner ve ark., 1994; Ortega ve ark., 1998; Kawai ve ark., 2000; Jameson ve ark., 2002; Rosenblatt-Velin ve ark., 2005; Numata ve ark., 2006; Takehara ve ark., 2008; Yun ve ark., 2010; Garbern ve ark., 2011; Tassi ve ark., 2011; Wietecha ve ark., 2011; Meyer ve ark., 2012; Gay ve ark., 2013; Oladipupo ve ark., 2014; Nunes ve ark., 2016; Zhang ve Lui, 2016; Maddaluno ve ark., 2017).

FGF esasen bir protein ailesidir - ilk kez 1975'de saflaştırılmış/tanımlanmıştır (Gospodarowicz ve ark., 1987; Burgess ve Maciag, 1989; Rifkin ve Moscatlli, 1989; Florkiewicz ve ark., 1991). Diğer aile üyeleri gibi bFGF, embriyonik gelişim, hücre büyümesi, motfojenez, doku onarım, vb. gibi birçok mitojenik ve hücre yaşam aktivitesinde kritik rol alır.

Büyüme faktörlerinin en önemli sınırlaması uygulamada oldukça kısa yarı ömürleri, düşük protein satabilitesi ve vücut sıcaklığında enzimler tarafından hızla deaktive edilmeleridir. Örneğin bu tez çalışmasında da yer alan bFGF in intravenöz enjeksiyondan sonra yarı ömrü yalnızca 3 dakikadır (Edelman ve ark., 1993) - VEGF de bu çok daha uzundur yaklaşık 50 dakikadır (Lazarous ve ark., 1996). Yeteri kadar dozda büyüme faktörü doğrudan enjeksiyonla verildiğinde bu ani yükleme önemi yan etkilere yol açabilir. BMP-2 nin klinik dozda yüklendiğinde lumbar spinal artrodesise neden olduğu ve kanser oluşumuna yol açabileceği not edilmiştir (Carragee ve ark., 2013). Kardiovasküler ve peripheral uygulamalarda VEGF'in ödem oluşumu ve sistemik hipotansiyonu tetiklediği rapor edilmiştir (Simona ve Ware, 2003). Bu kritik sınırlayıcı etkiler araştırmacıları kontrollü salım sistemlerine yönlendirmiştir - burada söz konusu olan büyüme faktörlerini bir taşıyıcı matrikse yerleştirmek ve istenilen dozu istenilen sürede salmasını sağlamaktır. Bu yeni bir olgu değildir - çok uzun yıllardır çevre koşullarına duyarlı (hızla aktivite kaybeden) ve özellikle kullanımda yan etkileri olan birçok aktif ajan (başta ilaçlar olmak üzere) kontrollü salım sistemlerine yerleştirilerek istenilen salım kinetiği ile uygulanmaları sağlanmıştır.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların başlangıç bölümünün yapıldığı Kyoto Üniversitesi, Tabata grubu taşıyıcı olarak başta mikroküreler olmak üzere farklı formlarda biyobozunur jelatin hidrojeller matriksler hazırlamış ve çeşitli büyüme faktörlerinin - örneğin temel fibroblastik büyüme faktörü (bFGF), transforming büyüme faktörü (TGF)-β1, hepatosit büyüme faktörü (HGF), kemik morfojenik protein (BMP)-2, vb. *in vitro* ve uygulamaya göre uygun hayvan modellerinde *in vivo* salımlarını incelemiş ve başarılı sonuçlar almışlardır - (Tabata ve ark., 1994; Tabata ve Ikada, 1999). Özellikle jelatin matrikslerin bFGF salımında kullanımı ile ilgili çok sayıda kaynak bulmak mümkündür (Tabata ve ark., 1994; Tabata ve ark., 1998a; Ikada ve Tabata, 1998; Tabata ve ark., 1998b; Tabata ve ark., 1999a; Tabata ve ark., 1999c; Tabata ve ark., 1999d; Tabata ve Ikada, 1999; Tabata ve ark., 2000b; Iwakura ve ark., 2001; Iwakura ve ark., 2003; Kimura ve ark., 2002; Kimura ve ark., 2003; Saso ve ark., 2003; Nakajima ve ark., 2004; Okamoto, T., 2004; Rosenblatt-Velin ve ark., 2005; Hiraoka ve ark., 2006; Igai ve ark., 2006; Doi ve ark., 2007; Akagawa ve ark., 2008; Ichinohe ve ark., 2008; Takehara ve ark., 2008; Zhu ve ark., 2008; Watanabe ve ark.,

2010; Garbern ve ark., 2011; Kumagai ve ark., 2016; Turner ve ark., 2017; Kumagai ve ark., 2018; Li ve ark., 2018; Washio ve ark., 2019).

Sunulan tez kapsamı oluşturulurken taşıyıcı matriks olarak jelatin seçilmesinin önemli nedenleri vardır. Önceki bölümlerde söz edildiği gibi diyabetlerde önemli sorunların biri de kan dolaşımında ortaya çıkan vaskülarizasyonun azalmasıdır. DFI'da yaralı bölgede yetersiz mikrokapiler - kan dolaşımı yaranın iyileşmesinde önemli "negatif" rol aldığı ifade edilebilir. Ayrıca, belki bunun kadar önemli bir olumsuz durumda kollajen ekspresyonundaki azalma - kollajen çapraz bağlanması, vb. dir. Sunulan tezin temel hedeflerinden biri olan önemli doku kayıpları ile seyreden yara iyileşmesinde (DFI örneğinde olduğu gibi) özellikle bFGF kullanarak hem hücre proliferasyonunun hem de "anjiyogenez" sağlamak amacıyla biyobozunur jelatin mikroküre lere yükleme ve kontrollü salımı incelenmiştir (Hori ve ark., 2004; Rosenblatt-Velin ve ark., 2005; Takehara ve ark., 2008; Garbern ve ark., 2011).

# 2. MATERYAL VE METOD

## 2.1. Bakteri ve Bakteriyofajlar

Bu tez kapsamında, genel hijyen ve kişi/çevre sağlığı/emniyeti dikkate alınarak model bakteri *Escherichia coli (E. coli)* nin biyogüvenlik seviyesi 1 olan patojenik olmayan özel suşu (ATCC®, 11303™, Manassa, VA, ABD) satın alma yoluyla temin edilip kullanılmıştır. Bu bakteri suşunu özgün olarak tanıyan/etkileşen - sunulan tezin temel elemanlarından/çıktılarından biri olan T4 bakteriyofajı aynı kaynaktan temin edilmiştir (ATCC®, 11303-B4™). Özgünlük testlerinde kullanılmak üzere *E. coli* ile etkileşmeyen/enfekte etmeyen - kontrol/çapraz bakteriyofaj olarak *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bakteriyofajı (ATCC®, 27692-B1™) de satın alınmış/kullanılmıştır. Bakteri ve bakteriyofaj çoğaltılması/saflaştırılması/karakterizasyonu/saklanması için ATCC® kataloglarından tanımlanan ve alternatif olarak ilgili literatürde verilen - aşağıda iki farklı alt başlıkta açıklanan - yöntemler/protokollar uygulanmıştır. Tez kapsamında bakteri ve bakteriyofaj çoğaltılması için Luria-Bertani (LB) besiyeri ("broth") kullanılmıştır. LB besiyeri 25 g toz LB nin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) 1 litre distile suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Ayrıca şu iki farklı bileşimde agar içeren LB-agar ortamı hazırlanmış ve sonraki bölümde tanımlanan farklı işlemlerde kullanılmıştır: Düşük agarlı LB besiyeri ("yumuşak agar besiyeri" - "soft agar") bir litresinde 7,5 g agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) içerirken yüksek yüzdede olanda ("katı agar besiyeri" - "solid agar") 15 g agar vardır.

### 2.1.1. Bakterilerin Çoğaltılması

Tez kapsamında kullanılan bakteri - *E. coli*'nin öncelikle Luria-Bertani (LB) besiyerinde ("broth") da büyüme davranışı incelenmiş ve 37°C'de büyüme eğrisi hazırlanmıştır (Sezonov ve ark., 2007; Moghtader ve ark., 2016, Moghtader ve ark., 2017, Moghtader ve ark., 2018). Büyüme eğrisinin bulunması için gece boyu LB sıvı besiyerinde kültür edilen bakteri kültürü seyretilmiş, taze LB besi yeri ilave edilmiş ve bir çalkalamalı inkibatörde (Taitec Corporation, Bio-shaker, BR-30, Saitama, Japonya) 200 rpm hızla çalkanarak 37°C'de kültür edilmiştir. Farklı zamanlarda ortamdan alınan örnekler spektrofotometre küvetine konmuş ve optik yoğunlukları ("optical density" - OD) bir spektrofotometrede (Olympus, Tokyo, Japonya) 600 nm'de ölçülmüştür. $OD_{600}$ değerleri zamana karşı grafiğe geçirilerek büyüme eğrisi hazırlanmış ve üstel büyümede

yatışkın durum - eğrinin doğrusal olduğu bölüm ve bunun yaklaşık üst sınır incelenmiş/ belirlenmiştir.

Sunulan tez kapsamında değerlendirilen T4 bakteriyofajı bu *E. coli* suşuna özgündür ve çoğaltılmasında kullanılacak bakterinin istenilen konsantrasyonda aktif (genç ve canlı) olması bakteriyofajın üretim verimini (ulaşılan bakteriyofaj konsantrasyonunu) önemli oranda etkilediği not edilmelidir. Kullanım öncesi taze bakteri hazırlanmasına bir gün önceden başlanmış - yukarıda belirtilen şekilde stoktan alınan bakteri LB besiyerinde 200 rpm karıştırmada ve 37°C'de çoğaltılmış, $OD_{600}$ değeri yaklaşık 0,5 olana kadar bakteri kültürlerine devam edilmiştir. İstenilen OD değerine ulaşılınca bakteri kültür ortamı 15 ml lik steril santrifüj tüplerine aktarılmış ve bir masa üstü santrifüj cihazı ile 4000 g de 5 dak santrifüj edilmiş ve oluşan çökelti (bakteri peleti) ayrılmıştır. Peletler 3-4 kez tekrarlanan süspanse/santrifüj etme işlemleri ile steril bir şekilde yıkanmış ve steril PBS de (pH:7,2) süspanse edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Bakteri süspansiyonlarındaki bakteri konsantrasyonlarının bulunması için şu yöntem uygulanmıştır: Bakteri süspansiyonu 1:10 luk ard arda seyreltmelerle bir seri farklı konsantrasyonda bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Yumuşak agar LB besiyeri sıcak su banyosunda eritilmiş ve 45°C'ye soğutulduktan sonra petrilere yaklaşık 10-15 ml besiyeri konulmuş ve agar tam sertleşmeden üzerlerine farklı seyrelme faktörlerinde bakteri süspansiyonlarından 0,1 ml koyulmuş, steril L-şeklinde dağıtıcı ile yüzeye homojen olarak yayılmış, petrilerin kapakları kapatılmış ve katılaşma olunca ters olarak döndürüldükten sonra 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında petriler üzerindeki bakteri kolonileri sayılmıştır. Sayımlarda 30-300 koloni olan petrilerde sayımı geerçekleştirilmiş, daha az veya fazla olanlar değerlendirmeye alınmamıştır. Her seyreltmeden en az üçer petri kabına ekim yapılarak bulunan koloni sayılarından aşağıdaki formülle birim hacimdeki (ml) bakteri kolini sayıları - "mililitrede koloni oluşturma ünitesi" ("Colony Forming Units"/ml - CFU/ml) olarak aşağıdaki formülle hesaplanmıştır. Burada CFU/ml: 1 ml orjinal bakteri süspansiyonundaki koloni oluşturan bakteri sayısı - bakteri konsantrasyonu; N: koloni sayısı; SF: Seyrelme faktörü; ve V: ml olarak petri kabına konulan bakteri süspansiyonu hacmidir.

$$CFU/ml = N_k \times 1/SF \times 1/V \qquad (2.1)$$

Yaklaşık $10^8$ CFU/ml konsantrasyonunda olanlar aşağıdaki bölümde verilen bakteriyofaj çoğaltılma basamağında kullanılmıştır. Kısa süreli saklamada bakteriler 1 ay süre ile 4°C'de bekletilmiş ve kullanımdan bir gün önce besiyerinde - süspansiyonda veya agar katkılı katı/yarıkatı besiyeri konmuş petrilerde 18 saat kültür edilip edilip taze olarak hazırlanmış ve ertesi gün kullanılmıştır. Uzun süreli saklamalarda hazırlanan besiyerinde (LB) son konsantrasyonu hacımca %20-50 olacak şekilde gliserin ilavesi yapılmış ve -80°C'de depolanmıştır.

### 2.1.2. Bakteriyofajların Çoğaltılması

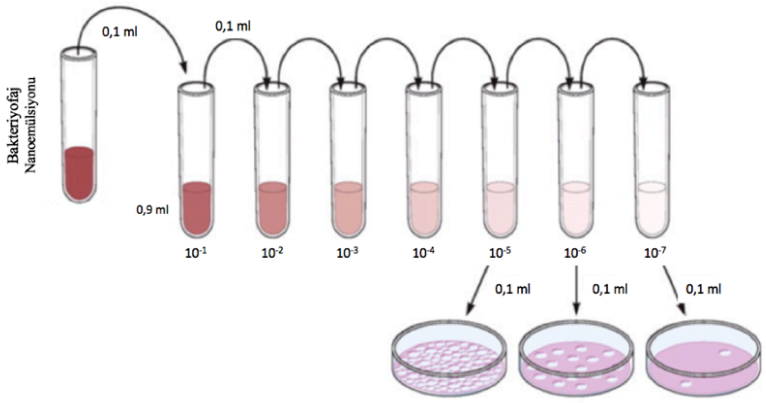
Sunulan tez kapsamında kullanılan T4 bakteriyofajı seçilen/önceki bölümde çoğaltılması açıklanan *E. coli* suşu için özgün bir fajdır - tez kapsamında ilgili literatürde de belirtilen şu protokol ile çoğaltılmıştır (Adams, 1959, Bonilla ve ark., 2016, Clokie ve Kropinski 2009, Gill ve Hyman 2018, Manohar ve ark., 2018, Moghtader ve ark., 2017, Moghtader ve ark., 2018, Zhang ve ark., 2018): Gece boyu 37°C'de LB besi yerinde inkübe edilmiş/çoğaltılmış taze *E. coli* kullanılmıştır. 100 µl'lik bakteri süspansiyonu (yaklaşık $10^8$ CFU/ml konsantrasyonunda) ve 4°C'de stoğundan alınan bakteriyofaj emülsiyonu (yaklaşık $10^8$ PFU/ml konsantrasyonunda) steril tüblerde bir vorteks kullanılarak hızla/homojen olarak karıştırılmış, oda sıcaklığında 15 dak inkübe edilmiş ve 0,001 M olacak şekilde $CaCl_2$ ve $MgCl_2$ şekilde - kalsiyum ve magnezyumla desteklenmiş/ilave edilmiş LB besiyeri bulunan 20 ml lik tüplere aktarılmıştır. Bu tüpler çalkalamalı inkübatörde 37°C de 200 rpm çalkalama hızında 6 saat inkübe edilmiştir. Çoğaltılan bakteriyofajların bakteri atıklarından/ kalıntılarından arındırılması için, saflaştırma basamağında ortam önce 0,22 µm filtreden steril koşullarda ultrafiltre edilmiş daha sonra 4°C'de 13.600 g - yaklaşık 20-30 dak santrifüj edilerek bakteriyofajlar çöktürülmüş/ayrılmış ve steril PBS (pH.7,2) veya SM (%0,1 jelatin, 100 mM NaCl, 8 mM $MgSO_4$, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) tamponunda emülsifiye edilerek son ürün elde edilmiştir. Bakteriyofajlar uzun süreli depolanacakları zaman SM tamponuna aktarılmıştır. Sıvı faz gliserin ile desteklenmiş -80°C' depolanmıştır.

Bakteriyofaj konsantrasyonu "Plak Oluşturma Ünitesi" olarak ("Plaque Forming Unit") (PFU/ml) "Plaque Assay" yöntemi ile bulunmuştur (Clokie ve Kropinski 2009; Kropinski ve ark., 2009; Mazzocco ve ark., 2009, Panec ve Katz, 2013; Bonilla ve ark., 2016; Freddy ve ark., 2017; Gill ve Hyman, 2018, Gutiérrez ve ark., 2018; Manohar ve

ark., 2018, Plaque assay, 2018). Şekil 2.1'de şematik olarak tanımlanan protokol şöyledir: Önceki bölümde açıklanan yöntemle hazırlanan bakteriyofaj nanoemülsiyonundan, ard arda yapılan 1:10 luk seyreltmeler ile farklı konsantrasyonlarda bir seri nanoemülsiyon hazırlanmıştır. Her nanoemülsiyondan 0,1 ml alınmış steril koşullarda 0,4 ml hedef bakteri süspansiyonu (*E. coli* - $10^8$ CFU/ml konsantrasyonunda) ile karıştırılmış ve yumuşak LB-agar besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Liz olan/parçalanan bakterilerin petride şeffaf plaklar olarak gözükmektedir - bunlar sayılmış ve aşağıdaki formülle konsantrasyonlar (PFU/ml olarak) belirlenmiştir. Plakların sayısının 30-300 arası olmasına dikkat edilmiş daha az veya daha çok olan petri kapları değerlendirmeye alınmamıştır. Aynı bakteriyofaj konsantrasyon için en az üç tekrar deney yapılmıştır. Bulunan değerlerin ortalaması alınıp orjinal bakteriyofaj nanoemülsiyonunda konsantrasyon PFU/ml olarak ifade edilmiştir. Burada PFU/ml: 1 ml orjinal bakteriyofaj emülsiyonunda plak oluşturan bakteriyofaj sayısı - bakteriyofaj konsantrasyonu; $N_p$: petrideki toplam plak sayısı; SF: Seyrelme faktörü; ve V: ml olarak petri kabına konulan bakteriyofaj emülsiyonunun hacmi dir.

$$PFU/ml = N_p \times 1/SF \times 1/V \quad (2.2)$$

Çoğaltılan T4 fajlarının aktivitesi ve özgünlüğünü göstermek üzere bakteri agar üstü kültür testleri ("agar overlay test") yapılmıştır (Gratia, 1936; Hockett ve Baltrus 2017; Panec ve Katz 2013). Standard petri kaplarına konan yumuşak LB-agar besiyeri veya önce katı agar besiyeri üzerine ikinci bir tabaka olarak konmuş yumuşak LB-agar besiyeri üzerine bakteri homojen olarak yayılmış, 37°C'de inkübe edilip tüm yüzeyin turbid bir bakteri tabakası ile kaplanması sağlanmıştır. Bakteri tabakası üzerine belli uzaklıklar ile belli yerlere bakteriyofaj emülsiyonu damlatılmış ve şeffaf bölgelerin/ dairelerin oluşması için beklenmiştir. T4 fajı tezde kullanılan *E. coli* ye özgün olduğu için damlatıldığı bölgede şeffaf bir bölge/daire oluşumu beklenmektedir. Deneylerde *E. coli*' ye etkin olmayan *Staphylococcus aureus* 'a özgün bakteriyofaj kontrol olarak kullanılmıştır - burada bu fajın *E. coli* ile etkileşmediği/enfekte etmediği için beklendiği gibi turbid bakteri tabakasında herhangi bir şeffaf zon oluşmaması gerekir - not edilmelidir.




**Şekil 2.1: Tez kapsamında uygulanan "Plaque Assay" yönteminin şematik tanımı. İlgili kaynaktan uyarlanmıştır (Plaque assay, 2018)**

T4 bakteriyofajının süspansiyonda *E. coli* üzerindeki etkinliğini göstermek için iki şişeye 100 ml besiyeri ve 100 µl bakteriyofaj ($10^8$ PFU/ml ) ve şişelerden birine 10 ml diğerine bunun yarısı kadar - 5 ml *E. coli* süspansiyonu ($10^8$ CFU/ml) konmuş, oda sıcaklığında 7 saat inkübe edilmiş ve sıvı fazda değişimler kamera ile görüntülenmiştir.

## 2.2. Jelatin Mikroküreler

### 2.2.1. Jelatin Mikrokürelerin Hazırlanması

Sunulan tez kapsamında bakteriyofaj ve kök hücre taşıyıcısı olarak - biyomedikal alanda en yaygın olarak kullanılan - vücudumuzda bir çok dokuda bulunan kollajenin denature formu jelatin den mikroküre formunda hidrojellerin üretimi ve kullanılması öngörülmüştür. Jelatin mikrokürelerin üretilmesi ile ilgili çalışmaların bir bölümü/ başlangıç bölümü, Kyoto Üniversitesi, Prof. Tabata grubunun laboratuvarlarında, onun yönlendirmesi ile, grubunun önceki çalışmalarında/ yayınlarında yer alan iki adımlı protokollar ile gerçekleştirilmiştir (Tabata ve Ikada, 1989; Olde Damink ve ark., 1995; Tabata ve ark., 1999; Ozeki ve Tabata, 2005; Takahashi ve ark., 2005; Yamamoto ve Tabata, 2005; Takahashi ve ark., 2007; Hayashi ve Tabata, 2011; Tajima ve Tabata, 2013; Tajima ve Tabata, 2017). Üretimde Nitta Gelatin firmasından (Osaka, Japonya) temin edilen şu iki tür jelatin kullanılmıştır: (i) ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı yaklaşık 100.000 ve izoelektrik noktası (IEP) 9,0 olan - asidik proses ile doğal dokudan izole edilen/hazırlanan "bazik doğal jelatin"; ve

(ii) ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı yaklaşık 100.000 ve IEP'si 5,0 olan alkalin proses ile izole edilen "asidik doğal jelatin".

Kullanılan jelatin yüzdesi mikroküre özelliklerini değiştirir (Tabakata ve Ikada, 1998), ancak Tabata grubun önceki deneyimleri ışığında istenilen özelliklerin sağlanabilmesi için jelatin mikrokürelerin hazırlanmasında jelatinin %10'luk çözeltisi ile başlanmıştır. 20 ml lik jelatin çözeltileri önce 40°C'ye ısıtılmış, mekanik olarak 480 rpm'de karıştırılan 600 ml özel zeytin yağına (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Wakayama, Japonya) damla damla ilave edilmiş ve 200 rpm de 10 dak karıştırılarak dağıtılmış edilmiştir. Elde edilen dispersiyon 4°C'e soğutulmuş, soğuk aseton ilave edilmiş ve jelasyon için karıştırmaya 1 saat devam edilmiş ve "çapraz bağlı olmayan" mikroküreler üretilmiştir. Jelatin mikroküre üretiminde kullanılan rektör fotoğrafı Şekil 2.2'de verilmiştir. Mikroküreler 3 kez tekrarlanan işlem ile 5000 rpm'de, 4°C ve 5 dak santrifüjlenerek yıkanmış, yağ kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminde soğuk asetonda ve isopropanol kullanılmıştır. Mikroküreler esas olarak açıklıkları 20, 32 ve 53 µm olan elekler ile (Seisakusyo Ltd, Osaka, Japonya) elenmiş ve daha dar boy dağılımında fraksiyonlara ayrılmış ve kurutulmuşdur. Uzun süreli saklamalarda dondurarak kurutma protokolu uygulanmıştır. Çalışmanın bundan sonraki bölümlerinde kuru boyutları 32-53 µm aralığında olan jelatin mikrokürelerin kullanılmıştır.



**Şekil 2.2: Jelatin mikrokürelerin üretiminde kullanılan reaktör sistemi**

İkinci basamakta üretilen jelatin mikrokürelerin çapraz bağlanması gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda çapraz bağlanma ajanı GA'nın sulu çözeltiler hazırlanmış ve kuru "çapraz bağlı olmayan" jelatin mikroküreler bu

çözeltilerde şişirilmiş (tüm sıvı fazı içine çekecek oranda kullanılarak) ve 4°C'de 12 saat inkübe edilerek kimyasal çapraz bağlanma sağlanmıştır. Farklı çapraz bağlanma derecelerine ulaşabilmek için birim jelatin mikroküre (mg) başına kullanılan GA miktarı (mg olarak) üç farklı oranda değiştirilmiştir (0,05; 0,10 ve 0,20 mg/mg). İnkübasyon süresi sonrası, olası tepkimeye girmeyen aldehit grupları 0.1 M glisin çözeltisi ilave edilip 37°C'de 1 saat etkileştirilerek pasivasyon yapılmıştır. Saf su ile yıkanan ve santrifüjlenen mikrokürelerden iri parçalar elenerek uzaklaştırılmış ve çapraz bağlı jelatin mikroküreler havada kurutulmuşlardır. Uzun süreli saklamalar için dondurularak kurutma uygulanmıştır.

### 2.2.2. Jelatin Mikrokürelerin Su Absorpsiyonu/Şişmesi

Çapraz bağlı jelatin mikroküreler, çapraz bağ yoğunluğuna bağlı olarak farklı miktarlarda su absorblayarak şişmekte ve jelatin "hidrojel" mikroküreler oluşmaktadır. Yukarıda belirtilen yöntemle farklı oranlarda çapraz bağlanan ve kurutulan mikroküreler suda 37°C'de 24 saat bekletilerek şişme dengesine ulaşmaları sağlanmıştır. Kuru ve denge şişme değerlerinde suda şişmiş formlarının ağırlıkları - sırasıyla $M_{kuru}$ ve $M_{şişmiş}$ - ölçülerek "Su Alma Yüzdeleri" (SAY) - aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$SAY\ (\%) = \{M_{şişmiş} - M_{kuru} / M_{şişmiş}\} \times 100 \qquad (2.3)$$

Mikrokürelerin şişmiş durumdaki ortalama çap ve boy dağılımlarının bulunması için mikrokürelerin bir optik mikroskopla (Olympus, Tokyo, Japonya) görüntüleri alınmış ve yaklaşık 100 hidrojel mikrokürenin şişmiş durumdaki görüntüleri kullanılarak mikroskop yazılım (Image J, NIH, Bethesda, ABD) ile ortalama çap ve standart sapma değerleri bulunmuştur.

### 2.2.3. Jelatin Mikrokürelerin Degredasyonu

Tez kapsamında jelatin mikrokürelerin asidik hidrolizi ve *in vitro* enzimatik degredasyonu incelenmiştir. Asidik hidroliz, ilgili kaynaklarda tanımlanan protokollere uygun olarak şöyle yapılmıştır (Tabata ve ark., 1999; Ozeki ve Tabata, 2005; Tajima ve Tabata, 2013; Tajima ve Tabata, 2017; Hirayama ve ark., 2018): 1 mg kuru çapraz bağlı jelatin mikroküler, yaklaşık 1 ml 2M HCl bulunan tüplere ilave edilmiş 37ºC inkübe edilmiş, degredasyon 10 saat süresince belli zaman aralıklarında (30 dak, 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 saat) alınan örneklerde izlenmiştir. Belli aralıklar ile tüpler 37ºC'de 5000 rpm de 5 dak santrifüjlenmiş, 200 µl supernatant alınmış bunun yerine tüpe, 200 µl 2M HCl ilave

edilmiş ve degredasyona devam edilmiştir. Alınan 200 µl supernatantın absorbansı bir UV spektrofotometre de (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, İngiltere) 260 nm de ölçülmüştür. Bunun için başlangıçta, herhangibir bir sürede ve tam hidroliz durumunda ölçülen absorbans değerleri kullanılarak - bağıl kalan kütle değerleri yüzde olarak hesaplanmış ve zamana karşı grafiğe geçirilerek kütle kayıp/degredasyon kinetikleri grafiksel olarak sunulmuştur.

Enzimatik degredasyon için kollajenaz enzimi (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Bunun için 1 mg kuru mikroküre örneği 1 ml magnezyum/kalsiyum içeren 0.1 mg kollajenaz eklenmiş enzim çözeltisi ile 37ºC'de inkübe edilmiştir. Belli zaman aralıkları (30 dak, 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 saat) sıvı fazdan alınmış 200 µl supernatant alınmış bunun yerine tüpe, 200 µl stok enzim çözeltisi ilave edilmiş ilave edilmiş ve degredasyona devam edilmiştir. Alınan 200 µl supernatant 8000 rpm de 10 dak santrifüj edilmiş ve çökeltide jelatin miktarı "ninhidrin" yöntemiyle belirlenmiştir (McGrath 1972; Tabata ve Ikada 1999; Tabata ve ark., 1999; Ozeki ve Tabata 2005). Uygulanan ninhidrin yöntemi şöyledir: Yaklaşık 100 µg çökelti 200 µl suda süspanse edilmiş ve 100 mg $Ba(OH)_2.8H_2O$ (Sigma-Aldrich, ABD) ile 120ºC'de yaklaşık 10 dak inkübe edilerek hidroliz edilmiştir. Dekantasyon da ayrılan supernatant pH'ı %10'luk trikloroasetik asit (Sigma-Aldrich, ABD) ile 5,1'e getirilmiş ve yaklaşık 1 ml %2'lik ninhidrin'in (Sigma-Aldrich, ABD) yaklaşık 100ºC'de 5-10 dak etkileştirilerek kompleks oluşumu sağlanmış - oluşan mavi-mor renk şiddeti (absorbanslar/OD değeri) 570 nm'de ölçülmüştür.

Belli zaman aralıklarla enzimatik degredasyon ürünlerinin analizi/absorbans değerleri ve kullanılan mikrokürelerin tamamının hidroliz olduğu durumda ölçülen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan zaman karşı kalan kütle değerleri grafiğe geçirilerek enzimatik degredasyon kinetikleri grafiksel olarak sunulmuştur. Farklı derecelerde çapraz bağlanmış mikrokürelerin 2 saat enzimatik degredasyon sonunda degredasyon miktarları (kalan mikroküre kütlesi) bar grafikler olarak sunulmuştur.

### 2.2.4. Jelatin Mikrokürelere Bakteriyofaj Yüklemesi ve Salımı

Sunulan tez kapsamında - önceki bölümde açıklanan yöntemler ile üretilen ve karakterize edilen şu özelliklerdeki jelatin mikroküreler kullanılmıştır: IEP si 9,0 olan bazik doğal jelatinden %10 konsantrasyonu ile başlanıp üretilen - mikroküre boy aralığı:

32-53 μm olan; üç farklı GA/jelatin oranında (0,05, 0,10 ve 0,20 mg/mg) GA kullanılarak çapraz bağlanma gerçekleştirilmiş jelatin mikroküreler.

Yukarıda hazırlanmaları ayrıntılı olarak açıklanan çapraz bağlı jelatin hidrojel mikrokürelere bakteriyofaj yüklenmesi - Tabata grubunun birçok aktif ajanın jelatin mükrokürelere yüklenmesi için kullandıkları şu basit protokol ile gerçekleştirilmiştir. (Tabata ve ark., 1999, Ozeki ve Tabata, 2005, Tajima ve Tabata, 2013, Tajima ve Tabata, 2017; Hirayama ve ark., 2018): 2 mg çapraz bağlı kuru jelatin mikroküre bulunan tüplere of $10^8$ PFU/ml konsantrasyonunda bakteriyofaj nanoemülsiyonu ilave edilmiş ve 37°C'de 1 saat bekletilmiştir. Yükleme sırasında kuru jelatin mikroküreler ortamdaki tüm sıvı fazı içlerine çekmektedir - bu mikrokürelere %100 yükleme verimi demektir - önemle not edilmelidir.

Bu bölümde önceki basamakta jelatin mikrokürelere yüklenen bakteriyofajların sulu ortamda salım hızları incelenmiştir. Bunun için 200 mg taze hazırlanmış bakteriyofaj yüklenmiş jelatin mikroküreler 50 ml PBS tamponu (pH: 7,4) konulmuş ve 24 saat yavaşça çalkalanmıştır. Bu zaman aralıkları ile ortamdan 100 μl supernatant çekilmiş - yerine 100 μl taze PBS tampon konmuş ve salıma devam edilmiştir. Alınan 100 μl supernatant'da salınan bakteriyofajlar "plaque assay" ile belirlenmiştir. Belli süre de salınan faj miktarı başlangıçta yüklenene bölünüp 100 ile çarpılarak yüzde salım değerleri hesaplanmış ve salım eğrileri grafiksel olarak sunulmuştur. Ayrıca farklı derecelerde çapraz bağlanmış mikrokürelerden 6 saat salım süresi sonunda salınan faj yüzdeleri bar grafikler olarak sunulmuştur.

### 2.2.5. Jelatin Mikrokürelere bFGF Yüklemesi ve Salımı

Bu gruptaki çalışmalarda biyoaktif molekül olarak temel fibroblast büyüme faktörü ("Basic Fibroblast Growth Factor"- bFGF, Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır - molekül ağırlığı 16 kDa ve IEP si yaklaşık 9,6 dır.

bFGF molekülleri ABCAM fluoresein 5-izosiyanat konjugasyon kiti kullanılarak ilgili firmanın tanımladığı protokol ile floresan etiketlenmiştir (FITC, Conjugation Kit - Lightning-Link®, ABCAM, ab102884, Cambridge, MA, ABD). 100 μg bFGF için 100 μg FITC kullanılmıştır. Bunun için firmanın brosüründe tanımlanan şu protokol uygulanmıştır: Her 10 μl bFGF çözeltisine 1 μl modifikasyon ajanı ilave edilip nazik bir şekilde karıştırılmıştır. Bu karışım pipetle çekilerek FITC konjugasyon karışımı (liyofilize materyal) bulunan viale ilave edilmiştir. Liyofilize materyal 2 kez ard arda uygulanan süspanse etme/pipetleme ile çözünür hale getirilmiş ve kapağı

kapatılan vial karanlıkta, oda sıcaklığında (20-25°C) üç saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her 10 µl bFGF çözeltisi için 1 µl söndürücü ajan ("quencher") ilave edilip nazikçe karıştırılmıştır. 30 dak sonra FITC işaretli bFGF kullanıma hazır hale gelmiştir - herhangi bir saflaştırmaya gerek kalmamıştır. FITC-etiketli bFGF 4°C'de karanlıkta saklanmıştır. FITC'nin uyarma ("excitation") ve emisyon ("emission") maksimum dalga boyları sırayla 494 nm and 519 nm dir.

Sunulan tez kapsamında - önceki bölümde açıklanan yöntemler ile üretilen ve karakterize edilen şu özelliklerdeki jelatin mikroküreler kullanılmıştır: (i) Bakteriyofaj yükleme ve salım çalışmalarında da kullanılan IEP si 9,0 olan bazik doğal jelatinden %10 konsantrasyonu ile başlanıp üretilen - kuru mikroküre boy aralığı: 32-53 µm olan; GA ile kimyasal yöntemle çapraz bağlanmış (üç farklı GA/jelatin oranında (0,05, 0,10 ve 0,20 mg/mg) GA kullanılarak çapraz bağlanma gerçekleştirilmiş jelatin mikroküreler - ileriki ilgili bölümlerde kolaylık sağlamak üzere bu üç farklı mikroküre sırasıyla JM1, JM2 ve JM3 kısa sembolleri ile tanımlanmıştır; ve (ii) bakteriyofaj yükleme ve salım çalışmalarından farklı olarak burada IEP si 5,0 olan asidik doğal jelatinden %10 konsantrasyonu ile başlanıp üretilen - mikroküre boy aralığı: 32-53 µm olan; GA ile kimyasal yöntemle çapraz bağlanmış (GA/jelatin oranı: 0,10 mg/mg ve çapraz bağlama süresi: 12 saat) jelatin mikroküreler de kullanılmıştır - bu mikroküreler "JM4" sembolü ile tanımlanmıştır.

Jelatin mikrokürelere bFGF yükleme, önceki bölümde de tanımlanan bakteriyofaj yüklemesine benzer olarak - Tabata grubunun yayınlarında yer alan deney protokolü izlenerek gerçekleştirilmiştir (Tabata ve Ikada, 1998; Yamamoto ve ark., 1998; Kawai ve ark., 2000; Hori ve ark., 2004). bFGF yüklemek için, çapraz bağlı kurutulmuş jelatin mikrokürlerden her 10 mg için 100 µg FITC-etiketli bFGF içeren PBS'deki (pH: 7,4) çözeltisi konmuş ve mikrokürelerin çözeltiyi tamamen emip, şişerek bFGF moleküllerini absorblaması - bFGF'in tamamının mikrokürelere yüklenmesi sağlanmıştır (1 saat). Bu işlem 4ºC'de karanlıkta gerçekleştirilmiştir.

Jelatin mikrokürelerden FITC-etiketli bFGF salımı PBS'de (pH: 7,4), 37°C'de su banyosunda, yavaş çalkalamada, karanlıkta 48 saat izlenmiştir. Belli zaman aralıklarıyla salım ortamından alınan örneklerden santrifüjle ayrılan süpernatantta salınan bFGF'in analizi florometrik analiz bir floresans spekrometrede (Perkin Elmer® Inc., Waltham, MA, ABD) floresans şiddeti ölçülerek izlenmiştir.

## 2.3. Mezenkimal Kök Hücreler ve Hücre Kümeleri

### 2.3.1. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

Sunulan tez kapsamında kök hücre izolasyonu için denek hayvanı olarak 6 adet 7 haftalık dişi fareler - C57BL6/n (Shimizu Laboratory Supplies, Kyoto, Japonya) kullanılmıştır. Uygulanan tüm işlemler Kyoto Üniversitesi, "Frontier Medical Sciences" Enstitüsü (Japonya) ilgili hayvan etik kurallarına/kılavuzlarına uyularak yapılmıştır. Farelerin adipoz dokusundan - ilgili kaynaklardan (Yamamoto ve ark., 2007, Carvalho ve ark., 2009; Nagane ve ark., 2010; Odabas ve ark., 2013) adapte edilen aşağıda verilen yöntem izlenerek mezenkimal kök hücre (MKH) izolasyonu gerçekleştirilmiştir: İzolasyon işlemi uygulanmadan önce denek hayvanının bulunduğu desikatöre buharlaşan anestetik ajan - sevoflorane (Baxter, ABD) damlatılarak ile anestezi edilmiş/uyutulmuştur. Tarafımca farelerin abdominal bölgesinden adipoz dokusunun alınmasını gösteren örnek fotoğraflar Şekil 2.3'de verilmiştir.



**Şekil 2.3: Deney hayvanı farelerden adipoz doku izolasyonu**

Deneklerden alınan dokulardan kan damarları ve deri artıkları dikkatlice/ tamamen temizlenmiş/yıkanmış ve laminar akış kabinlerinde aseptik koşullarda şu işlemler uygulanmıştır: 200 µL penisilin/sterptomisin karışımı (Pen-Strep, Sigma-Aldrich, ABD) 20 ml PBS'de (pH: 7,4) çözülerek %1 Pen-Sterp çözeltisi hazırlanmış - her 10 cm petri kabına bu çözeltiden 10 ml konmuş - yıkanan doku parçaları 2 petri kabına dağıtılmış - neşter ve makasla dokular kabaca parçalanmıştır. Bu dokular temiz

10 cm lik petri kabında aktarılmış ve pasta kıvamına gelene kadar parçalanmıştır. Bu pasta kollajenaz içeren PBS çözeltisi ile karıştırılmıştır. Enzim çözeltisi, 50 mg kollejenaz enzimi (Sigma-Aldrich, ABD) 20 mL PBS de çözülüp, 0,22 μm den steril filtre edilerek hazırlanmıştır. Karışım çalkalamalı inkübatörde, 37ºC'de 120 rpm de yaklaşık 1 saat inkübe edilmiştir. Enzim reaksiyonunun durdurulması için, 2 santrifüj tübüne aktarılan ortama, eşit hacimda bazal ortam (%10 FBS ve %1 Pen-Strep içeren DMEM) ilave edilmiş, 1500 rpm de 10 dak santrifüj edilmiş ve pellet ayrılmıştır. Kırmızı kan hücrelerinin parçalanması için şu işlem uygulanmıştır: Supernatant aspirasyonla dikkatlice çekilmiş ve hücre pelleti %0.83 lük amonyum klorür ($NH_4Cl$ - Sigma-Aldrich, ABD) çözeltisinde suspense edilmiştir - yaklaşık 1 ml pellet için 9 ml $NH_4Cl$ çözeltisi kullanılmıştır. 10 dak oda sıcaklığında inkübasyon yapılmış ve 1500 rpm de 10 dak santrifüjle hücre pelleti çöktürülmüştür. Yaklaşık 20 ml kültür ortamı ile suspense edilen ve 100 μm lik filtreden geçirilen süspansiyon tekrar çöktürülüp 10 ml kültür ortamına alınan hücrelere kültür edilmek üzere petri kaplarına aktarılmış ve aşağıdaki bölümde tanımlanan hücre kültürü uygulanmıştır.

Kısa süre içinde kullanılmayacak olan hücreler dondurularak saklanmıştır. Bunun için oda sıcaklığında 1500 rpm de 10 dak santrifüj ile çöktürülen hücreler 4°C'e soğutulmuş %5-10 dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, ABD) içeren kriyojenik viallere (Corning Inc., ABD) konmuş, süspanse edilmiş ve izopropanol (%≥99.5, Sigma-Aldrich, ABD) içeren kaplarda -80°C'de gece boyu tutulan bu vialler depolanmak üzere sıvı azot kaplarına aktarılmış/saklanmıştır.

### 2.3.2. 2D Kök Hücre Kültürü

Sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere yeteri miktarda hücre elde edilmesi için önceki bölümde açıklanan yöntem ile adipoz dokudan izole edilen kök hücreler konvansiyonel sayılabilecek şu yöntemle kültür edilmiş/çoğaltılmıştır (Kim ve ark., 2007; Yamamoto ve ark., 2007, Carvalho ve ark., 2009; Hayashi ve Tabata, 2011; Odabas ve ark., 2014; Ge ve ark., 2016): Farelerin adipoz dokusundan izole edilen ve 10 ml kültür ortamında süspanse edilen kök hücreler 25 $cm^2$'lik doku kültür petri kaplarına (Iwaki Glass Ltd, Chiba, Japonya) konmuş ve 37ºC'de %5 $CO_2$'de ve %95 havada %90 üzeri nemlilik ortamındaki $CO_2$ inkübatöründe kültür edilmiştir. Kültür ortamı üçüncü gün ve daha sonra üç günde bir olmak üzere aspirasyonla değiştirilmiş, yapışmayan hücreler uzaklaştırıldıktan sonra yapışan hücreler PBS ile yıkanmış ve taze

besiyeri konularak kültürüne devam edilmiştir. Hücre kültür kap yüzeylerinin yaklaşık %70-80'i kaplanınca (%70-80 konfluente ulaşılınca) - yaklaşık 7 gün sonra tripsin/EDTA ile hücreler yüzeyden kaldırılmış (37ºC'de 5 dak) ve pasajlama yapılmıştır. Ağırlıkça % olarak - sırasıyla 0.25 ve 0,02 tripsin (Sigma-Aldirch, ABD) ve etilendiamin-tetraasetik asit (EDTA-Sigma-Aldirch, ABD) içeren PBS ile kullanılmıştır. 2D hücre kültürüne 3 pasajlama ile 14 gün devam edilmiştir.

Kültür ortamı (besiyeri) olarak - şu iki alternatif ortam kullanılmıştır: (i) %10 "fetal bovine serum" (FBS) (Thermo Inc., Waltham, ABD ve/veya Thermo Fisher Scientific, Gibco$^{TM}$, Cat. No: 16140071- ısıl olarak deaktive edilmiş) ile desteklenmiş ve %1 penisilin/streptomisin (Sigma-Aldrich, ABD) ilave edilmiş "Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (DMEM/F12) (Sigma-Aldrich, ABD); ve (ii) %15 "fetal bovine serum" (FBS) ile desteklenmiş ve %1 penisilin/streptomisin (Sigma-Aldrich, ABD) ilave edilmiş Alpha Minimum Essential Medium (αMEM) (Invitrogen, Carlsbad, ABD) kullanılmıştır.

MKHler, izolasyon ve kültür sırasında/sonrasında optik mikroskopla (Olympus, Tokyo, Japonya) görüntülenmiş ve örnek fotoğrafları çekilmiştir. Hücre sayısı bir hemositometrede (OneCell Inc., Japonya) ile bulunmuştur.

### 2.3.3. 3D Hücre Kümelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

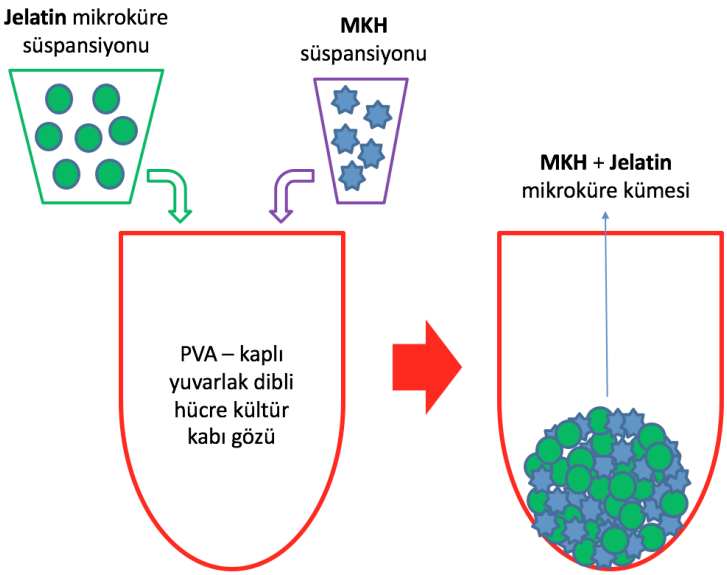
MKH hücre kümelerinin oluşturulması için bu gruptaki çalışmalarda dibi yuvarlak (U-dibli) 96 ve/veya 24 kuyucuklu kültür kapları kullanılmıştır. Öncelikle bu kültür kapları kuyucuklarına/iç yüzeylerine hücre yapışmasının engellenmesi için şu yöntemle hidrofilik polivinil klorür (PVA) ile kaplanmıştır (Hayashi ve Tabata, 2011; Tajima ve Tabata, 2012; Inoo ark., 2018): Tabata grubunun çalışmaları dikkate alınarak seçilen polivinil alkol (PVA) özellikleri şöyledir: polimerizasyon derecesi: 1800 ve yüzde saponifikasyonu %88 mol (Unichika, Tokyo, Japonya). PVA ağırlıkça %1 konsantrasyonunda steril PBS'de (pH: 7,4) çözülmüş 96 ve/veya 24 kuyucuklu kültür kablarının her kuyucuğuna (yuvarlak-dibli/U-dipli) kuyucuk başına bu çözeltiden 100 µl ve/veya 500 µl ilave edilmiş ve 37°C yaklaşık 15 dak inkübe edilmiştir. Çözelti aspirasyonla uzaklaştırılmış ve yavaş ve dikkatlice steril PBS ile iki kez yıkanmıştır - her yıkama işleminde kuyucuk başınan kuyucuk boyutuna göre 100 µl ve/veya 500 µl PBS kullanılmıştır.

Bu gruptaki çalışmalarda IEP si 5,0 olan asidik doğal jelatinden %10 konsantrasyonu ile başlanıp üretilen - kuru mikroküre boy aralığı: 32-53 μm olan; GA ile kimyasal yöntemle çapraz bağlanmış (GA/jelatin oranı: 0,10 mg/mg ve çapraz bağlama süresi: 12 saat) jelatin mikroküreler (JM4) de kullanılmıştır. Bu Jelatin mikroküreler kullanılmadan önce %70 etil alkol ile sterillenmiş ve alkol steril PBS ile tekrarlanan işlemler ile yıkanmış ve hücre kümeleri oluşturmak için kullanılmıştır.

Şekil 2.4'de şematik olarak gösterildiği gibi MKH ve jelatin mikroküre biyohibrid kümeleri oluşturmak üzere dibi yuvarlak 96 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucuğa sırasıyla 50-100 μl ve 50-100 μl - $1x10^3$ $ml^{-1}$ MKH ve $1x10^4$ $ml^{-1}$ jelatin mikroküre (JM4) süspansiyonlarından ilave edilmiş ve MKHler ile jelatin mikrokürelerin küresel yığınlar olarak biraraya gelmesi/birikmesi/ kümeleşmesi sağlanmıştır. Karşılaştırma sağlamak üzere jelatin mikroküre ilave etmeden yalnızca MKH kümeleri oluşturulmuştur. MKH ve jelatin mikrokürelerin αMEM besi ortamındaki süspnsiyonları kullanılmıştır. MKH kümelerinin (jelatinli veya jelatinsiz) oluşması/gelişmesi 7 gün süreli kültürlerde izlenmiştir.

MKH + jelatin mikroküre kümelerinin ve MKHlerin 7 gün süre ile sırasıyla 3B ve 2B kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 3D kültürler dibi yuvarlak 24 kuyucuklu kültür kapları kullanılırken, 2B tek tabakalı hücre kültür çalışmalarında dibi düz 24 kuyucuklu kültür kaplarında gerçekleştirilmiştir. Her kuyucuğa $1x10^3$ MKH veya $1x10^3$ MKH + $1x10^4$ jelatin mikroküre konmuş ve kültürler %15 "fetal bovine serum" (FBS) ile desteklenmiş ve %1 penisilin/streptomisin ilave edilmiş "Alpha minimum essential medium (αMEM)" da, 37ºC'de %5 $CO_2$'de ve %95 hava, atmosferinde %90 üzeri nemlilik ortamındaki $CO_2$ inkübatöründe gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonlar 2., 4., ve 7. Günlerde kuyucukların değerlendirilmesi ile izlenmiştir.

Kümelerdeki canlı hücre sayısı izlenmiştir - bunun için hücre çekirdeklerinin kristal viyole ile boyanmasına dayanan protokol uygulanmıştır (Nam ve ark., 2007, Bratt-Leal ve ark., 2011, Hayashi ve Tabata, 2011; Tajima ve Tabata, 2012; Tajima ve Tabata, 2017). 7 günlük kültürü sırasında - 2., 4. ve 7. günlerde 24 kuyucuklu hücre kaplarından bulunan örneklere - her kuyucuğa 100 μl 0,2 M sitrik asit ve ağırlıkça %0,2 kristal viyole karışımı eklenerek boyama sağlanmıştır. Kristal viyole boyanması sonrasında Triton X in PBS içindeki ağırlıkça %0,1'lik çözeltisi konulmuş ve 37ºC'de




**Şekil 2.4: MKH + jelatin mikroküre biyohibrid kümelerinin oluşturulması..**

gece boyu inkübe edilerek hücreler parçalanmıştır ("liz edilmiştir"). Pipetleme iletoplanan çekirdekler bir optik mikroskop ile (Olympus, Tokyo, Japonya) görüntülenerek hemositometrede (OneCell Inc., Japonya) sayılmıştır. Canlı hücrelerin çekirdeklerinin yuvarlak ölü olanların ise şekilsiz olduğu not edilmelidir. Her grupta üç kuyucuk kullanılarak üç tekrar deneyi yapılmış - bulunan değerlerin ortalaması ve standart sapma değerleri hesaplanmış/sunulmuştur.

2B ve 3B kültürlerde - 2., 4., ve 7. Günlerde - her bir kuyucukta - kültür ortamında kullanılan glikoz miktarları (konsantrasyonları) Glutest Neo Super test kiti ve kan glikoz ölçeri (glikoz dehidrojenaz-flavin adenin dinukleotid electrodlu) (Sanwa Kagaku Kenkyusho, Nagoya, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Aynı sürelerde kültür ortamlarında L-laktik asit miktarının artışı ise E-laktik asit kiti (R-Biopharm AG, Almanya) ile belirlenmiştir. Bunun için üretici firmanın tanımladığı protokolde (Art.no: 11112821035) belirtildiği gibi şöyle yapılmıştır: Satın alınan liyofilize ajan suda çözülmüş, kültür ortamı ile bir küvette karıştırılmış ve 340 nm'de bir absorbans ölçülmüştür (A1). Daha sonra, enzim çözeltisi küvete ilave edilmiş, 10-20 dak inkübe edilmiş ve absorbans tekrar ölçülmüştür (A2). Sonuçlar Lambert-Beer ifadesi ile hesaplanmıştır. L-Laktik asit konsantrasyonları kristal viyole boyama ile belirlenen kültür kabında zamanla değişen canlı hücre sayısı kullanılarak normalize edilmiştir.

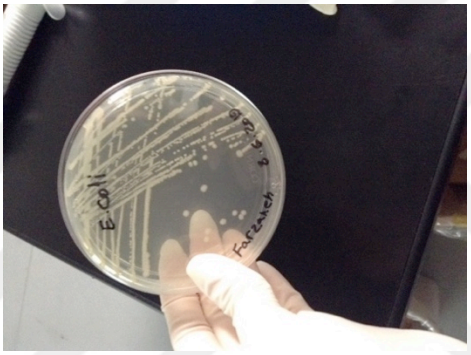
Önceki bölümde açıklanan protokol ile bulunan canlı hücre sayısına bölünerek normalize edilmiştir. L-laktik asit/glikoz oranları hücrelerin metabolik aktivitesini ifade etmek için kullanılmıştır (Nam ve ark., 2007; Bratt-Leal ve ark., 2011; Hayashi ve Tabata, 2011, Tajima ve Tabata, 2012; Tajima ve Tabata, 2017).

# 3. BULGULAR

## 3.1. Bakteri ve Bakteriyofajlar

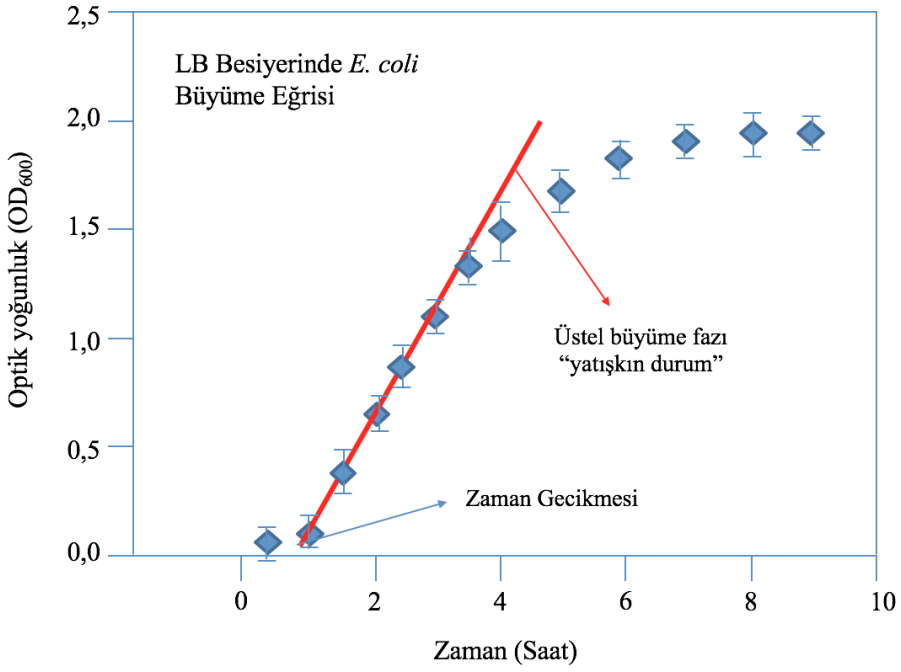
### 3.1.1. Escherichia coli

Bu tez kapsamında örnek bakteri olarak *Escherichia coli* (*E. coli*) seçilmiş, satın alma yoluyla ATCC'den temin edilmiş ve önceki bölümlerde ayrıntılı tanımlanan yöntemler ile çoğaltılmış/stoklanmıştır. Şekil 3.1'de bir petri kabı üzerinde *E. coli* kolonileri optik fotoğrafı görülmektedir. Buradan alınan bakteri çoğaltılarak deneyler yapılmıştır.




**Şekil 3.1: E. coli bakteri kolonilerini gösteren petri kabının örnek optik fotoğrafı**

LB sıvı besiyerinde 37ºC'de 200 rpm karıştırma hızında yaklaşık 10 saatlik bakteri kültürleri yapılmış ve belli zaman aralıklarıyla ortamdan alınan örneklerin 600 nm de optik yoğunlukları ($OD_{600}$) spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve zamana karşı grafiğe geçirilerek Şekil 3.2'deki büyüme eğrisi elde edilmiştir - doğrusal bölüm bir düz çizgi ile belirtilmiştir. Yaklaşık bir saatlik "zaman gecikmesi" ("time-lag") den sonra üstel büyüme fazına geçen bakteri üremesinde doğrusal bölüm yaklaşık 3 saat içinde ($OD_{600}$: 1,0) sonlanmakta daha sonra eğim azalmaktadır. $OD_{600}$: 0,5 değerinde ulaşılan bakteri konsantrasyonu yaklaşık $10^8$ CFU/ml dir. Bu değer sınır değer olarak kabul edilmiş ve çalışmanın ilerleyen bölümlerinde taze bakteri kültürü hazırlanırken hep bu değere ulaşılınca kültür durdurulmuş ve temizlenerek kullanım için hazır hale getirilmiştir.

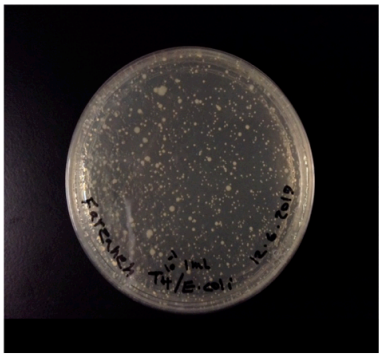



**Şekil 3.2: LB sıvı besiyerinde E. coli kültürü - büyüme eğrisi**

### 3.1.2. T4 Bakteriyofajı

Tez kapsamında seçilen *E. coli* bakteri suşu ile özgün olarak etkileşen T4 fajı yine satın alma yoluyla ATCC®'den temin edilmiş, tez kapsamında tarafımızca hazırlanan bakteri ve bakteriyofaj stokları kullanılarak çoğaltılmıştır. Önceki bölümlerde belirtildiği gibi üretilen bakteriyofaj emülsiyonlarında faj konsantrasyonunun bulunması için yumuşak besiyeri bulunan petri kapları üzerinde plak oluşumu sağlanmakta ve bunlar sayılarak PFU/ml olarak bakteriyofaj konsantrasyonu bulunmaktadır. Şekil 3.3'de böyle bir testte elde edilen ve plakları sayılan bir petri kabının optik fotoğrafı verilmiştir. Bir petri kabı üzerindeki plakların tamamının sayılması ile elde edilen plak sayısı Denklem 2.2 de verilen ifade kullanılarak bakteriyofaj nanoemülsiyonunda faj konsantrasyonu hesaplanmıştır.

Ön denemelerde farklı protokollar ve besiyerleri ile üretim ve saflaştırılma araştırılmış ve buradan elde edilen deneyimle Bölüm 3'de verilen yöntem uygulanmıştır. $10^9$-$10^{10}$ PFU/ml gibi oldukça yüksek bakteriyofaj konsantrasyonlarına çıkmak mümkün olmuştur. Sunulan tezin aşağıda belirtilen sonraki çalışmalarında $10^8$ PFU/ml konsantrasyonu yeterli olduğu görülmüş ve bu konsantrasyonda T4 faj nanoemülsi-yonları kullanılmıştır.

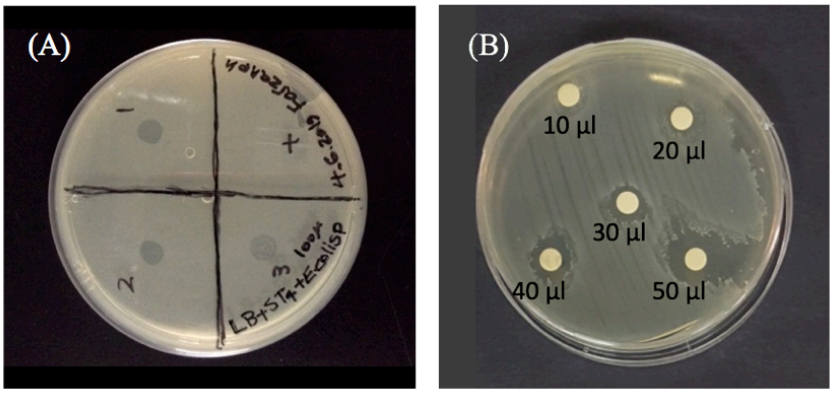


**Şekil 3.3: T4 bakteriyofajı nanoemülsiyonlarında faj konsantrasyonunun bulunması için uygulanan "plaque assay" testinde elde edilen bakteriyofaj plaklarını gösteren petri kabının örnek optik fotoğrafı**

Hazırlanan T4 bakteriyofajı hedef bakteri *E. coli*'nin üzerindeki etkinliği (enfekte edip parçalaması) önceki bölümde tanımlanan bakteri kültür testi ile ("agar overlay testi") belirlenmiştir. Yumuşak LB-agar besiyeri üzerinde kültür edilerek hazırlanan üzerinde türbid bakteri tabakası bulunan (yüzeyi tamamen bakteri tabakası ile kaplamış durumda) petri kaplarına farklı bölgelerine T4 bakteriyofajı damlatılmış, 37°C'de 200 rpm de çalkalıyarak 18 saat inkübe edilmiş ve şeffaf bölge oluşumu gözlenmiştir. Tez boyunca bu testin farklı amaçlarla çok kez yapıldığı not edilmelidir. Burada - Şekil 3.4'de örnek optik fotoğraflar verilmiştir. Bakteriyofajlar damlatıldıkları bölgede bakterileri parçalamakta ve petri kabının o bölümü türbidden şeffafa dönmektedir - bu hedef *E. coli* bakterisinin özgün T4 bakteriyofajı tarafından parçalanmasını temsil etmektedir/göstermektedir.

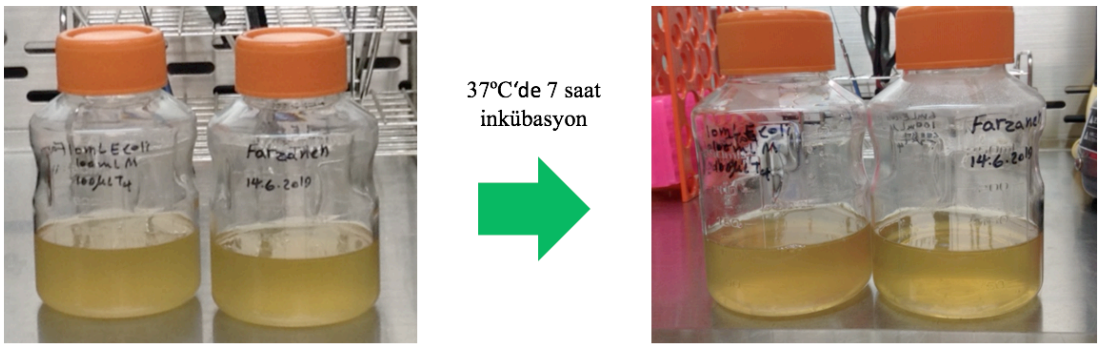
Şekil 3.4A'da görüldüğü gibi aynı petri kabının 3 farklı bölgesine aynı konsantrasyonda ve eşit miktarda bakteriyofaj nanoemülsiyonu damlatılmıştır. Şeffaf bölgelerin boyutları - dairelerin çapları birbirine çok yakındır - tekrarlanabilirliği göstermektedir. Özgünlüğün kontrolu için çapraz faj olarak *S. aureus* fajı damlatılan bölgede (+ ile işaretlenen) beklendiği gibi *E. coli* tabakasında herhangi bir şeffaf bölge oluşumu gözlenmemiştir. Daha önce ifade edildiği gibi, faj bakteriyi enfekte edip parçalanmasına yol açmaz ise ya aktif değildir yada bakterinin özgün fajı değildir.

Şekil 3.4B'de ise farklı noktalara önce steril kağıt diskler konmuş daha sonra bunların üzerine beş farklı noktaya beş farklı konsantrasyonda faj nanoemülsiyonları damlatılmış ve şeffaf bölge oluşumları sağlanmıştır. Beklendiği gibi faj konsantrasyonunun artmasıyla şeffaf zon çapı (yok edilen bakteryi sayısı) artmaktadır.




**Şekil 3.4: Tipik E. coli yumuşak LB-agar overlay kültür testi sonuçlarına örnekler: Şeffaf bölgeler T4 fajı tarafından parçalanan bakteri bölgelerini göstermektedir: (A) Tekrar deneyinde aynı faj nanoemülsiyondan 3 farklı noktaya aynı miktarlarda faj ilave edilmiş; ve (B) beş farklı noktalya farklı miktarlarda faj nanoemülsiyonu damlatılmıştır**

Süspansiyonda T4 bakteriyofajının bakteri *E. coli* üzerindeki etkisini izlemek üzere yapılan tipik bir test sonucu Şekil 3.5'de örnek olarak verilmiştir. Her iki şişeye de başlangıçta 100 ml besiyeri + 100 µl bakteriyofaj ve soldaki şişeye 10 ml sağdakine ise 5 ml aynı konsantrasyonda (yaklaşık $10^8$ CFU/ml) bakteri konmuş ve 7 saat 37ºC'de inkübe edilmiştir. Başlangıçta şişeler içindeki sıvı fazlar bulanıktır (türbiddir). 7 saat sonunda ise şeffaf sıvı faz içinde sütün kesilmesine benzer şekilde beyaz bakteri atıkları yüzer durumdadır. 100 µl bakteriyofaj 5-10 ml yüksek konsantrasyonda bakteriyi etkin bir şekilde parçalamıştır.




**Şekil 3.5: T4 bakteriyofajının E. coli üzerindeki etkisinin süspansiyonda izlenmesi. Her iki şişeye de başlangıçta 100 ml besiyeri + 100 µl bakteriyofaj ve soldaki 10 ml sağdakine ise 5 ml aynı konsantrasyonda bakteri konmuş ve 37ºC'de 7 saat inkübe edilmiştir**

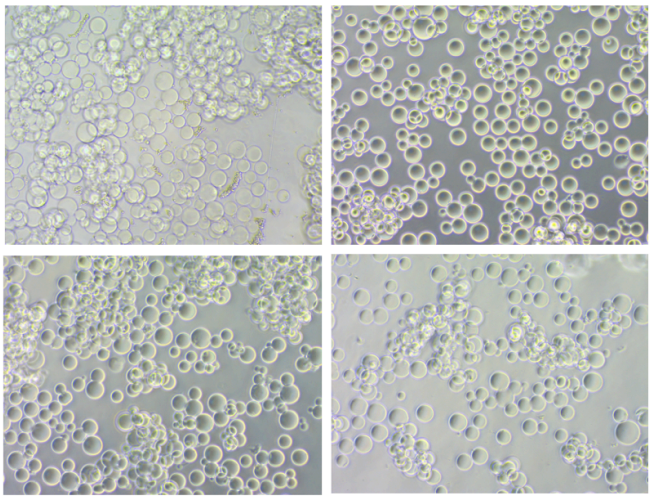
### 3.2. Jelatin Mikroküreler

#### 3.2.1. Üretilen Jelatin Mikroküreler

Sunulan tez kapsamında taşıyıcı matriks olarak değerlendirilen jelatin mikrokürelerin hazırlanmasında Nitta Gelatin firmasından (Osaka, Japonya) temin edilen bazik ve asidik jelatin (izoelektrik noktaları - "IEP" - sırasıyla 9,0 ve 5,0 ve ağırlıkça ortalama molekül ağırlıkları yaklaşık 100 kDa) kullanılmıştır.

Jelatin mikroküreler iki basamaklı bir proses ile üretilmiştir. Birinci basamakta "çapraz bağlı olmayan" mikroküre formunda jeller hazırlanmıştır. Uygulanan protokol ile belli boy aralığında (30-80 μm dır) mikroküreler elde edilmiştir - mikrokürelerin %80 inden fazlası 32-53 μm aralığındadır - bu oldukça dar bir aralık olarak değerlendirilmektedir. Elekler kullanılarak bu aralıktaki mikroküreler ayrılmış ve sonraki çalışmalarda bu fraksiyon kullanılmıştır.

İkinci adımda sunulan tez kapsamında suda şişen ancak çözünmeyen "çapraz bağlı" jelatin mikroküreler kimyasal çapraz bağlanma ajanı olarak glutaraldehit (GA) kullanılarak çapraz bağlanmıştır. Farklı çapraz bağ yoğunluklarında jelatin mikroküre elde etmek için birim mikroküre (mg olarak) başına kullanılan GA miktarı (mg olarak) değiştirilmiş - 3 farklı GA/jelatin mikroküre oranında (0,05; 0,10 ve 0,2 mg/mg) çapraz bağlanma gerçekleştirilmiştir - bu grupta çapraz bağlanma süresi 12 saattir. Tez kapsamında üretilen jelatin mikrokürelere örnekler Şekil 3.6'da verilmiştir - görüldiği suda şişmiş mikroküler düzgün küresel formdadır.



**Şekil 3.6: Tez kapsamında üretilen jelatin mikrokürelerin örnek görüntüleri**

### 3.2.2. Jelatin Mikroküreleri̇n Suda Şi̇şmesi̇

Üretilen farklı çapraz bağlanma derecelerinde mikrokürėlerde çapraz bağlanma yoğunluğunun değerlendirilmesi amacıyla Denklem 2.3 kullanılarak suda şişme dereceleri - "Su Alma Yüzdeleri (SAY)" hesaplanmıştır. Tablo 4.1 GA kullanılan kimyasal yöntem ile farklı derecelerde çapraz bağlanmış jelatin mikrokürėlerin şişme/su absorblama kabiliyetleri ve kuru mikrokürėlerin ortalama çapları sunulmuştur. Kimyasal çapraz bağlayıcı GA bağıl miktarının artması ile çapraz bağlanma artmaktadır. Tez kapsamında hazırlanan GA ile çapraz bağlanmış jelatin mikrokürėlerin suda şişme değerleri %90'ın üzerindedir. Başka bir ifadeyle şişme ile mikrokürėlerin çapları Tablo 3.1 de verilen değerlerin yaklaşık 1.7-1.8 katıdır.

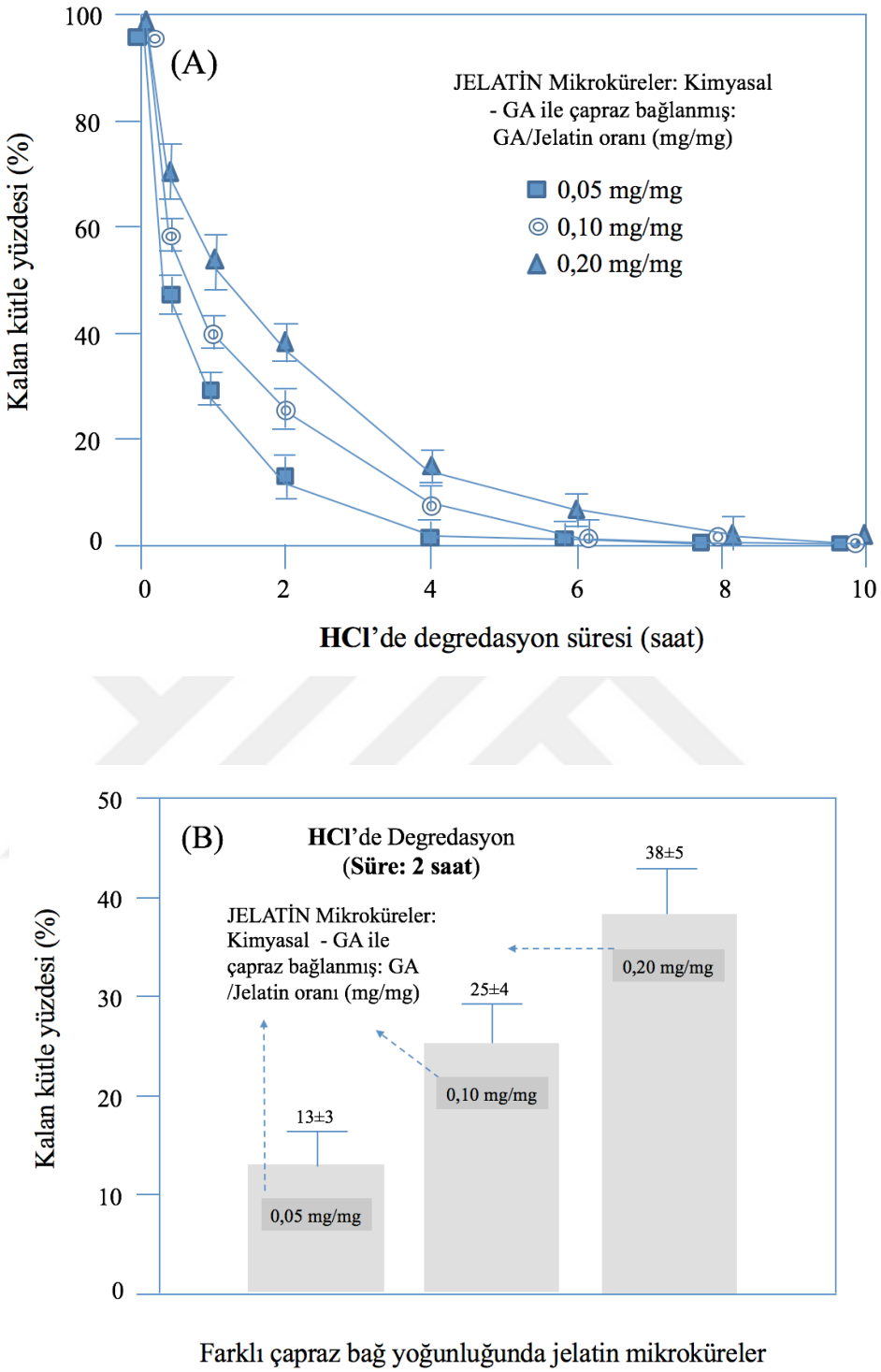
**Table 3.1: Bazik jelatinden hazırlanan ve kimyasal yöntem ile - GA kullanılarak - üç farklı GA/jelatin oranında - farklı miktarlarda çapraz bağlı mikrokürėlerin "yüzde su alma kapasiteleri" - SAY (%) ve kuru ortalama çap - D (µm) değerleri.**

| GA/Jelatin Oranı (mg/mg) | SAY* (%) | D* (µm) |
|---|---|---|
| 0,05 | 98,5 ± 1,4 | 47,5 ± 4,4 |
| 0,10 | 96,8 ± 1,2 | 44,5 ± 5,0 |
| 0,20 | 93,6 ± 1,4 | 41,2 ± 6,4 |

* Üç tekrar deney ortalaması ± standart sapma

### 3.2.3. Jelatin Mikrokürėlerin Degredasyonu

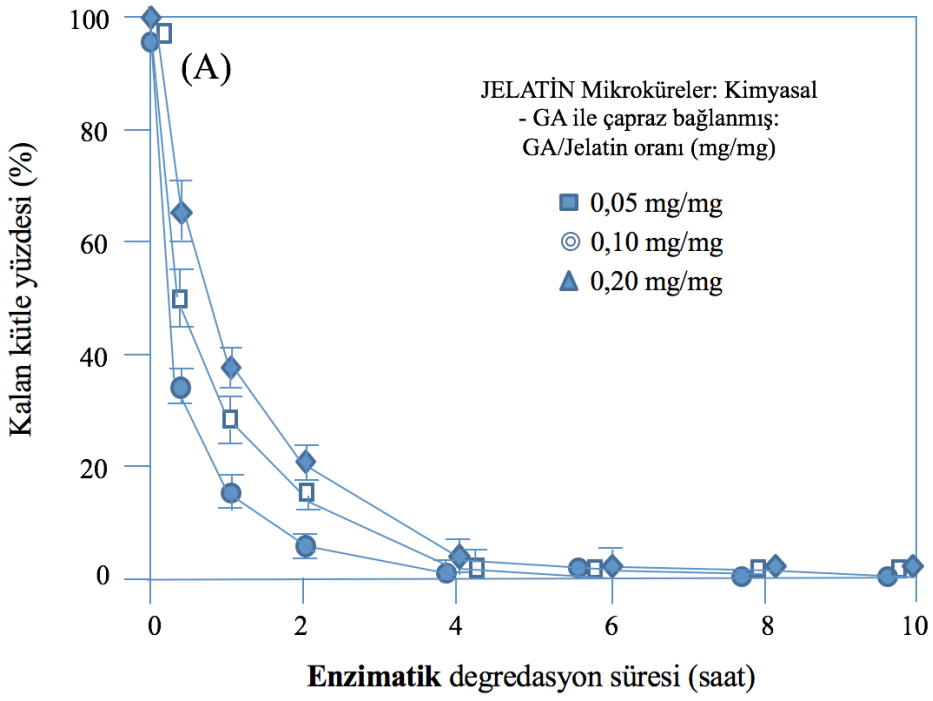
Üç farklı GA/jelatin oranında (0,05; 0,10 ve 0,20 mg/mg) kullanılarak çapraz bağlanan bazik jelatin mikrokürėlerin HCl'de degredasyonu Şekil 3.7'de verilmiştir. Suda şişme dereceleri daha yüksek - düşük çapraz bağ yoğunluğunda - mikrokürėlerin daha hızlı degrede oldukları görülmektedir (Şekil 3.7A). Degredasyonun 2. saatinde degrede olmayan/kalan kütlenin GA/jelatin oranı ile değişimi Şekil 3.7B'de bar grafikler olarak gösterilmiştir. 2 saatlik asidik hidroliz/degredasyon süresince, 0,05; 0,10 ve 0,20 mg/mg GA/jelatin mikrokürėlerden kalan kütle yüzdeleri sırasıyla 13±3, 25±4 ve 38±5 dir. Dikkat edileceği gibi degredasyon çapraz bağ yoğunluğunun artmasıyla (GA bağıl miktarının artmasıyla) artmaktadır. Farklı derecelerde çapraz bağlanan mikrokürėlerde degredasyonu 6-10 saat civarında tamamlanmaktadır.

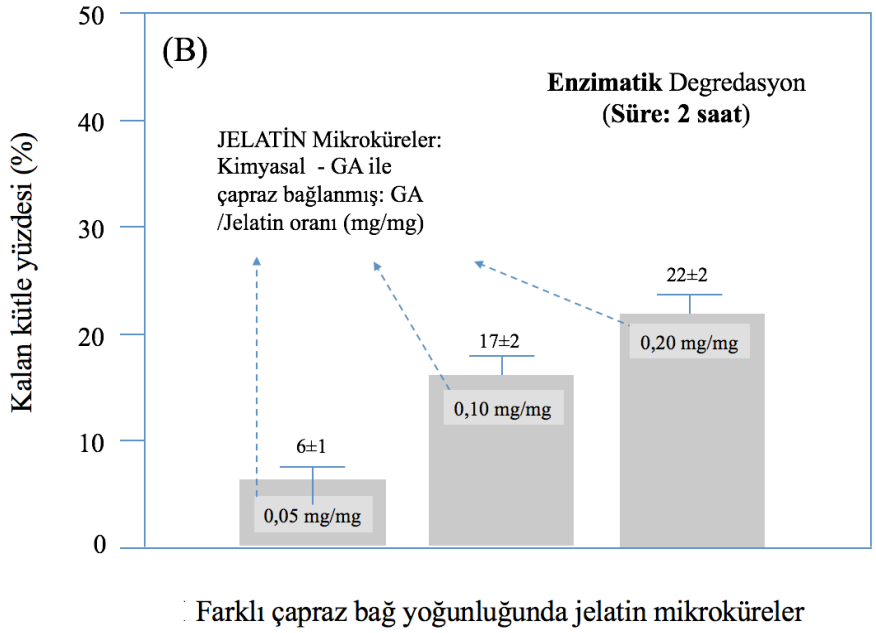



**Şekil 3.7: Kimyasal yöntemle - GA kullanılarak - farklı çapraz bağlanma derecelerinde bazik jelatinden hazırlanan mikrokürelerin HCl ile asidik hidrolizi/ degredasyonu: (A) Üç farklı çapraz bağlanma derecesine sahip (üç farklı GA/jelatin oranında GA kullanılarak çapraz bağlanmış) mikrokürelerin zamana karşı degredasyonları (kalan kütle yüzdeleri); ve (B) bu üç farklı mikrokürenin degredasyonunda 2 saat degredasyon süresi sonrasında kalan kütle yüzdeleri**

Bazik jelatinden hazırlanan ve kimyasal olarak farklı derecelerde çapraz bağlanan jelatin mikrokürelerin kollajenaz ile enzimatik degredasyonu da incelenmiştir. Degredasyonun PBS içinde 37°C'de gerçekleştirilmiş - enzimatik degredasyon belli zaman aralıklarıyla alınan örneklerde "ninhidrin" yöntemiyle izlenmiştir (McGrath, 1972). Belli zaman aralıklarla enzimatik degredasyon ürünlerinin analizi ve kullanılan mikrokürelerin tamamının hidroliz olduğu durumda ölçülen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan zaman karşı kalan kütle değerleri grafiğe geçirilerek enzimatik degredasyon kinetikleri grafiksel olarak sunulmuştur.

Tez kapsamında üç farklı GA/jelatin oranında GA kullanılarak kimyasal olarak çapraz bağlanan bazik jelatin mikrokürelerin enzimatik degredasyon eğrileri Şekil 3.8'de verilmiştir. Suda şişme dereceleri daha yüksek daha düşük derecede (yoğunlukta) çapraz bağlanmış mikrokürelerin enzimatik olarak da daha hızlı degrede oldukları görülmektedir (Şekil 3.8A). Degredasyonun başlangıcından 2 saat sonra degrede olmayan/kalan kütlenin GA/jelatin oranı ile değişimi Şekil 3.8B'de bar grafikler olarak gösterilmiştir. Çapraz bağ yoğunluğu artıkça enzimatik degredasyonun yavaşlamaktadır. 2 saatlik enzimatik degredasyon süresince, 0,05; 0,10 ve 0,20 mg/mg GA/jelatin mikrokürelerden kalan kütle yüzdeleri sırasıyla 6±1, 17±2 ve 22±2 dir.



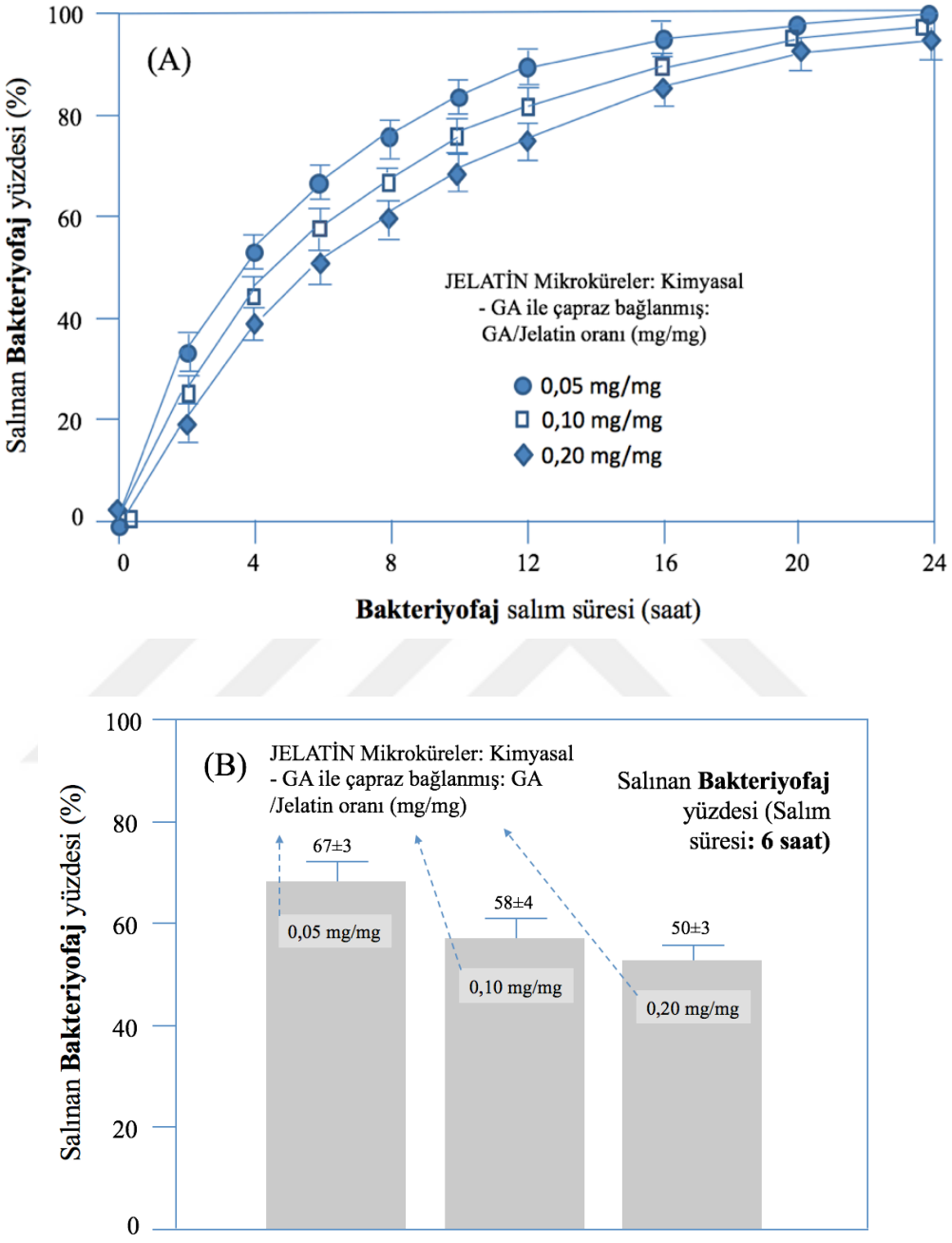



**Şekil 3.8: Kimyasal yöntemle - GA kullanılarak - farklı çapraz bağlanma derecelerinde bazik jelatinden hazırlanan mikrokürelerin kollajenaz ile enzimatik degredasyonu: (A) Üç farklı çapraz bağlanma derecesine sahip (üç farklı GA/jelatin oranında GA kullanılarak çapraz bağlanmış) mikrokürelerin zamana karşı degredasyonları (kalan kütle yüzdeleri); ve (B) bu üç farklı mikrokürenin degredasyonunda 2 saat degredasyon süresi sonrasında kalan kütle yüzdeleri**

### 3.2.4. Jelatin Mikrokürelere Bakteriyofaj Yüklenmesi ve Salımı

Tez kapsamında - önceki bölümlerde tanımlanan IEP si 9,0 olan bazik doğal jelatinden hazırlanan - üç farklı GA/jelatin oranında (0,05; 0,10 ve 0,20 mg/mg) GA kullanılarak çapraz bağlanan mikrokürelere bakteriyofaj yüklenmesi gerçekleştirilmiş ve sulu çözeltilerde (PBS tampon çözeltisinde) salımları incelenmiştir. Bu mikrokürelere bakteriyofaj yüklemesi için dondurularak kurutulan mikroküreler bakteriyofaj içeren nanoemülsiyonlara konmuş ve ortamdaki tüm sıvı fazı emmeleri, dolayısıyla ortamdaki tüm bakteriyofajların mikrokürelere yüklenmesi sağlanmıştır.

Şekil 3.9A ve B'de, üç farklı çapraz bağ yoğunluğunda jelatin mikrokürelerden bakteriyofaj salımının zamanla değişimi (kinetik eğriler) ve ilk altı saatlik sürede salınan miktarlar (bar grafikler) sunulmuştur. Burada beklendiği gibi çapraz bağ yoğunluğu artıkça salım hızı/salınan bakteriyofaj yüzdesi azalmaktadır. 6 saatlik sürede salınan bakteriyofaj yüzdeleri 0,05; 0,10 ve 0,20 mg/mg GA/jelatin oranları için sırasıyla 67±3; 58±4 ve 50±3 dir.

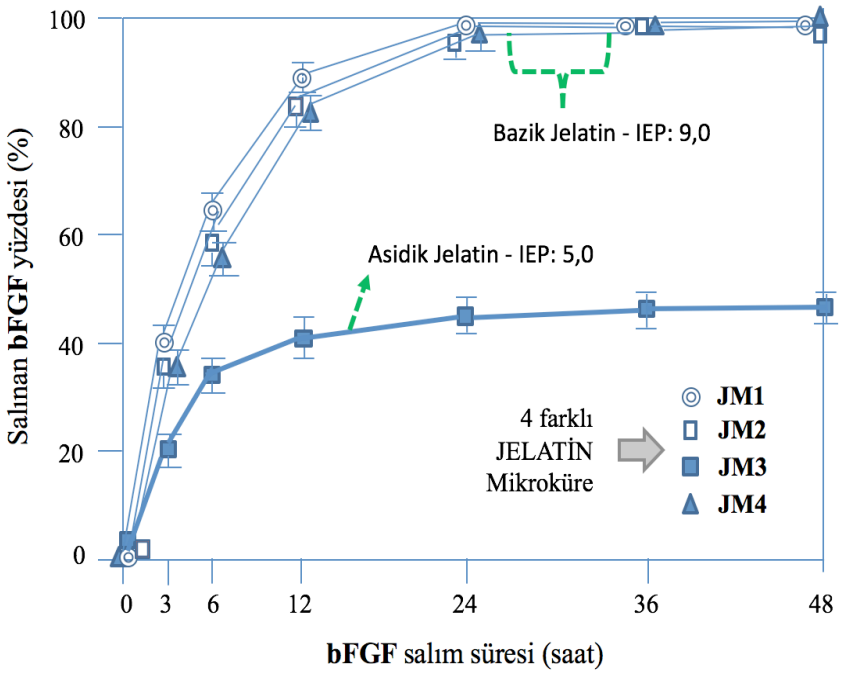



**Şekil 3.9: Kimyasal yöntemle - GA kullanılarak - farklı çapraz bağlanma derecelerinde bazik jelatinden hazırlanan bakteriyofaj yüklenmiş jelatin mikrokürelerde bakteriyofaj salımı: (A) Üç farklı çapraz bağlanma derecesine sahip (üç farklı GA/jelatin oranında GA kullanılarak çapraz bağlanmış) mikrokürlerden zamana karşı bakteriyofaj salımı; ve (B) bu üç farklı mikroküreden 6 saatlik sürede salınan bakteriyofaj yüzdeleri**

### 3.2.5. Jelatin Mikroküreleri bFGF Yüklenmesi ve Salımı

Bu gruptaki bFGF yükleme ve salım çalışmalarında - hem bakteriyofaj çalışmalarında kullanılan IEP si 9,0 olan bazik doğal jelatinden üç farklı GA/jelatin oranında (0,05, 0,10 ve 0,20 mg/mg) GA kullanılarak çapraz bağlanma ile üretilen - özellikleri Tablo 3.1'de verilen jelatin mikroküreler (sırasıyla JM1, JM2 ve JM3) hem de - bakteriyofaj yükleme ve salım çalışmalarından farklı olarak - IEP si 5,0 olan asidik doğal jelatinden aynı koşullarda ancak 0,10 mg/mg oranında GA kullanılarak hazırlanan mikroküreler (JM4) değerlendirilmiştir. Bu - asidik jelatin ile hazırlanan mikroküre lerin suda şişme yüzdeleri (SAY) % 92,6 ± 2,1 ve ortalama mikroküre çapları 41,3 ± 4,4 µm olarak bulunmuştur. Bu mikroküre lere FITC ile etiketlenmiş/işaretlenmiş bFGF yüklenmesi gerçekleştirilmiştir.

FITC-etiketli bFGF'in jelatin matrikslerden PBS (pH: 7,4), bulunan ortama salımı 37°C'de su banyosunda, yavaş çalkalama hızında, karanlıkta 48 saat izlenmiştir. Belli zaman aralıklarıyla alınan örneklerde FITC-etiketli bFGF salımı floresans spektrofotometre ile ölçülerek elde edilen bFGF salım eğrileri Şekil 3.10'da verilmiştir.



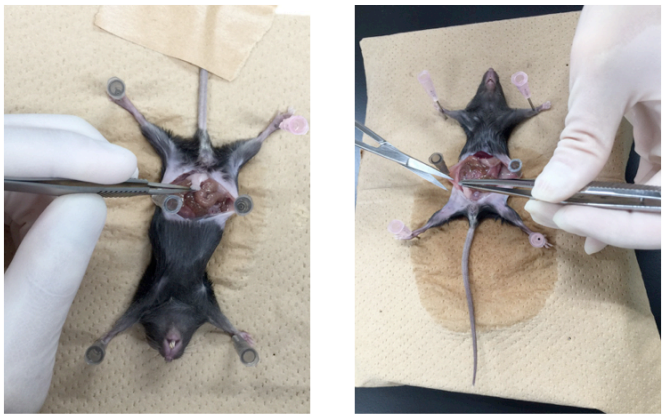

**Şekil 3.10: Kimyasal Üç farklı GA/jelatin oranında GA kullanılarak çapraz bağlanmış mikrokürlerden (JM1, JM2 ve JM3) zamana karşı bFGF salımı. Asidik jelatinden hazırlanan örnek mikroküre lerden (JM4) salınan bFGF yüzdeleri**

Şekilde görüldüğü gibi bazik jelatin mikrokürelerden (JM1, JM2 ve JM3) bFGF salımları oldukça hızlıdır. Çapraz bağ yoğunluğu arttıkça salım hızı göreceli olarak azalmaktadır. Bu mikrokürelerden yüklenen bFGF in hemen hemen tamamı 24 saatte salınmıştır. Buna karşılık asidik jelatin ile hazırlanan mikrokürelerden (JM4) bFGF salımı oldukça farklıdır. Başlangıçta ilk altı saatlik sürede salım hızlıdır - ancak daha sonra oldukça yavaşlamakta ve nerdeyse platoya ulaşmaktadır - 48 saatlik süre de dahi yüklenen bFGF in yaklaşık %55'i hala mikrokürelerdedir. Tabata grubunun benzer çalışmalarında da gözlenen bu davranış matriks jelatin ile bFGF izoelektrik noktaları (IEP) ile açıklanabilir - Bölüm 4'de tartışılmıştır.

### 3.3. Mezenkimal Kök Hücreler ve Hücre Kümeleri

#### 3.3.1. Adipoz Dokudan İzole Edilen Kök Hücreler

Sunulan tez kapsamında 6 dişi farenin (yaklaşık 7 haftalık) adipoz dokusundan önceki bölümde verilen protokollar ile mezenkimal kök hücre (MKH) izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.11'de farelerin abdominal bölgesinden alınan adipoz doku parçalarının örnek fotoğrafı verilmiştir.

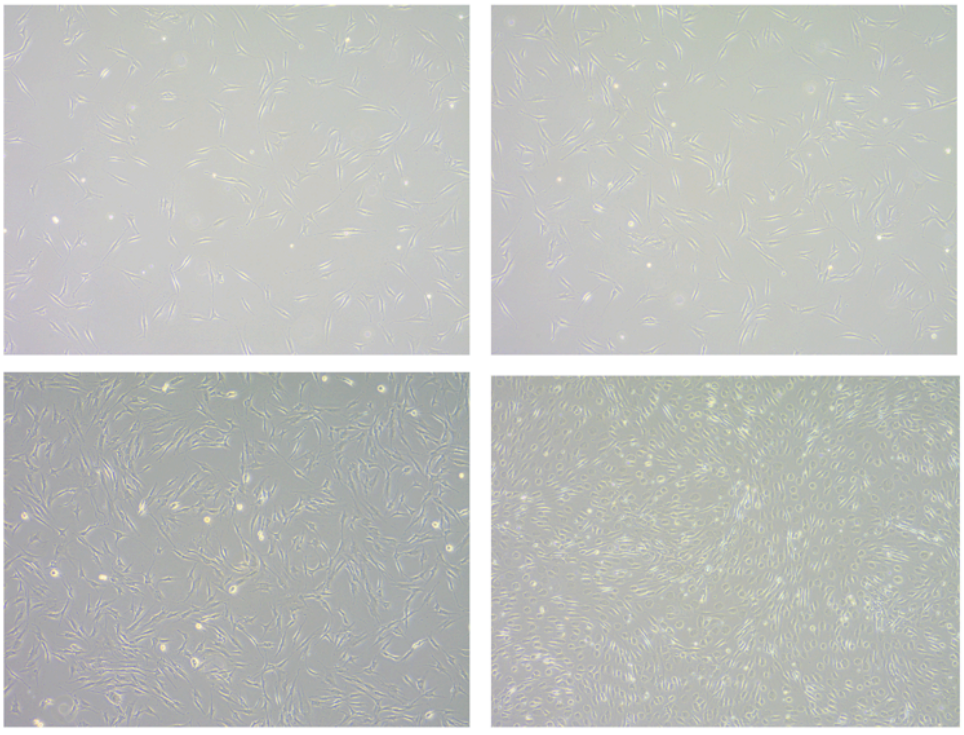


**Şekil 3.11: Farelerin abdominal bölgesinden alınan adipoz doku örnekleri**

Deneklerden elde edilen adipoz doku Bölüm 2'de ayrıntılı olarak verilen protokollar ile işlenmiş ve ayrılan hücreler 25 $cm^2$'lik doku kültür petri kaplarında 2B kültür edilmiştir. İki farklı kültür ortamı, "Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (DMEM/F12)" ve "Alpha minimum essential medium (αMEM)" denenmiştir. Elde

edilen hücre gelişimleri birbirine çok yakındır - her ikisinin de başarıyla kullanılabileceği ifade edilebilir. 3 pasajlama ile 14 gün sürdürülen kültür çalışmalarında petri kaplarında hücre yoğunluğu $1x10^4$ hücre/$cm^2$ ve üzeri değerlere ulaşabilmektedir. $1x10^3$ hücre/ml konsantrasyonunda hücre süspansiyonlar sonraki bölümde MKH ve jelatin mikroküre kümelerinin oluşturulmasında kullanılmıştır.

2B kültür kaplarında (petrilerde) yapılan toplam 14 günlük kök hücre kültürlerinde örnek görüntüler Şekil 3.12'de verilmiştir. Görüldüğü gibi yağ dokusundan izole edilen MKH hücreleri kültürün başlangıç döneminde tipik fibroblastik hücre yapısını sergilemektedir. Yaklaşık 7-10 gün sonra, tripsinizasyon öncesinde petri kaplarının yüzeyleri %70-80 kaplamış duruma ulaşmaktadır. 2. ve 3. pasajlamada hücrelerde değişimler gözlenmiştir. Bazı örneklerde olgun adipoz hücreler dikkati çekmektedir. Hatta farklılaştırma ortamı kullanılmamış olsa da ilerleyen zamanlarda farklılaşmış hücreler de gözlenmektedir.



**Şekil 3.12: Adipoz dokudan elde edilen MKH hücrelerin 2B kültürlerde gelişmesine/değişimine örnek görüntüler**

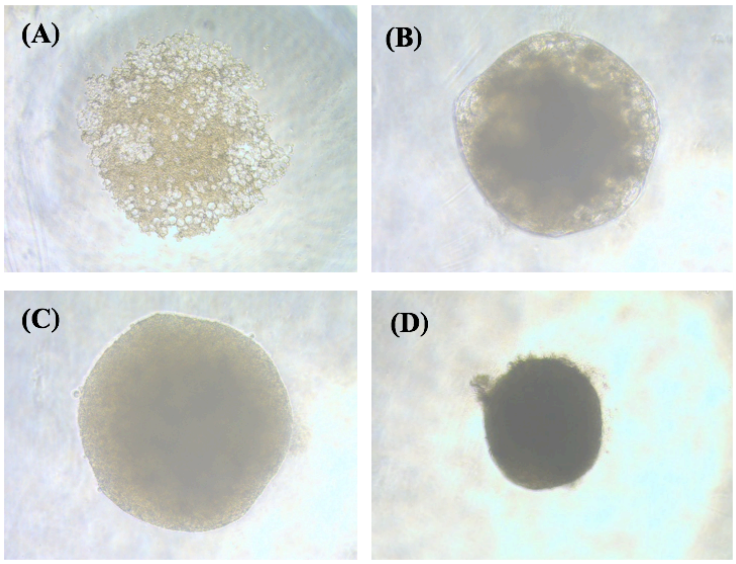
### 3.3.2. Kök Hücre Kümeleri

Önceki bölümde açıklandığı gibi çok kuyucuklu dibi yuvarlak hücre kültür kapları PVA ile kaplanarak hidrofilik hale getirilmiş ve hücre yapışması önlenmiş - MKHlerin yalnız başına veya jelatin mikroküreler ile birlikte kümeleşmesi sağlanmıştır. Şekil 2.4'de şematik olarak gösterildiği gibi her kuyucuğa konulan belli sayıdaki MKH hücre veya MKH + jelatin mikroküre yığılarak kuyucuğun dibinde küresel kümeler oluşturmaktadır. Bu gruptaki deneylerde kullanılan jelatin mikroküreler asidik doğal jelatinden hazırlanmıştır (IEP si 5,0). Çapraz bağlamada 0,10 mg/mg GA/jelatin oranında GA kullanılmıştır. Bu mikrokürelerin ortalama çapları 41,3 ± 4,4 μm ve suda şişme yüzdeleri (SAY) % 92,6 ± 2,1 dır. Yani jelatin mikrokürelerin boyutları besi ortamında şişmiş durumda kuru boyutlarına göre hemen hemen iki katına çıkmaktadır.

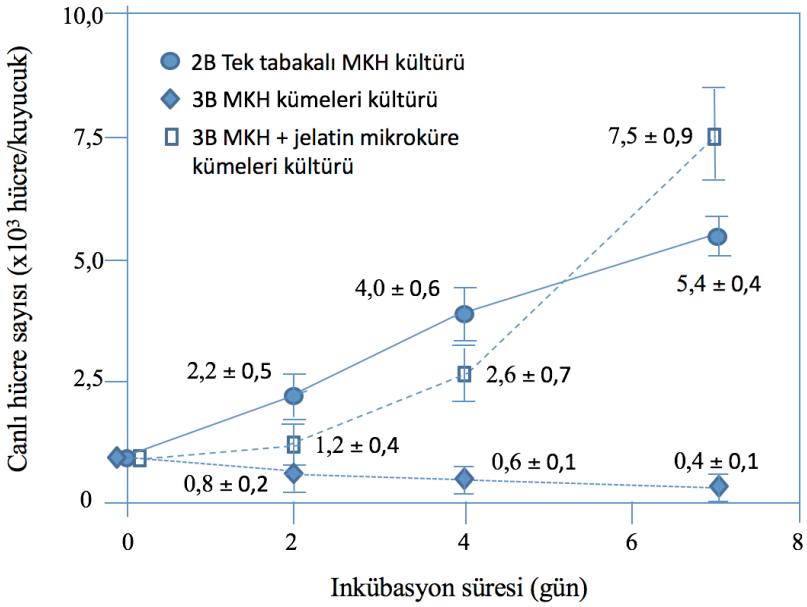
Tez kapsamında başlangıçta kültür kabının her kuyucuğa sırasıyla 50-100 μl - $1x10^3$ $ml^{-1}$ MKH süspansiyonu veya 50-100 μl-$1x10^3$ $ml^{-1}$ MKH süspansiyonu + 50-100 μl-$1x10^4$ $ml^{-1}$ jelatin mikroküre süspansiyonu konmuş ve 7 gün inkübe edilmiştir. Şekil 3.13A, B ve C'de MKH + jelatin mikroküre kümelerinin sırasıyla küme oluşturulduktan 24 saat, 2 gün ve 7 gün sonra görüntülerine örnekler verilmiştir. Küme oluşturulurken dibi yuvarlak kuyucuklu kültür kaplarının kullanılmıştır, dolayısıyla - beklendiği gibi küresel kümelerin oluşmaktadır. Kullanılan hücre miktarı ve mikroküre miktar ve boyutu ile başlangıç küme boyutunun önemli miktarda değiştiği not edilmelidir. 24 saat sonra MKHler ve jelatin mikroküreler tam olarak birleşmemiş ayrı fazlar olarak durmaktadır. 2. günde küresel yapı net olarak ortaya çıkmıştır, hücreler çoğalmış küre içine yayılmış ve küme boyutları azda olsa artmıştır. 7. gün sonra ise hücre yoğunluğunun arttığı ve kürenin daha kompakt olduğu ve boyutunda artmaya devam ettiği görülmektedir. MKH + jelatin mikrokürelerden oluşturulan kümelerin başlangıç bölümünde boyutları 150-200 μm civarında iken ve 7 günlük inkübasyon süresi sonrasında 250-300 μm civarına çıkmıştır. Buna karşın yalnızca MKHlerden hazırlanan kümelerin boyutları başlangıçta yaklaşık 100-120 μm iken 7 gün sonra 80-100 μm, hatta altına düşmektedir (Şekil 3.13D).

MKH kümelerinin (jelatin mikroküreli ve jelatin mikroküre olmadan) ve MKHlerin 7 günlük - sırasıyla 3B ve 2B kültürlerinde öncelikle canlı hücre sayısısının zamanla değişimi bulunmuştur. Ortalama değerler ve standart sapmalar (en az üç tekrar deneyde elde edilen veriler) Şekil 3.14'de sunulmuştur. Görüldüğü gibi yalnızca MKHlerden hazırlanan kümelerde hücre canlılığı zamanla azalmakta 7 gün içinde

başlangıç değerinin yarısından daha aşağı düşmektedir. İlk 4 gün süresince 2B tek tabakalı kültürde canlı hücre sayısı artarmaktadır. Ancak, biyohibrid kümelerde 7 günde ulaşılan canlı hücre sayısı 2B kültüre göre daha yüksek değerlere gelmiştir ($7.5x10^3$).

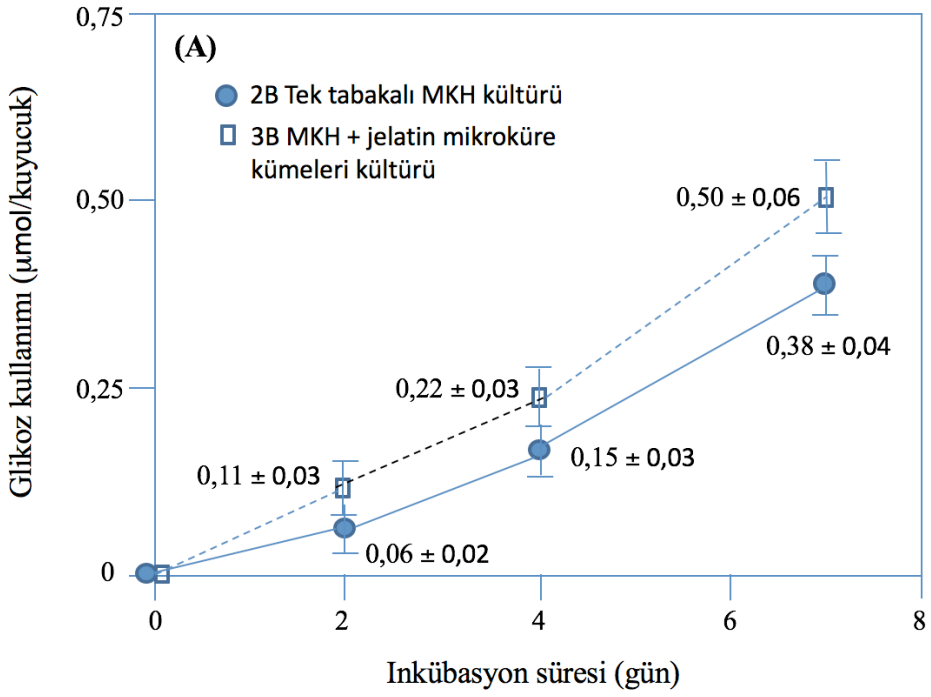


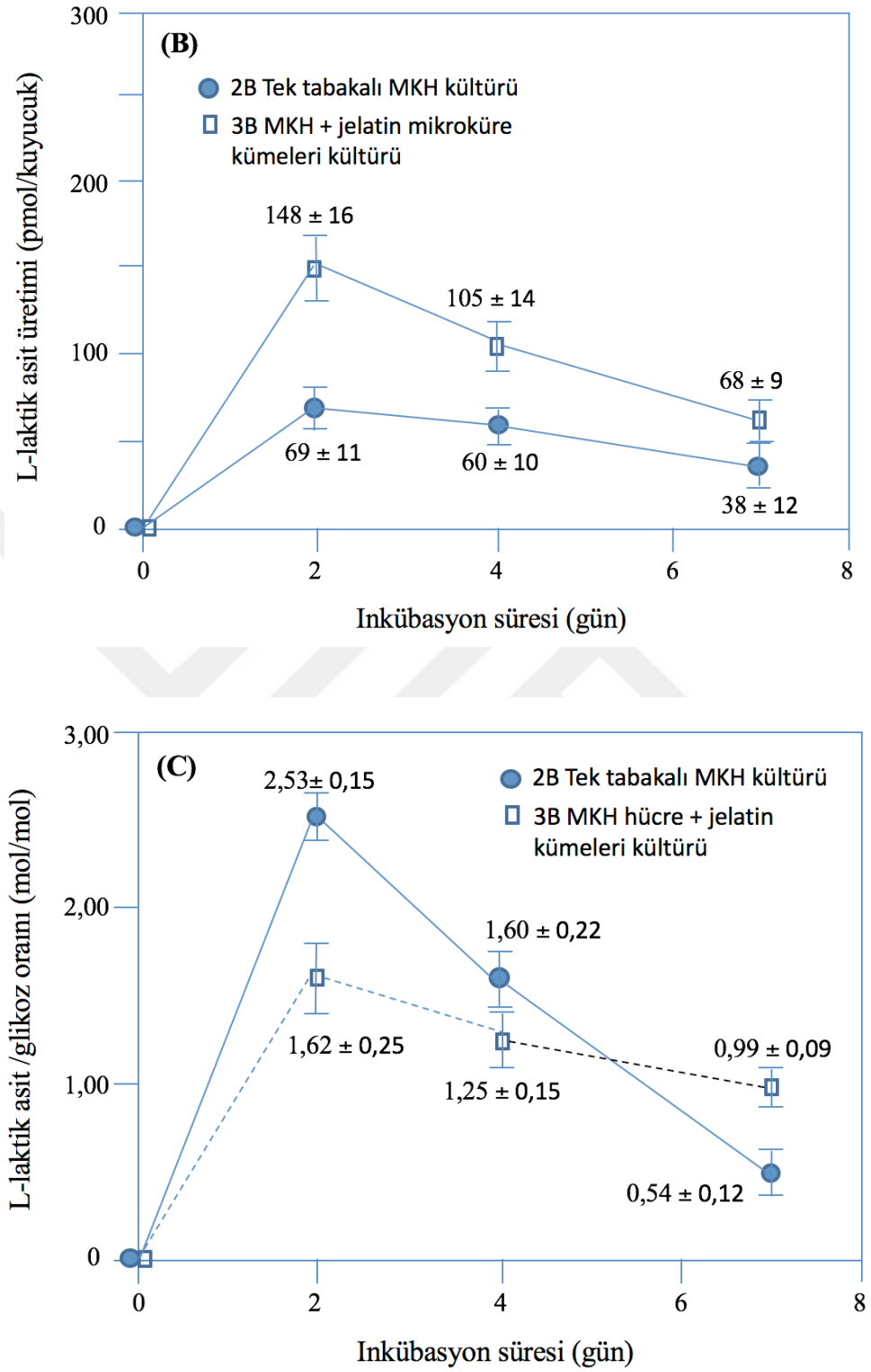

**Şekil 3.13: MKH ve jelatin mikroküre kümelerinin 7 günlük inkübasyonu süresince değişimini gösteren optik fotoğraf örnekleri: (A), (B) ve (C) MKH + jelatin mikroküre kümeleri - 24 saat, 2 gün ve 7 gün sonra ve (D) yalnızca MKHlerden oluşan kümelerin 7 gün sonra**




**Şekil 3.14: 2B tek tabakalı kültür ve 3B MKH kümelerinin (jelatin mikroküre olan veya olmayan) 7 günlük kültüründe - canlı hücre sayısında inkübasyonu süresince gözlenen değişimler**

2B ve 3B kültürlerde metabolik aktivitelerin 7 günlük inkübasyon süresince değişimini tanımlamak/karşılaştırmak üzere yapılan deneylerde, glikoz kullanımı ve L-laktik asit üretimleri ölçülmüş ve L-Laktik asit/glikoz oranı metabolik aktivite göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Şekil 3.15A'da glükoz kullanımının hücre sayısının artışına parallel olarak arttığı görülmektedir. 7 günlük inkübasyon süresi sonunda çok daha yüksek canlı hücre sayısı gözlenen 3B kültürde glikoz kullanımı 2B kültüre göre belirgin miktarda daha yüksektir. Şekil 3.15B'de L-laktik asit üretiminin zamanla değişim eğrileri verilmiştir. Burada 2B kültürlerde L-laktik asit sentezi tüm inkübasyon süresince 3B kültürlere göre daha düşüktür. Şekil 3.15C'de canlı hücre sayıları kullanılarak normalize edilen L-laktik asit sentezinin glikoz kullanımı oranının zamanla değişim eğrileri verilmiştir. İlk 4 günlük kültürde 2B kültürde bu oran daha yüksek çıksada 7 günlük inkübasyon süresinde 3B kültür de L-laktik asit/glikoz üretimi daha yüksek olmaktadır.





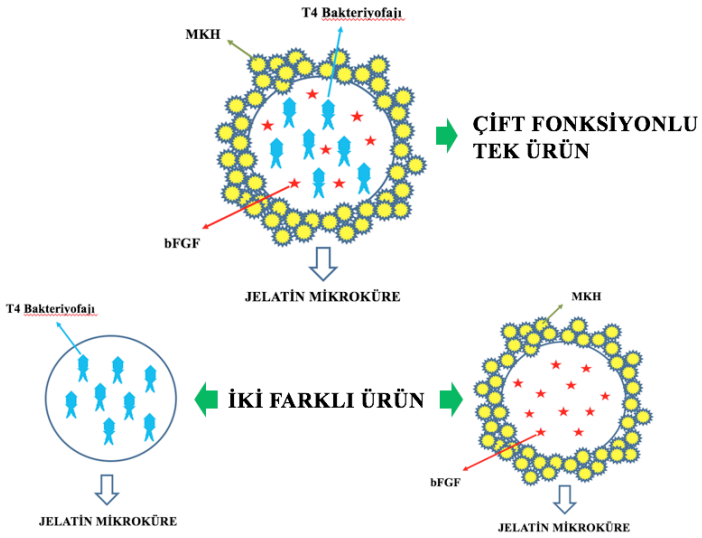

**Şekil 3.15: 2B ve 3B kültürlerde 7 günlük inkübasyon süresince metabolik parametrelerin zamanla değişimi: (A) Glikoz kullanımı;(B) L-laktik asit üretimi; ve (C) L-laktik asit/glikoz oranı**

# 4. TARTIŞMA

Sunulan tezin bir bölümünü oluşturduğu son dönem çalışmalarımızda diyabetik ayak ülserleri gibi şiddetli enfeksiyonla seyreden ve önemli boyutta doku kayıplarının (hem yumuşak hem de sert doku) gözlendiği yaraların iyileştirilmesi için - bakteriyofajların antibakteriyal ajan ve mezenkimal kök hücrelerin doku onarımı için kullanıldığı kombine tedavi yöntemlerinin/protokolların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Özellikle anjiyogenezi artırmak ve doku iyileşmesini hızlandırmak için formülasyonlara bFGF de ilave edilmesi öngörülmüştür.

Şekil 4.1'de tez kapsamında geliştirilmesi öngörülen bu biyohibrid materyallerin şematik yapısı/fonksiyonu tanımlanmıştır. Taşıyıcı olarak farklı derecelerde (yoğunluklarda) çapraz bağlı jelatin hidrojel mikroküreler kullanılmaktadır. Bu mikrokürelere antibakteriyal ajan olarak bakteriyofajlar ve uygulamada esas olarak anjiyogenez oluşumunu artırmak amacıyla "temel fibroblast büyüme faktörü" (bFGF) yüklenmekte/kontrollu salım sağlanmaktadır. Adipoz dokudan izole edilen mezenkimal kök hücreler (MKHler) jelatin hidrojel mikrokürelerin etrafında/üstünde 3B kümeleşmesi sağlanmakta ve biyohibrid doku mühendisliği onarım malzemeleri hazırlanmaktadır.

Tez kapsamında üretilen taşıyıcı jelatin mikrokürelere bakteriyofajlar ve bFGF yüklenmesi ve kontrollu salımı sağlanmıştır. Adipoz dokudan izole edilen ve 2B kültürlerde çoğaltılan MKHlar bu biyodegrede olabilen jelatin hidrojel mikrokürelerde kümeleştirilerek doku mühendisliği yaklaşımı olarak değerlendirilen 3B biyohibrid biyomateryallerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Sunulan tezde kapsam yalnızca - ürün tasarım/üretim/karakterizasyon ve *in vitro* performans testleri ile sınırlandırılmış - *in vivo* uygulamalara taşınacak ürün özellikleri ve üretim protokolları tanımlanmıştır. Önceki bölümünde verilen bulgular aşağıdaki alt bölümlerde aynı sıra içinde değerlendirilmiş, tartışılmış ve ulaşılan sonuçlar vurgulanmıştır.




**Şekil 4.1: Diyabetik ayak ülserlerinin kombine tedavisinde kullanılmak üzere sunulan tezde kapsamında geliştirilmesi amaçlanan biyohibrid doku mühendisliği onarım malzemelerinin şematik tanımı**

## 4.1. Bakteri ve Bakteriyofajlar Özellikleri

### 4.1.1. *Escherichia coli* büyüme eğrisi

Bu tez kapsamında hedef bakteri olarak *Escherichia coli* (*E. coli*) seçilmiştir. *E. coli*, bakteriler ile ilgili literatürde en çok çalışmanın olduğu bakterilerin başında gelir. Genel Bilgiler bölümünde ayrıntılı olarak tanıtıldığı gibi, insan bağırsak florasında bulunan iyi/olumlu katkıları olan - oradaki türleri yararlı bakteriler arasındadır. Ancak, bazı suşları şiddetli patojeniktir - ölümlere yol açabilir - ABD ve Avrupa gibi gelişmiş toplumlarda dahi önemli sayıda ölümle sonuçlanan pandemilere neden olmuştur.

Sunulan bu tez kapsamında kullanılan antibakteriyal aktif ajan T4 bakteriyofajının üretilmesinde/çoğaltılmasında ve aktivite testlerinde T4 fajının özgün olarak enfekte ettiği/etkileştiği bir *E. coli* suşu konak olarak kullanılmıştır. Laboratuvar ortamı ve çalışanların güvenliği göz önünen alınarak planlanan çalışmaları yapmak üzere *E. coli*'nin patojen olmayan bir suşu seçilmiş, satın alma yoluyla ATCC®'den temin edilmiş ve Bölüm 3'de ayrıntılı tanımlanan yöntemler ile çoğaltılmış/ stoklanmıştır.

Şekil 3.2'de genel bir bakteri üreme/çoğalma eğrisinde (davranışında) görüldüğü gibi bakteri büyümesinde başlangıçta bir gecikme zamanı ("time-lag") söz konusudur.

Daha sonra büyüme üstel olarak hızlanır, doğrusal bölge den geçer ve belli bir süreden (belli bir bakteri konsantrasyonundan) sonra büyüme yavaşlar, kütle artsa da kültür durgunluk fazına geçer ve daha sonra ölümler başlar. Bu büyüme eğrisinin, kullanılan bakteri, suşu, besiyeri ve bileşimi, kültür koşulları (sıcaklık, çalkalama hızı, vb.), kültür kabı ve proses şekline, vb. değişebileceği önemli not edilmelidir. *E. coli*'de de benzer durum söz konusudur. Yüksek verimli bakteriyofaj üretimini sağlamak için konak bakterinin genç/aktif ve yeteri kadar kütlede olması önemlidir - yüksek kütle (hücre sayısı) önemlidir ancak faj üretiminde genç ve aktif olması daha önemlidir (Fishov ve ark., 1995; Neidhardt ve ark., 1996; Blattner ve ark., 1997; Sezenov ve ark., 2007; Kotloff ve ark., 2013; Gomez ve ark., 2016; Shulman ve ark., 2007; Joan ve Slonczewski, 2017).

*E. coli*'nin kültürü - çoğaltılması için birçok besiyeri kullanılmaktadır. Bunların arasında en yaygın olarak kullanılanların başında Luria-Bertani (LB) broth gelmektedir. Sezenov ve arkadaşlarının bu besiyerinde *E. coli* üremesi ile ilgili çalışmaları önemli bir kaynaktır (Sezenov ve ark., 2007). Bu grup, sunulan tezde de kullanılan *E. coli* suşuna benzer bir suşun LB içinde büyümesini izlemişler, büyüme eğrisini çıkarmışlar, hem optik yoğunluk ($OD_{600}$) değişimini hem de hücre miktarının zamana göre değişimini rapor etmişlerdir. $OD_{600}$ değeri 7,0 ye ulaşana kadar LB'nin *E. coli* büyümesini, çoğalmasını desteklediğini göstermişlerdir. Elde etttikleri büyüme eğrisinde yatışkın durumun ("steady-state") - başka bir ifade ile, eksponansiyal fazın $OD_{600}$ değeri 0,6-1,0 arasında sonlandığını rapor etmişlerdir. Önemli bir not olarak literatürdeki genel davranıştan farklı olarak doğrusal bölgeden sapmanın $OD_{600}$: 0,3 den sonra başladığını hücre saysında önemli artışa karşın bakterilerin genç ve altif durumlarından uzaklaşmaya başladığını ifade etmişlerdir. Sunulan tez kapsamında da benzer bir protokol uygulanarak *E. coli*'nin LB besiyerinde büyüme eğrisi elde edilmiştir. Kısa bir zaman gecikmesinden sonra üstel büyüme fazına geçen bakteri üremesinde yaklaşık 3 saat içinde ($OD_{600}$: 1,0) hemen hemen doğrusaldan gelişme göstermiştir - daha sonra eğim azalmaktadır. $OD_{600}$: 0,5 değerinde ulaşılan bakteri konsantrasyonu yaklaşık $10^8$ CFU/ml dir. İlgili literatür de göz önüne alınarak $OD_{600}$: 0,5 sınır değer olarak kabul edilmiş ve çalışmanın ilerleyen bölümlerinde taze bakteri kültürü hazırlanırken hep bu değere ulaşılınca kültür durdurulmuş ve temizlenerek kullanım için hazır hale getirilmiştir.

### 4.1.2. Çoğaltılan T4 bakteriyofajı aktivitesi

Bölüm 2'de ayrıntılı olarak tanıtıldığı gibi bakteriyofajlar yalnızca bakterileri enfekte eden dolayısıyla bakteriyal enfeksiyonların giderilmesinde antibiyotiklere alternatif olarak kullanılan önemli antibakteriyal ajanlardır. Önceki bölümlerde söz edildiği gibi, diyabetik ayak enfeksiyonları da dahil olmak üzere özellikle antibiyotik dirençli enfekte yaraların iyileştirilmesinde hayvan modellerinden başlıyan çalışmalar örnekleri az da olsa klinik uygulamalara ulaşmıştır (Rhoads ve ark., 2009; Vandenheuvel ve ark., 2015; Abedon ve ark., 2017; Fish ve ark., 2016; Gorski ve ark., 2016; Fish ve ark., 2018; Azerado ve Sillankorva, 2018; Morozova ve ark., 2018).

Tez kapsamında T4 bakteriyofajının kullanılması öngörülmüştür. Bu faj *E. coli*'nin 7 fajından biridir - en çok araştırılan dolayısıyla bugün oldukça ayrınıtılı bilgilere sahip olduğumuz bir bakteriyofajdır (Bradley, 1963; Leiman ve ark., 2003; Miller ve ark., 2003; Kutter and Sulakvelidze, 2004; Aksyuk ve ark., 2009; Black ve ark., 2012; Fokine ve ark., 2013; Yap ve Rossman, 2014; Szemer-Olearnik ve ark., 2017). Bu faj önceki bölümde tanıtılan/tartışılan - tez kapsamında örnek hedef bakteri olarak seçilen/çoğaltılan *E. coli* bakteri suşu ile özgün olarak etkileşmektedir - bu bakteriyi konak olarak kullanarak kendisini özgün ve oldukça hızlı olarak çoğaltılabilmektedir.

Tez kapsamında kullanılan T4 fajı satın alma yoluyla ATCC®'den temin edilmiş, Bölüm 3'de verilen iki farklı yöntemle, konak olarak *E. coli* kullanılarak çoğaltılmıştır. Ön denemelerde farklı protokollar ve besi yerleri ile üretim ve saflaştırılma araştırılmış ve burdan elde edilen deneyimle Bölüm 3'de belirtilen uygulanan protokol ile başarılı sonuçlar $10^9$-$10^{10}$ PFU/ml gibi oldukça yüksek bakteriyofaj konsantrasyonlarına çıkmak mümkün olmuştur. Sunulan tezin aşağıda belirtilen sonraki çalışmalarında $10^8$ PFU/ml konsantrasyonu yeterli olduğu görülmüş ve bu konsantrasyonda T4 faj nanoemülsiyonları kullanılmıştır. Çoğaltılan ve saflaştırılan T4 fajının güçlü aktivitesi *E. coli* 'nin petri kaplarında yumuşak-agar üzerinde yapılan kültür testlerinde belirgin şeffaf zonların oluşması ile belirlenmiştir. Beklendiği gibi *S. aureus* fajı ile yapılan negatif testlerde herhangibir şeffaf bölge oluşumu gözlenmemiş, bu da T4 fajının kullanılan *E. coli* suşu için özgün olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

### 4.2. Jelatin Mikroküreler

"Genel Bilgiler" bölümünde açıklandığı gibi jelatin ve modifiye formları veya diğer doğal polimerler ile karışımları - genellikle - çapraz bağlı - suda/sulu ortamda şişen hidrojel formatında - çok farklı uygulamalar için biyomateryaller, doku iskeleleri ve kontrollu aktif ajan (örneğin büyüme faktörü) salım matriksleri için yaygın olarak kullanılmıştır/kullanılmaktadır (Tabata ve ark., 1999; Lee ve Mooney, 2001; Chan ve ark., 2003; Linag ve ark., 2003; Lie ve ark., 2003; Ueda ve ark., 2003; Hori ve ark., 2004; Okamoto ve ark., 2004; Ozeki ve Tabata, 2005; Takahashi ve ark., 2005; Hiraoka ve ark., 2006; Igai ve ark., 2006; Kushibiki ve ark., 2006; Esaki ve ark., 2007; Khademhosseini ve Langer, 2007; Akagawa ve ark., 2008; Ichinohe ve ark., 2008; Kikuchi ve ark., 2008; Patel ve ark., 2008; Narita ve ark., 2009; Kimura ve Tabata, 2010; Watanabe ve ark., 2010; Fonseca ve ark., 2014; Santoro ve ark., 2014; Reddy ve ark., 2015; Su ve Wang, 2015; Bakvari ve ark., 2018).

Sunulan tez kapsamında bakteriyofaj ve bFGF yüklemesi ve kontrollu salımı matriksi hem de mezenkimal kök hücre (MKH) kümelerini taşıyan biyohibrid ürünlerde taşıyıcı görevini üstlenmek üzere kullanılması öngörülmüş/kullanılmıştır. Tezin birçok bölümünde söz edildiği gibi taşıyıcı biyomateryal olarak seçilmesinde birçok önemli özelliği dikkate alınmış/göz önünde tutulmuştur. Öncelikle jelatin'in biyouyumluluğu çok yüksektir - hatta hammadesi olan kollajene göre taşıdığı yan etki riski çok daha düşüktür - yok denecek kadar azdır. Bu biyobozunur doğal polimerin (polipeptidin) degredasyon ürünleri - doğal amino asitlerdir dolayısıyla kullanımı hem emniyetli hem de doku rejenerasyonunda yer alan önemli aktif son ürünlerdir. Oldukça kolay çok ılımlı koşullarda (oda sıcaklığında ve olası yan etkileri olan kimyasallar kullanmadan) şekillendirilir - özellikle biyoaktif ajan (büyüme hormonu, vb.) kontrollu salım sistemlerinde bu aktivasyon kaybı olmadan yükleme anlamına gelir ki çok önemlidir. Çok farklı yöntemler ile istenilen gözenek ağ yapısında, farklı derecelerde su absorblayan çapraz bağlı yapılara, hidrojellere dönüştürülebilmesi de önemli avantajları arasındadır. Oldukça yüksek saflıkta, kolaylıkla temin edilebilen düşük maliyetli doğal polimerlerin başında gelir. Doğal dokulardan farklı yaklaşımlar ile farklı elektrik yüklerinde (farklı izoelektrik noktalarda) - başka bir ifadeyle fizyolojik pH değerlerinde farklı yüklerde sahip jelatin (asidik ve bazik) üretilebilmektedir ve bunların ticari olarak temini mümkündür. Sunulan tezin en önemli bölümlerinden olan bakteriyofaj ve bFGF

kontrollu salımı ile ilgili çalışmalarda bu özellik jelatinin taşıyıcı matriks olarak seçiminde öncelikli olarak değerlendirilmiştir. Sunulan tez ve ilgili çalışmalar planlanırken - laboratuvar çalışmalarının başlangıç bölümünün yapıldığı Kyoto Üniversitesi'nde (Japonya) önemli araştırma gruplarından biri olan Prof. Tabata grubunun özellikle jelatin esaslı hidrojeller ve bunların hem doku mühendisliği için biyomateryal hem de aktif ajanların (başta bFGF) kontrollu salımı ile ilgili çok uzun yıllardır yaptıkları çalışmalar ve edindikleri bilgi ve deneyim birikimleri öncelikli olarak göz önünde tutulmuştur. Tabata grubu 1980'li yılların sonlarından günümüze kadar birçok uygulama için jelatin mikroküreleri kullanmışlardır - çok başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Sunulan tezi bu çalışmalar üzerine kurgulanmıştır. Ancak ilk kez bu çalışmada bakteriyofaj yükleme ve salımı ve bunların MKH kümelerini taşıyan formları ile birlikte diyabetik ayak ülserleri gibi şiddetli - iyileşmesi zor enfeksiyon ve önemli doku kaybı tedavisinde kombine tedavi olarak uygulanabilecek olmasıdır.

### 4.2.1. Jelatin mikroküre üretimi

Sunulan tez kapsamında - özellikle bakteriyofajlar yükleme ve salımında benzer birçok çalışmada da kullanılan bazik jelatin satın alma yoluyla temin edilip kullanılmıştır. Tez kapsamında jelatin mikrokürelerin üretiminde izlenen/uygulanan protokol, bu çalışmanın başlangıç bölümünün yapıldığı Prof. Tabata grubunun Kyoto Üniversitesindeki laboratuvarlarında uzun yıllardır uygulanmaktadır - hemen hemen standart hale gelmiştir - çok farklı uygulamalar için hemen hemen hergün uygulanan jelatin mikroküre üretim protokoludur. İlk basamakta - kısaca - jelatin sulu çözeltisinin bir yağ fazı içinde dağıtılıp mikroküre şekline getirilmesi ve jelleşme ile çapraz bağlı olmayan jelatin mikroküre hidrojeller oluşturulmuştur. Mikrokürelerin boy ve boy dağılımını önemli oranda etkileyebilecek - jelatin türü (molekül ağırlığı, kaynağı, vb.), dispersiyon fazı olarak kullanılan yağın türü ve buna bağlı özellikleri, jelatin sulu fazın/yağ fazına oranı karıştırma/dispersiyon hızı, şekli, süresi, sıcaklık, yüzdürücülerin kullanıp kullanılmaması, vb. gib birçok parametre vardır. Bu parametreler değiştirilerek çok farklı boy ve boy aralıklarında jelatin mikroküre üretmek mümkündür. Her üretimde mutlaka bir boy dağılımı vardır - kaçınılmazdır. Önemli olan istenilen boy dağımınında en çok sayıda mikroküre bulunduran son ürün elde edilmesidir. Mikroküreler elde edildikten sonra eleme ile istenilen boy aralığı/farksiyonu seçilir/ayrılır/kullanılır. Sunulan tezin hedef uygulamasına uygun olarak 32-53 μm elek aralığı seçilmiştir. Bu boyutlardaki mikrokürelerin üretimi için çalışma grubunun ve

yapılan ön deneyler sonucu sunulan tez kapsamında "Materyal ve Metod" bölümünde tanımlanan protokol ve koşullar seçilmiş ve uygulanmıştır. Bulgular böülümünde rapor edildiği gibi tez kapsamında yapılan üretimlerde bu aralıkdaki mikroküre yüzdesi %80 üzerindedir. Hedeflenen boyut aralığında oldukça yüksek verimle üretim yapıldığı not edilmelidir.

Önceki bölümlerde de söz edildiği gibi jelatin, biyomateryal/kontrollu salım uygulamalarında çapraz bağlı, suda çapraz bağ yoğunluğuna bağlı olarak şişen hidrojel formunda kullanılır. Jelatin matrikste çapraz bağ yoğunluğu matriksin birçok temel özelliğini - örneğin suda şişmesini (içine aldığı/absorbladığı su miktarını); mekanik özelliklerini (mekanik stabilite, esneklik/sertlik, vb. gibi); jelatin matrikse aktif ajan yükleme miktarı ve salım kinetiğini (matriksten aktif ajanın difüzyonla dışarı çıkmasını); hidroliz ve/veya enzimatik degredasyonunu, vb. etkileyen en önemli parametredir.

Çapraz bağ yoğunluğu (yapı içinde sıklığı), çapraz bağ boyları ve matriks içinde dağılımı (genellikle homojen olması hedeflenir) matriksin üretimi sırasında kontrol edilebilir. Genel Bilgiler bölümünde de belirtildiği gibi jelatin hidrojellerin çapraz bağlanması için dehidrotermal, UV irradiyasyonu, vb. gibi fiziksel yaklaşımlar uygulanabilir veya kimyasal çapraz bağlayıcılar kullanılabilir. Sunulan tez de olduğu gibi kimyasal ajan (çapraz bağlayıcılar) kullanıldığında jelatin üzerindeki amino asitlerin yan gruplarında bulunan fonksiyonel gruplar üzerinden (örneğin glutaraldehit kullanıldığında amino grupları - $NH_2$) çapraz bağlanma sağlanır. Burada kullanılan çapraz bağlayıcının molekül şekli ve boyu (hidrokarbon zincir uzunluğu - örneğin GA de bu altı karbon uzunluğundadır) jelatin zincirleri arasındaki açıklığı - çapraz bağ uzunluğunu ve birim jelatin miktarına karşı kullanılan çapraz bağlayıcının bağıl miktarı da sonuç network yapıdaki çapraz bağ yoğunluğu ve gözenek/suyla şişmiş boşluk yapısını belirler - kolaylıkla kontrol edilebilir.

Sunulan tez de mikroküre üretiminde ikinci basamakta jelatin mikrokürelerin çapraz bağlanarak, suda şişen ancak çözünmeyen hidrojel mikroküreler haline getirilmiştir. Bunun için çapraz bağlayıcı olarak GA kullanılmıştır. Biyolojik/medikal uygulamalarda özelllikle amino grubu taşıyan moleküllerin çapraz bağlanmasında - altı karbonlu iki ucunda amino grubları ile oldukça kolay reaksiyona giren aldehit grupları taşıyan bu molekül çok uzun zamandır özellikle proteinlerin çapraz bağlanmasında

yaygın olarak kullanılmaktadır - ilgili literatürde çok sayıda yayın bulunmaktadır (Tabata ve Ikada, 1989; Damink ve ark. 1995; Bigi ve ark., 2001; Ozeki ve Tabata, 2005; Hoffman, 2012; Reddy ve ark., 2015; Oryan ve ark., 2018). GA nın aslında toksik bir molekül olduğu çapraz bağlanmayan GA'nın medikal uygulamalarda yan etkileri olan/tartışılan bir molekül olabileceği dikkatle üzerinde durulan bir konudur. Özellikle GA'nın reaksiyona girmeyen aldehit gruplarının glisin gibi moleküller ile pasive edilmesi gerekir - böylece yan etkilerin azaltılaması mümkündür. Sunulan tezde de bu pasivasyon basamağı uygulanmıştır. GA miktarının bağıl olarak artırılması beklendiği gibi çapraz bağ yoğunluğunun artmasına neden olmaktadır - açıktır. Özellikle hedeflenen şişme değerleri (%90 ve üzeri) göz önünde tutularak sunulan tez kapsamında üç farklı GA/jelatin oranında (0,05; 0,10 ve 0,20 mg/mg) GA kullanılmıştır - çapraz bağlı jelatin mikrokürelerin yeteri kadar şişmesi istendiğinden daha yüksek oranlara çıkılmamıştır - istenirse GA bağıl oranının artırılması ile çok daha az şişen mikrokürelerin üretilebileceği not edilmelidir (Tabata ve Ikada, 1989).

**4.2.2. Jelatin mikroküre degredasyonu**

Jelatininin vücutta (*in vivo*) biyomateryal olarak kullanıldığında hidrolizi mümkündür/gözlenmektedir, ancak esas olarak çok daha karmaşık mekanizmalar ile biyodegrede olur (Weadock ve ark., 1995; Kuijpers ve ark., 2000a ve b; Ozeki ve Tabata, 2005; Fonseca ve ark., 2014; Tondera ve ark., 2016). Jelatinde "Matriks Metalloproteinaz (MMP)" duyarlı bölgeler vardır ve bu enzimlerin katılımı ile fizyolojik koşullarda - *in vivo* biyodegredasyon gerçekleşir. Birçok biyolojik faktör biyodegredasyonu etkiler - örneğin makrofajların ve polimorfonükler hücrelerin de degredasyonda rol aldığı rapor edilmiştir. Enzimler - örneğin kollajenaz, jelatinazlar (MMP2 ve MMP9) ve diğer proteinazların - degredasyona doğrudan yer aldığı bilinmektedir. Kollejenaz enzimi önemlidir - çeşitli dokularda kollajen yapının yeniden şekillenmesin de ("remodelling") kullanılmak üzere vücutta sentezlenen bir enzimdir - ancak - kolaylıkla tahmin edileceği gibi - kollajenin denatüre formu olan jelatin ana zincirini ("backbone") de degrede eder. Suyun etkisi ile basit hidrolitik degredasyonda önemlidir. Özellikle küçük su moleküllerinin jelatin matriksin içinde degredasyonu başlatıp network yapıyı açması - çapraz bağ yoğunluğunun azalması ile gözeneklerin/ boşlukların büyümesi sonucu biyolojik moleküllerin (örneğin enzimlerin) jelatin hidrojel içine difüzyonu kolaylaşır/hızlanır ve biyodegredasyon etkin olur. Genel bir ifadeyle daha çok su taşıyan/daha çok şişmiş (çapraz bağ yoğunluğu düşük) jelatin

matrikslerin daha hızlı degrede olacağını ifade etmek mümkündür (Tabata ve Ikada, 1989; Tabata ve ark., 1994; Weadock ve ark., 1995; Weadock ve ark., 1996; Tabata ve Ikada, 1999; Hong ve ark., 2000; Yamamoto ve ark., 2000; Ozeki ve ark., 2001; Yamamoto ve ark., 2003; Ozeki ve Tabata, 2005; Tajima ve Tabata, 2013; Tajima ve Tabata, 2017). Görüldüğü gibi vücudda (*in vivo*) jelatin degredasyonu bir çok mekanizmanın rol aldığı esasen çok basit gözüken ancak tersine oldukça karmaşık bir degredasyondur. Dolayısıyla tez kapsamında bu bölümde yapılan çalışmaların *in vivo* biyodegredasyonu temsil etmek/tahmin etmek üzere yapılmadığı önemle not edilmelidir. Bu bölümün amacı - tez kapsamında üretilen farklı çapraz bağ yoğunluğudaki jelatin mikroküreleri degredasyonlarını karşılaştırmak ve benzer literatür çalışmalarında benzer *in vitro* koşullarında elde edilen/rapor edilen bulgular ile karşılaştırılma sağlanmasıdır.

Tez kapsamında üç farklı GA/jelatin oranında (0,05; 0,10 ve 0,20 mg/mg) GA kullanılarak çapraz bağlanan jelatin mikroküreleri HCl ile asidik/hızlandırılmış hidrolizi ve kollajenaz kullanılarak enzimatik *in vitro* degredasyonu araştırılmıştır. Birinci grupta asidik degredasyonda HCl içindeki degredasyon incelenmiştir (Şekil 3.7). Görüldüğü gibi mikroküreleri HCl içinde hidrolizi/degredasyonu oldukça hızlıdır - ilk 2 saatte matriksin hemen hemen %10-40'ı degrede olmaktadır - degredasyon 6-10 saat civarında tamamlanmaktadır. Degredasyon hızları arasındaki farkın jelatin mikroküreleri çapraz bağlanmanın bir göstergesi olduğu ancak bu veriler ile jelatin mikroküreleri olası *in vivo* degredasyon süreleri arasında herhangi bir simülasyon yapılamayacağı önemle not edilmelidir. Tabata grubu benzer çalışmalarında çapraz bağlanma yöntemi ve çapraz bağ yoğunluğuna bağlı olarak jelatin mikroküreleri HCl ile degredasyonunda benzer sonuçlar rapor etmişlerdir - kullandıkları en yüksek çağraz bağ yoğunluğuna sahip jelatin matrikslerin dahi yaklaşık 12 saat civarında büyük bir bölümünün degrede olduğunu bildirmişlerdir (Tajima ve Tabata, 2013; Tajima ve Tabata, 2017).

Tez kapsamında kimyasal olarak GA kullanılarak farklı derecelerde çapraz bağlanan jelatin mikroküreleri - PBS içinde 37°C'de enzimatik degredasyonu da incelenmiştir. Önceki bölümlerde söz edildiği gibi kollejenaz *in vivo* degredasyonda önemli yer alan - kollajene özgün bir enzimdir ancak jelatini de çok etkin olarak degrede eder - dolayısıyla jelatinden hazırlanan farklı çapraz bağ yapısına sahip matrikslerin enzimatik degredasyonunu tanımlamak için kullanılır (Tabata ve ark.,

1994; Tabata ve Ikada, 1999; Hong ve ark., 2000; Yamamoto ve ark., 2000; Ozeki ve ark., 2001; Yamamoto ve ark., 2003; Ozeki ve Tabata, 2005; Tajima ve Tabata, 2013; Tajima ve Tabata, 2017). Kollajenaz HCl'e göre daha büyük bir moleküldür - jelatini degrede edebilmesi için difüzyonla jelatin matriks içine girmesi gerekir - enzimatik reaksiyon (degredasyon) hızlı da olsa bu difüzyon basamağı kısıtlayıcı basamak olması beklenir. Ancak, bu tezde degredasyon testlerine kuru jelatin mikroküreler ile başlandığı önemle not edilmelidir. Mikroküreler degredasyon ortamında hızla şişerken ortamdaki enziminde bulunduğu sıvı fazı içlerine çekmektedir. Dolayısıyla enzimin mikroküre içine difüzyonu söz konusu değildir - difüzyon kısıtlaması yoktur. Genel olarak enzimatik degredasyon HCl deki hidrolize göre daha hızlı olduğundan enzimatik degredasyon hızları (Şekil 3.8) HCl deki degredasyona göre (Şekil 3.7) daha hızlıdır. Enzimatik degredasyonda 2 saat içinde kalan kütle yüzdesi 6-22 arasıdır ve yaklaşık 6-8 saat içinde tüm kütle degrede olmaktadır. Bir kez daha ifade edilmesi gerekirse enzimatik degredasyon sonuçları *in vivo* biyodegredasyonu tanımlamak için kullanılamaz - ancak sunulan tezde olduğu gibi farklı derecelerde çapraz bağlı matriksleri degredasyon yönünden farklılığını gösterir - bir kez daha önemle vurgulanmalıdır.

### 4.2.3. Jelatin mikroküre lerden bakteriyofaj salımı

Tez kapsamında üç farklı GA/jelatin oranı: 0,05, 0,10 ve 0,20 mg/mg kullanılarak GA ile kimyasal olarak çapraz bağlanan mikroküre lere bakteriyofaj yüklenmesi gerçekleştirilmiş ve *in vitro* salımları incelenmiştir. Yükleme çok basit bir teknikle yapılmıştır. Kuru jelatin mikroküreler, sulu ortama konulunca çevredeki sıvının tamamını içlerine çekip şişmektedir - bu tipik bir hidrojel davranışıdır - mikroküreler çapraz bağlı olduğu için suda çözünmemekte, ancak çapraz bağ yoğunluğuna göre farklı miktarlarda şişmektedir. Mikroküre lerin şişme dereceleri dikkate alınarak kaba konulan sıvı fazı tamamen emecekleri şekilde bir ön analiz yapılmış - buna uygun olarak ortama konulan bakteriyofaj nanoemülsiyonunu tamamen emerek şişmeleri sağlanmıştır - dolayısıyla yükleme verimi hemen hemen %100 dür. Bu yaklaşımla sıvı fazın bileşiminin (konsantrasyonunun) değiştirilmesi ile mikroküre lere istenilen miktarda aktif ajanın çok etkin/kayıp olmadan yüklenmesi mümkün olmaktadır - çok basit ancak çok yararlı/etkin bir yükleme şeklidir.

Tez kapsamında bakteriyofaj salımının çapraz bağlama derecesine göre değişimini izlemek için üç farklı miktarda çapraz bağlayıcı (GA) kullanılarak üç farklı çapraz bağ yoğunluğunda çapraz bağlanmış jelatin mikrokürelerden bakteriyofaj salımı incelenmiştir. GA/jelatin oranı, 0,05 ile 0,20 arasında değiştirilmiştir. Şekil 3.9A ve B'de görüldüğü gibi salım hızları başlangıçta oldukça yüksektir - yaklaşık 6 saat içinde yüklenen bakteriyofajlarin %50-70'i salınmaktadır. Salım daha sonra yavaşlamaktadır - yaklaşık 24 saatte yüklenen bakteriyofajların hemen hemen tamamı salınmaktadır. Bu tez kapsamında geliştirilmesi amaçlanan - enfekte yaraların bakteriyofajlar kullanılarak iyileştirilmesinde kullanılacak "bakteriyofaj taşıyan/salan jelatin mikrokürelerin" - uygulamanın başında yüksek hızlarda (dozlarda) salınarak etkin kullanımının sağlanması öngörülmüştür. Dolayısıyla tez kapsamında bu öngörüye ulaşıldığı söylenebilir.

Salım eğrilerinin şeklini - jelatin mikrokürelerden bakteriyofaj salımını şöyle yorumlamak mümkündür: Bakteriyofaj salımı başlangıçta hızlı ancak ani ("burst") salım şeklinde değildir. Bu yükleme sırasında bakteriyofajların yalnızca mikroküre yüzeyine yakın bölgelere değil iç tarafa da ulaştığını göstermektedir. Bu uygulanan yükleme yaklaşımı sonucudur. Kuru mikroküreler şişerken içinde bulundukları sıvı ortamı tamamen emerek şişmektedir. Sıvı fazda (nanoemülsiyonda) bakteriyofajlar homojen dağıldığı için yükleme de homojen olmaktadır. Salım sırasında yüzeye yakın bakteriyofajlar önce çıkmakta daha sonra daha derinde olanlar difüzyonla yüzeye gelip salınmaktadır. Bu tipik bir difüzyon şeklinde kütle transferidir. Sürücü kuvvet - konsantrasyon farkı sonucu difüzyon katsayısına bağlı olarak önce hızlı olan salım - mikroküre içinde konsantrasyonun zamanla düşmesi sonucu (sürücü kuvvetin azalması) - yavaşlamaktadır.

Jelatin mikrokürelerde çapraz bağ yoğunluğunun değişmesi ile salım eğrilerinin görünür şekilde değiştiği not edilmelidir. Salım eğrisi şekli değişmese de çapraz bağ yoğunluğunun artması ile salım hızının düştüğü görülmektedir. Bunu yine basit "difüzyonla kütle transferi" prensipleri ile açıklamak mümkündür. Çapraz bağ yoğunluğu artınca bakteriyofajların mikroküre içinde hareket kabiliyetleri, başka bir ifadeyle difüzyon katsayıları düşmektedir. Dolayısıyla salım yavaşlamaktadır. Sunulan tez kapsamında çapraz bağ yoğunluğunu belli/hedeflenen aralıkta değiştirilmiştir. Bu aralıkta hazırlanan mikroküreler %90'ın üzerinde şişmekte ve sıvı ortamı içine

çekmektedir. Daha yüksek çapraz bağlanmalara çıkılarak mikroküreler mekanik olarak güçlendirilebilir, ancak difüzyon ve degredasyonun hızları azalır. Bu istenmediği için tez kapsamında daha yüksek çapraz bağ yoğunluklarına çıkılmamıştır. Daha düşük çapraz bağlanmada ise tam tersi durumlar söz konusudur, daha zayıf, difüzyon ve degredasyonun hızlarının daha yüksek olması beklenir - bunlar tez kapsamında hedeflenen uygulamalar için istenmeyen özelliklerdir - dolayısıyla daha düşük çapraz bağ yoğunluğunda çalışılmamıştır.

Özellikle Tabata grubu jelatin mikrokürelere çok farklı aktif ajanlar yükleme/kontrollu salımını çalışmışlardır (Hirayama ve ark., 2018, Hong ve ark., 2000, Esaki ve ark., 2007, Ozeki ve Tabata, 2005, Tabata ve ark., 1994, Tajima ve Tabata, 2013, Tajima ve Tabata, 2017, Yamamato ve ark., 2003). Bu amaçla jelatinin farklı IEP'ye sahip formları veya bunların modifiye formları seçilmektedir. En yaygın olarak kullnılan bazik ve asidik jelatinlerin IEP'leri sırasıyla 9,0 ve 5,0 dır. Dolayısıyla fizyolojik pH da bunların elektrostatik olarak sırasıyla net pozitif ve net negatif oldukları not edilmelidir (Ozeki ve Tabata, 2005). Bakteriyofaj yükleme ve salım çalışmalarında elektrostatik etkileşmeyi en aza indirmek ve fajların uygulama sırasında erken salımını sağlamak için bazik jelatin seçilmiştir. Elektrostatik etkileşme olsa idi bakteriyofaj salım grafiklerinde fajların tamamen salınmadığı plato değerleri gözlenecekti. Oysa, Şekil 3.9A'daki eğrilerde böyle bir salım davranışı gözlenmemiştir.

Önceki bölümlerde açıklandığı gibi T4 fajının 3D yapısı ve özellikle farklı bölgelerde yer alan proteinlerin moleküler düzeyde yapıları çok ayrıntılı olarak incelenmiş - tanımlanmıştır (Bradley, 1963; Leiman ve ark., 2003; Miller ve ark., 2003; Kutter and Sulakvelidze, 2004; Aksyuk ve ark., 2009; Black ve ark., 2012; Fokine ve ark., 2013; Yap ve Rossman, 2014; Szemer-Olearnik ve ark., 2017). Buna karşın, bu karmaşık yapı/bileşim nedeniyle pH a bağlı net yük değişiminin ve bunun dağılımını tam olarak ifade etmek mümkün değildir. Yalnızca kapsidin isolektrik noktasının - pKA değerinin 4.8-6.2 arasında olduğu ifade edilmektedir - kuyruk ve fiberler de dahil edildiğinde T4 fajının ortalama pKa değerinin 4 civarında olduğu rapor edilmiştir (Cummings ve ark., 1970; Childs ve Bimboim, 1975; Showe ve ark., 1978; Archer ve Liu, 2009; Michen ve Graule, 2010). Kapsid üzerinde negatif/pozitif yük dağılımı tam olarak bilinmese de fizyolojik pH değerlerinde kapsidin (T4 fajı baş kısmının) net yükünün negatif olduğunu söylemek mümkündür - buna karşın bakteriyi tanıyan ve

bakteri üzerine yerleşen kuyruk fiberlerinin ucu pozitif yüklü olup negatif yüzey yüküne sahip *E. coli* ile elektrostatik etkileştiği not edilmelidir (Kutter ve Sulakvelidze, 2004). Önceki paragraftada söz edildiği gibi - fizyolojik koşullarda (yaklaşık pH: 7.4'de) mikrokürlerden salımın yalnızca difüzyon kontrollu olmasını sağlamak, elektrostatik etkileşmeleri en aza indirimek için - bakteriyofaj IEP si de dikkate alınarak - bazik jelatin kullanılmıştır.

### 4.2.4. Jelatin mikrokürelerden bFGF salımı

Sunulan tezin temel hedefi önceki bölümlerde de belirtildiği gibi diyabetik ayak ülserleri gibi şiddetli enfeksiyon ve doku kayıpları ile seyreden durumlarda kullanılmak üzere biyohibrid doku mühendisliği materyalleri geliştirmektir. Sonraki bölümde açıklandığı gibi jelatin mikroküreler üzerinde oluşturulan MHK kümeleri ile doku onarımı sağlanması amaçlanmaktadır. Doku rejenerasyonunun artırılması için - özellikle damar oluşumunu (anjiyogenez) sağlamak üzere sunulan tez kapsamında jelatin mikrokürelere bFGF yüklemesi ve salımı çalışılmıştır. Önceki bölümde tartışılan bakteriyofaj yükleme ve salımından farklı olarak bFGF salımının çok daha yavaş olması ("geciktirilmiş salım") - hatta jelatin mikrokürelerin *in vivo* uygulamada doku rejenerasyonu süresince jelatin matriks degredasyonu ile birlikte yürümesi öngörülmüştür.

bFGF büyüme faktörleri arasında doku mühendisliği yaklaşımı ile birçok dokunun (deri, kemik, kıkırdak, sinir, kalp, vb.) onarımı/rejenerasyonunda kullanılan - en başarılı büyüme faktörleri arasında gelmektedir (Gospodarowizc ve ark., 1987; Thompson ve ark., 1988; Aebischer ve ark., 1989; Rifkin ve Moscatlli, 1989; Kawaguchi, ve ark., 1994; Laquerriere ve ark., 1994; Nakamura, ve ark., 1995; Schiehake ve ark., 1995; Trippel, 1995; Lind, 1996; Wang, 1996; Stocum, 1997; Taipale ve Keski-Oja, 1997; Hong ve ark., 1998a; Hong ve ark., 1998b; Ikada ve Tabata, 1998; Yamamoto ve ark., 1998; Tabata ve ark., 1999b; Hong ve ark., 2000; Tabata ve ark., 2000a; Tabata ve ark., 2000c; Ozeki ve ark., 2001; Liberman ve ark., 2002; Fukunaka ve ark., 2002; Balamurugan ve ark., 2003; Yamamoto ve ark., 2003; Young ve ark., 2005; Kushibiki ve ark., 2006; Tabata, 2006; Yamamoto ve ark., 2006; Esaki ve ark., 2007; Kikuchi, ve ark., 2008; Takahashi ve ark., 2007; Patel ve ark., 2008a; Patel ve ark., 2008b; Asamura ve ark., 2010; Kimura ve Tabata, 2010; Li ve ark., 2011; Odabas ve ark., 2013; Inci ve ark., 2014; Kabuto ve ark., 2015; Nguyen ve

ark., 2015; Gnavi ve ark., 2017; Turner ve ark., 2017; Caballero Aguilar ve ark., 2019; Buie ve ark., 2020).

Genel Bilgiler Bölümünde söz edildiği gibi, birçok büyüme faktörü serbest halde kullanıldığında hızla aktivasyonunu kaybetmesi nedeniyle kontrollu salım sistemlerinde aktivitesini koruyarak uzun dönemli salımı ile ilgili çalışmalar önem kazanmıştır. bFGF'in kontrollu salımı 1990 lı yıllardan başlıyarak uzun yıllar yoğun olarak çalışılmıştır - farklı matriksler kullanılmıştır, en başarılı matrikslerden biride - bu tezde de kullanılan jelatindir (Edelman ve ark., 1991; Rosenblum ve ark., 1993; Tabata ve ark., 1994; Taipale ve Keski-Oja, 1997; Tabata ve ark., 1998a; Tabata ve ark., 1998b; Tabata ve ark., 1999a; Tabata ve ark., 1999c; Tabata ve ark., 1999d; Tabata ve Ikada, 1999; Tabata ve ark., 2000b; Iwakura ve ark., 2001; Iwakura ve ark., 2003; Kimura ve ark., 2002; Kimura ve ark., 2003; Saso ve ark., 2003; Nakajima ve ark., 2004; Okamoto, T., 2004; Rosenblatt-Velin ve ark., 2005; Hiraoka ve ark., 2006; Igai ve ark., 2006; Doi ve ark., 2007; Akagawa ve ark., 2008; Ichinohe ve ark., 2008; Takehara ve ark., 2008; Zhu ve ark., 2008; Watanabe ve ark., 2010; Garbern ve ark., 2011; Kumagai ve ark., 2016; Turner ve ark., 2017; Kumagai ve ark., 2018; Li ve ark., 2018; Washio ve ark., 2019; Buie ve ark., 2020).

bFGF'in izoelektrik noktası (IEP'si): 9,6 yani fizyolojik pH'da net yükü pozitiftir. Vücutta denature ve enzimatik degredasyonan uğramaması için ekstraselüler matrikste asidik polisakkaritler (heparin sülfat ve heparin) ile iyonik kompleks oluşturur - dolayısıyla stabil kalır (Gospodarowizc ve ark., 1987; Rifkin ve Moscatlli, 1989; Edelman ve ark., 1991). Bu çalışmalar özellikle Tabata grubuna önemli bir ip ucu vermiştir. Özellikle asidik jelatin ile (IEP'si 5,0 olan) ile bFGF'in iyonik kompleks oluşumunu ve bu jelatinle hazırlanan matrikslerden bFGF geçiktirilmiş salımını ilk rapor edenlerdir (Tabata ve ark., 1994; Tabata ve Ikada, 1998, Tabata ve ark., 1999). Bu grup sonraki yıllarda da bFGF taşıyan/geçiktirilmiş salan jelatin matriksleri bir çok doku onarımında başarıyla uygulamışlar - hatta klinik testlere kadar ulaşmışlardır. Karşılaştırmalı yaptıkları *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda bazik jelatin kullanıldığında (IEP'si 9,0 olan) bFGF hızla hemen bir gün içinde salınırken, asitik jelatin durumunda ilk bir gün içinde bFGF in yaklaşık %30 u hızla salınmış büyük bir bölümü ile bFGF ve asidik jelatin moleküllerinin iyonik etkileşimi - iyonik kompleks oluşturması sonucunda matrikste kalmıştır. Muhtemelen bu salınan %30 jelatin molekülleri ile etileşmeyen sulu

çözeltide serbest bulunan bFGF molekülleridir. *In vivo* jelatin degredasyonu enzimatik olmaktadır - dolayısıyla kalan bFGF'in de vücutta zaman içinde jelatin degredasyonuna bağlı olarak ortaya çıkacağı ve kullanılacağını ifade etmişlerdir, doğru bir varsayımdır.

Sunulan tez kapsamında öncelikle/karşılaştırma sağlamak üzere bakteriyofaj yükleme ve salımında incelenen üç farklı GA/jelatin oranı: 0,05; 0,10 ve 0,20 mg/mg kullanılarak GA ile kimyasal olarak çapraz bağlanan mikrokürelere bFGF yüklemesi ve *in vitro* salımları araştırılmıştır. Bazik jelatin kullanılarak hazırlanan bu jelatin mikrokürelerden bFGF salımı (Şekil 3.10), bakteriyofaj salım hızlarıyla (Şekil 3.9) karşılaştırıldığında burada çapraz bağlanma yoğunluğunun bFGF salımına etkisinin daha az olduğu görülmektedir. Tabata grubunun benzer çalışmalarında gösterildiği gibi bazik jelatin ve bFGF in IEP değerleri sırasıyla 9,0 ve 9,6'dır - dolayısıyla jelatin matriks ile bFGF moleküllerinin elektrostatik çekimi söz konusu değildir - tam tersi elektrostatik itme gerçekleşir, bFGF molekülleri matriks ile etkileşmez ve bunun sonucu yaklaşık 24 saatte tamamı salınır. Çapraz bağ yoğunluğu arttıkça bFGF in matriks içindeki su fazında difüzyonu düşeceği için salım hızında azalmalar görülmektedir.

Önceki bölümlerde tartışılan literatür çalışmaları dikkate alınarak sunulan tez kapsamında bazik jelatin yanısıra asidik jelatinden hazırlanan jelatin mikrokürelere (JM4 ile tanımlanan) bFGF yüklemesi ve salımı da incelenmiştir. Asidik jelatin kullanılarak hazırlanan örnek jelatin mikrokürelerden bFGF salımı bazik olanlardan oldukça farklıdır. Asidik jelatin'in IEP değeri 5,0 dır. Daha önce de belirtildiği gibi asidik jelatin doğal kollajen dokusunun alkalin proses ile işlenmesi ile hazırlanır. Bu prosesde kollajendeki amid bağları parçalanarak karboksilik asite dönüşür - negatif yük veren karboksilik asit miktarı artar bu da IEP değerinde düşme ile kendini gösterir. Bu bölümde kullanılan asidik jelatinin fizyolojik pH'da (burada PBS'de - pH: 7,4) jelatin matriks net yükünün negatif olduğu söylenebilir. Oysa bFGF molekülünün IEP'si 9,6 olup fizyolojik pH da pozitif yüklüdür. Elektrostatik çekim kuvvetleri bFGF moleküllerinin jelatin matrikse adsorpsiyonuna neden olur, ve jelatin mikroküre iç yüzeylerine bağlı olan bu moleküller salınması gecikir - ancak jelatin matriks degredasyonuna bağlı olarak çok daha uzun sürede salınır. Bu nedenle beklendiği gibi jelatin mikrokürelere yüklenen bFGF'in yaklaşık %55 i 48 saat sonra dahi matrikse bağlanmış (elektrostatik çekim kuvvetleri nedeniyle) durumda kalmıştır (Şekil 3.10).

Sunulan tezin - jelatin mikrokürelerin enzimatik degredasyonu bölümünde tartışıldığı gibi, jelatin *in vivo* degredasyonu oldukça komplekstir. *In vitro* çalışma sonuçları ile *in vivo* için beklenen korelasyonun doğru yapılması söz konusu değildir. Dolayısıyla JM4 mikrokürelerden bFGF salımı 48 saatten daha uzun süre çalışılmasına gerek görülmemiştir. Büyük olasılıkla *in vivo* uygulamada jelatin mikrokürelere bağlı olarak kalan bFGF molekülleri (burada %55 civarındadır) jelatin mikrokürelerden yalnızca difüzyon ile değil - çok daha önemli olarak matriks degredasyonu sonucunda salınacaktır. Ancak bu veriler ile *in vivo* salım konusunda daha fazla tartışma/yorum yapmak uygun olmayacağı önemle not edilmelidir.

Sonuç olarak, bakteriyofaj salımından farklı olarak bFGF salımı için asidik jelatin mikrokürelerin kullanılmasının çok daha uygun olacağı söylenebilir - bu sürpriz bir bulgu değildir. Tabata grubu zaten bunu önceki çalışmalarında göstermişler/ önermişlerdir. Bu tezde başlangıçta bakteriyofajlar ile bFGF in aynı mikrokürelere - birlikte yüklenmesi ve salımı öngörülmüştür. Ancak burada aynı matriksler ile çalışılınca görüşümüz değişmiş ve bu iki aktif ajanın faklı mikrokürelere yüklenip farklı ürünler olarak değerlendirilmesine karar verilmiştir. Böylece hayvan modelinde ugulanacak kombine tedavide her küreden istenilen miktarda alınıp karıştırılıp uygulanacaktır. Jelatin mikrokürelere yükleme sonradan yapıldığı için bFGF yüklemesine göre başlangıç sıvı faz konsantrasyonu ve jelatin mikroküre miktarı ayarlanarak istenilen doz ve hızda salım mümkün olacaktır.

### 4.3. Mezenkimal Kök Hücreler ve Hücre Kümeleri

#### 4.3.1. Kök hücreler

Sunulan tez kapsamında 6 adet 7 haftalık dişi fareden, klasik sayılabilecek protokollar ile başarılı bir şekilde adipoz doku elde edilmiş, hücreler ayrılmış ve hücre kümelerinin oluşturulması için yeteri kadar MKH üretebilmek için 2B tek tabakalı hücre kültür çalışmaları yapılmıştır. Şekil 3.12'de örnekleri sunulduğu gibi hücre kültürünün başlangıç bölümlerinde yüzeye yapışan/yayılan hücre sayısı beklendiği gibi azdır - ilgili birçok kaynakta da benzer görüntüler söz konusudur - yağ dokusundan izole ettiğimiz MKHler tipik fibroblastik hücre yapısı sergilemektedir. Yaklaşık 7-10 gün sonra, tripsinizasyon öncesinde petri kaplarının yüzeyleri %70-80 konflükte olmuş durumdadır ve yüzey hücre yoğunluğu 1-2x$10^4$ hücre/$cm^2$'e değerlerine ulaşmaktadır. 2. ve 3. pasajlamada hücrelerde değişimler gözlenmektedir. Gelişmiş adipoz hücreler dikkati

çekmektedir. Hatta, farklılaştırma ortamı kullanılmamış olsa da yer yer, özellikle kıkırdak hücrelere farklılaşma olduğu gözlenmiştir. Hücrelerin akış sitometresi ile karakterizasyonu ve farklı farklılaşma ortamları kullanılarak farklılaşmalar/ hücresel/ moleküler karakterizasyonları ile ilgili çalışmalarımız devam etmektedir - ancak sunulan tez kapsamına dahil edilmemiştir. Sunulan tez de temel hedef bakteriyofaj/ bFGF yüklemesi/salımı ve yağ dokusundan elde edilen 2B kültürler ile deneysel kullanım için yeteri kadar MKH üretmek ve bunları tez kapsamında üretilen jelatin mikrokürelerle birlikte kümeleştirerek - 3B biyohibridlerin hazırlanması ile ilgili ön çalışmalar yapmaktır. Dolayısıyla, %70-80 konflükte olan yüzeylerden tripsinizasyonla ayrılan hücrelerden $1x10^3$ hücre/ml yoğunluğunda MKH süspansiyonları hazırlanmış ve sonraki bölümde sunulan 3D kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

### 4.3.2. Kök hücre kümeleri

Önceki bölümde açıklandığı gibi çok kuyucuklu dibi yuvarlak hücre kültür kapları PVA ile kaplanarak hidrofilik hale getirilmiş ve hücre yapışması önlenmiş - MKHlerin yalnız başına veya jelatin mikroküreler ile birlikte kümeleşmesi sağlanmıştır. Tez kapsamında başlangıçta kültür kabının her kuyucuğa konan hücre ve mikroküre miktarları sabit tutulmuştur. Tabata grubu önceki çalışmalarında farklı türde (hem primer hücreler hem de hücre hatları) ve miktarlarda hücre; ve farklı miktar ve boyutlarda jelatin mikroküre kullanarak benzer kümeler hazırlamışlardır (Tabata ve ark., 1999a; Tabata ve ark., 1999b; Hori ve ark., 2004; Takahashi ve ark., 2005; Hiraoka ve ark., 2006; Lin ve Chang, 2008; Mohan ve ark., 2009; Narita ve ark., 2009; Kimara ve Tabata, 2010; Bratt-Leal ve ark., 2011; Hayashi ve Tabata, 2011; Baraniak ve ark., 2012; Tajima ve Tabata, 2012; Tajima ve Tabata, 2017; Hirayama ve ark., 2018; Inoo ve ark., 2018; Sulaiman ve ark., 2020). Sunulan tez kapsamında tüm bu çalışmalarından sonuçlarından yararlanılmış ve yalnızca seçilen/belirtilen hücre ve mikroküre konsantrasyonu ve bağıl oranında çalışılmıştır.

Araştırma grubunun bu çalışmalarından öne çıkan/önemli bulgular/tartışmaları şöyledir: Mikroküre olmadan yalnızca hücrelerden 3B kümeler oluşturmak mümkündür. Ancak, hücre sayısı arttıkça küme boyutu artmakta ve hücre gelişmesi için gerekli oksijen ve besin transferinde zorluklar nedeniyle (basitçe difüzyon bariyeri sonucu) kümelerin iç bölümlerinde hücre ölümleri gerçekleşmektedir. Bu durum esasen farklı yöntemler ile hazırlanan tüm 3B hücre kümelerinde - "steroidlerde" de gözlenmektedir (Lin ve Chang, 2008; Hayashi ve Tabata, 2011; Tajima ve Tabata, 2012; Sart ve ark.,

2014; Antoni ve ark., 2015; Chatzinikolaidou, 2016; McKee ve Chaudhry, 2017; Laschke ve Menger, 2017a; Laschke ve Menger, 2017b; Yang ve ark., 2020). 3B yapıların iç bölümlerinde hücre ölümleri kaçınılmazdır ve çözüm bekleyen önemli bir husustur. Sunulan tez kapsamında kümelerin oluşturulmasında düşük sayılabilecek değerlerde hücre kullanılmış olsa da hücre ölümleri dikkati çekmektedir. Şüphesiz daha küçük kümeler oluşturarak bu boyut nedeniyle ölümler azaltılabilir. Ancak hücre büyümesi/gelişmesi olmaya başlayınca boy büyüyeceğinden sorun tekrar ortaya çıkacaktır. Dolayısıyla sayıyı azaltmak iyi bir çözüm olarak değerlendirilmemelidir.

Sunulan tez kapsamında temel hedeflerden biri olan 3B kümelerde jelatin mikrokürelerin kullanılmasıdır. Tabata grubunun uzun yıllardır birçok uygulamada kullandığı bu yaklaşımda özellikle besiyerinde/kültür ortamında şişmiş jelatin mikroküreleri ile birlikte hücre kümelerinin oluşturulması önemli bir gelişme sağlamıştır. Böylece özellikle difüzyon kısıtlamaları azaltılabilmekte ve hücre gelişmesi canlılığı sağlanabilmektedir. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda da benzer davranışlar gözlenmiştir. Şekil 3.13'deki örnek fotoğraflarda görüleceği gibi jelatin mikroküreler kullanılmadan hazırlanan MKH kümelerinde 7 günlük sürede olası hücre ölümleri nedeniyle boy önemli oranda küçülmektedir. Buna karşın jelatin mikrokürelerin varlığında hazırlanan biyohibrid kümelerde küme gelişmekte, olgunlaşmakta ve büyümektedir. Şekil 3.14'deki bulgular bu görüntüleri/değişimleri desteklemektedir. MKH + jelatin mikrokürelerde hücre canlılığı 2B tek tabakalı kültürlerde gözlenen gibidir, hatta 7 günlük inkübasyonda - aynı hücre sayısı ile başlansa da MKH+jelatin mikroküre grubunda - 3B kültürde ulaşılan canlı hücre sayısı 2B kültüre göre çok bariz şekilde yukarıdadır. Buna karşın yalnızca MKH kümelerinde (jelatin mikroküre bulunmayan) 7 günlük sürede hücre ölümleri önemli boyuttadır.

Tabata grubu yaptıkları çalışmalarda başlanan mikroküre sayısını sabit tutup mikroküre boyutlarını değiştirmişlerdir. Mikroküre boyutları artıkça kümeler daha iyi gelişmekte ve buna bağlı olarak canlı hücre sayısı daha yüksek olmaktadır. Ancak mikroküre boyutun artması ile hücre-hücre kontaklarının daha zor olduğu göz önüne alınmalıdır. Kümenin bir arada tek parça kalması zorlaşmaktadır - küme fiziksel olarak zayıflamaktadır. Sunulan tezin bu grubundaki deneyler planlanırken bu hususa dikkat edilmiş ve şişmiş küre boyutu 80-90 μm olacak şekilde seçilmiştir. Bunun sonucu 7 günlük inkübasyon sonucunda, hücrelerin gelişmesi/çoğalması ve birbirine bağlı

durması ile oluşan - hücre ağ yapısı, Şekil 3.13'de örneklendiği gibi kümenin fiziksel olarak tek parça olmasını sağlamıştır.

Biyohibrid yapıların boyutu ve performansını etkileyen parametrelerden biri de şüphesiz başlangıçta kullanılan hücre/jelatin mikroküre sayısal oranıdır. Bu oran yalnızca elde edilen küme boyutlarını değil performansını da etkilemektedir. Tabata grubu bu parametrenin etkilerini ayrıntılı olarak çalışmışlardır. Yüksek performans gözlenen - fiziksel stabilitesi yeterli düzeyde biyohibrid kümeler oluşturmak için $10^3/10^4$ hücre/jelatin mikroküre sayısal oranında başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Bu gözlemleri değerlendirilerek sunulan tez kapsamında da bu oran ile başlanarak kümeler oluşturulmuştur.

3B biyohibrid kümelerde performans göstergelerinden biri de metabolik aktivite ölçümlerdir. Tabata grubunun önceki benzer çalışmaları da dikkate alınarak, 7 günlük inkübasyon süresince hücrelerin kullandığı glikoz ve ürettiği L-laktik asit değişimleri ölçülmüş ve önerildiği/rapor edildiği gibi L-laktik asit üretim/glikoz kullanım oranı metabolik aktivite göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Şekil 3.15'de verilen sonuçlar bununla ilgilidir. Bu oran aerobik mekanizmanın ne kadar başarılı çalıştığını belirten bir göstergedir - ne kadar düşük ise aerobik mekanizmanın o kadar iyi dolduğu ifade edilmektedir (Hayashi ve Tabata, 2011; Baraniak ve ark., 2012; Tajima ve Tabata, 2012; Tajima ve Tabata, 2017; Hirayama ve ark., 2018; Inoo ve ark., 2018; Sulaiman ve ark., 2020). 2B tek tabakalı hücre kültürü ile MKH + jelatin mikroküre kümelerinin 3B kültür sonuçlarını karşılaştıran Şekil 3.15C'deki verileri şöyle okumak mümkündür: Başlangıçta 3B kültür de difüzyon kısıtlamalarına karşın aerobik mekanizma daha iyi çalıştığı görülmektedir – 3B kültürde hücre-hücre kontağının çok daha iyi olması ile açıklanabilir. 7 günlük inkübasyon süresi sonunda 2B kültürde de hücre kontakları yeteri kadar artmıştır ve özellikle oksijen difüzyon kısıtlaması olmadığı için metabolik aktivite daha yüksektir (daha düşük L-laktik asit/glikoz oranı). Hücre sayısı arttıkça ve hücre ağ yapısı sıklaştıkça difüzyon kısıtlamalarının ortaya çıkması beklenen bir sonuçtur. Bu da metabolik aktivitenin 2B ye göre daha düşük olması ile kendini göstermektedir.

Buraya kadar sunulan/tartışılan bölüm özet şekilde jelatin mikroküre kullanılarak hazırlanan 3B MKH biyohibridlerinin 2B kültüre göre çok daha iyi bir alternatif olduğunu göstermektedir. Hücre türüne göre yapılacak optimizasyon çalışması ile çok başarılı/uygulaması çok kolay biyohibrid doku mühendisliği ürünlerinin

hazırlanabileceğini göstermektedir. Bu bu tez kapsamında değerlendirilmese de devam eden çalışmalarımızda gözlediğimiz ve ilgili literatürü destekliyen - farklı farklılaştırma ajanları kullanılarak farklı uygulamalar için MKH + jelatin mikroküre biyohibridlerinin hazırlanacağı ifade edilebilir. Özellikle, Tabata grubunun çalışmalarında hücre-hücre kontaklarının çok daha başarılı farklılaşma sağlayacağının gösterilmiş olması 3B kümelerinin kullanılmasına önemli bir destek vermektedir.

Sunulan çalışmada ürettiğimiz jelatin mikrokürelere bFGF yüklemesi ve geciktirilmiş salımı çalışılmış - çok sayıda benzer çalışmaya parallel sonuçlar alınmıştır. Tabata grubunun birçok çalışmada gösterdiği gibi uygulama alanına göre çeşitli büyüme faktörleri/biyoaktif moleküller moleküllerin yüklenmesi ve özellikle geciktirilmiş salımı için jelatin mikroküreler çok uygun taşıyıcılardır. Jelatin mikrokürelerin biyodegredasyon ile zamanla parçalanması ve ortaya amino asitler çıkması da *in vivo* hücre gelişmesine çok önemli katkı sağlayacağı ilgili literatürde ayrıntılı olarak çalışılmış/rapor edilmiştir (Groebe ve Mueller-Klieser, 1996; Kelm ve ark., 2006; Hayashi ve Tabata, 2011; Hirayama ve ark., 2018; Inoo ve ark., 2018). Sunulan tez kapsamında bFGF yüklü jelatin mikrokürler değil yalnızca besiyerinde şişirilmiş mikroküreler kullanılmıştır. Bunun nedeni çalışmaların *in vitro* olmasıdır. Tez kapsamında degredasyon ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Ancak bunlar HCl ile hızlandırılmış hidroliz ve kollajenaz ile hızlandırılmış biyodegredasyondur. GA ile çapraz bağlanmış jelatin mikrokürelerin fizyolojik pH'da *in vitro* degredasyonu çok yavaştır - dolayısyla *in vivo* yu temsil etmez. Dolayısyla, çalışmalarda yalnızca steril hücre besiyerinde şişirilmiş jelatin mikroküreler ile hücre kültür çalışmaları yapılmıştır.

Bakteriyofaj yüklü jelatin mikroküreler ile hücre kültür çalışmaları devam etmektedir. Bakteriyofaj salımının hücre gelişmesini olusuz etkilemediği gözlenmiştir. Enfekte yaralarının/doku kayıplarının kombine tedavisi için tez kapsamında geliştirilen biyohibridlerin uygulanacağı *in vivo* hayvan modelleri ile ilgili hazırlıklar tamamlanmıştır. Yakın dönemde gerçekleştirlmesi öngörülmektedir.

# 5. SONUÇ

Sunulan tez kapsamında ulaşılan önemli sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

1. Tez kapsamında hedef bakteri ve T4 bakteriyofajlarını üretmek için kullanılan *E. coli* bakterisi kültür kolleksiyonlarından temin edilmiş, LB besiyerinde büyüme eğrisi elde edilmiş - süspansiyon kültürlerinde gerekli miktarlarda üretilmiştir.
2. Tez kapsamında incelenen temel bileşenlerden olan T4 fajı kültür kolleksiyonlarından temin edilmiş, *E. coli* kullanılarak süspansiyon ortamında çoğaltılmış, $10^9$-$10^{10}$ PFU/ml gibi yüksek konsantrasyonda yeteri miktarda üretilmiştir. Yumuşak agar besiyerinde hedef bakteri - *E. coli* üzerinde test edilerek aktivitesi belirlenmiştir.
3. Jelatin mikrokürler iki adımlı proses ile istenilen boyut aralığında (kuru mikroküre çap aralığı 41-48 μm) üretilmiştir. Bu prosesde önce yağ fazında dağıtılan bazik ve/veya asidik jelatin çözeltisi jelleştirilerek çapraz bağlı olmayan jelatin mikroküreler üretilmiştir. İkinci adımda çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak çapraz bağlanmıştır. 3 farklı GA/jelatin kullanılarak farklı miktarlarda çapraz bağlı jelatin hidrojel mikroküreler elde edilmiştir. Mikrokürelerin su alma kapasiteleri - yüzde şişme değerleri %90 üzerindedir.
4. Farklı derecelerde çapraz bağlı jelatin mikrokürelerin HCl içinde asidik hidrolizi ve kollajenaz kullanılarak *in vitro* enzimatik degredasyonu belirlenmiştir. Her iki ortamda da degredasyonlar hızlıdır ve az da olsa çapraz bağ yoğunluğu ile değiştiği gözlenmiştir. Hemen hemen 10 saat içinde mikrokürelerin tamamı degrede olmaktadır.
5. Kuru mikrokülere bakteriyofaj nanoemülsiyonuna konulmuş ve sıvı fazın tamamı mikrokürelere emilerek, %100 yükleme değerlerine ulaşılmıştır. Jelatin mikroküre çapraz bağ yoğunluğuna bağlı olarak farklı hızlarda ancak bir birine oldukça yakın hızlarda salım gözlenmiştir. Yaklaşık 24 saat içinde bakteriyofajların tamamı salınmıştır.
6. Asidik ve bazik jelatin mikrokürelere bFGF yüklemesi ve salımı incelenmiştir. bFGF, FITC ile floresan işaretlenmiştir. Bazik jelatinden hazırlanan

mikroküreleden bFGF salımı oldukça hızlıdır. Buna karşın asidik jelatinden hazırlanan mikroküreleden bFGF salımı önce hızla seyretmiş ancak daha sonra hemen hemen plato değerine ulaşmış 48 saatte dahi mikroküreler üzerinde yüklenen bFGF in hamen hemen %55'i matriks üzerinde kalmıştır.

7. Farelerin adipoz dokusundan elde edilen MKHler 2B kültürlerde çoğaltılmıştır. Elde edilen hücreler jelatin mikroküreler ile birlikte veya yalnız başlarına 3B kümeleştirilmiştir. Özellikle jelatin varlığında biyohibrid kümelerin 7 gün süresince boyutlarının, canlı hücre sayısının ve metabolik aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir. Jelatin hidrojel mikroküreleerin *in vitro* ortamda dahi hücre gelişmesini önemli oranda desteklediği gösterilmiştir.
8. Devam eden çalışmalarımızda biyohibridlerin diyabetik farelerde enfekte yaraların iyileşmesinde kullanımı ile ilgili çalışma planları tamamlanmıştır – yakın dönemde uygulamaya başlanacaktır.

## KAYNAKÇA


Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2014). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage,* 1, 66-85.

Abedon, S. T., Garcia, P., Mullany, P., & Aminov, R. (2017). Phage Therapy: Past, present and future. *Frontiers in Microbiology*, ebook.

Abdallah, B. M., & Kassem, M. (2008). Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Therapy*, 15, 109-116.

Achilli, T. M., Meyer, J., & Morgan, J. R. (2012). Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opinion Biological Therapeutics,* 12, 1347-1360.

Adams, M. H. (1959). Bacteriophage. New York, Interscience Publishers.

Ahmed, F. E., Lalia, B. S., Hashaikeh, R. (2015). A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications. *Desalination*, 356, 15-30.

Akagawa, Y., Kubo, T., Koretake, K., Hiyasji, K., Doi, K., Matsuura, A., ve ark. (2008). Initial bone regeneration around fenestrated implants in Beagle dogs using basic fibroblast growth factor-gelatin hydrogel complex with varying biodegradation rates. *Journal of Prosthodontics Restoration*, 53, 41-47.

Aksyuk A. A., Leiman, P. G., Kurochkina, L. P., Shneider, M. M., Kostyuchenko, V. A., Mesyanzhinov, V. V., ve ark. (2009). The tail sheath structure of bacteriophage T4: a molecular machine for infecting bacteria. *EMBO Journal*, 28, 821-829.

Akyurekli, C., Le, Y., Richardson, R.B., Fergusson, D., Tay, J., & Allan, D.S. (2015). A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. *Stem Cell Reviews*, 11, 150-160.

Alajati, A., Laib, A.M., & Weber, H. (2008). Spheroid-based engineering of a human vasculature in mice. *Nature Methods,* 55, 439-445.

Alici-Garipcan, A., Korkusuz, P., Bilgic, E., Askin, K., Aydin, H.M., ve ark. (2019). Critical-size alveolar defect treatment via TGF-ß3 and BMP-2 releasing hybrid constructs. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition,* 5, 415-436.

Ali, E., Sultana, S., Hamid, S. B. A., Hossain, M., Yehya, W.A., Kader, A., ve ark. (2018). Gelatin vontroversies in food, pharmaceutical, and personal care products: Authentication methods, current status and future chalanges. *Critical Reviews in Food Science and Nutration*, 58, 1495-1511.

Anany, H., Chen, W., Pelton, R. & Griffiths, M.W. (2011). Biocontrol of Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157:H7 in meat by using phages immobilized on cellulose membranes. *Applied Environmental Microbiology,* 77, 6379-6387.

Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., & Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: A breakthrough *in vivo*. *International Journal of Molecular Science,* 16, 5517-5527.

Archare, M. J., & Liu, J. L. (2009). Bacteriophage T4 nanoparticles as materials in sensor applications: Variables that influence their organization and assembly on surfaces. *Sensors.* 9, 6298-6311.

Arya, S. K., Singh, A., Naidoo, R., Wu, P., McDermott, M. T. & Evoy, S. (2011). Chemically immobilized T4-bacteriophage for specific Escherichia coli detection using surface plasmon resonance. *Analyst,* 136, 486-492.

Asamura, S., Mochizuki, Y., Yamamoto, M., Tabata, Y., & Isogai, N. (2010). Bone regeneration using a bone morphogenetic protein-2 saturated slow-release gelatin hydrogel sheet: evaluation in a canine orbital floor fracture model. *Annual Plastic Surgery,* 64, 496-502.

Asghari, F., Samiei, M., Adibkia, K., Akbarzadeh, A., & Davaran, S. (2016). Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology,* 45, 185-192.

ASM Org - www.asm.org - 2016.

Atala, A. (2004). Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. *Rejuvenation Research,* 7, 15-31.

Azeredo, J., & Sillankorva, S. (2018). Bacteriophage therapy-from lab to clinical practice. *Methods in Molecular Biology*, vol 1693. New York, Humana Press.

Bader, M. S. (2008). Diabetic foot infection. *American Family Physician,* 78, 71-79.

Bajaj, P., Schweller, R. M., Khademhosseini, A., West, J. L., & Bashir, R. (2014). 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine. *Annular Reviews Biomedical Engineering,*16, 247-276.

Bakravi, A., Ahamadian, Y., Hashemi, H., & Namazi, H. (2018). Synthesis of gelatin-based biodegradable hydrogel nanocomposite and their application as drug delivery agent. *Advances in Polymer Technology*, 37, 2625-2635.

Balamurugan, A. N., Gu, Y., Wang, W., Miyamoto, M., Hori, H., Inuue, K., ve ark. (2003) Effect of hepatocyte growth factor (HFG) in mitogen and insulımotropic agent for fetal islet cells in vitro, *Pancreas*, 26, 103-104, 2003.

Balasubramanian, S., Sorokulova, I. B., Vodyanoy, V. J., & Simonian, A. L. (2007). Lytic phage as a specific and selective probe for detection of *Staphylococcus aureus*-A surface plasmon resonance spectroscopic study. *Biosensors Bioelectronics, 22*, 948-955.

Baraniak, P. R., Cooke, M. T., Saeed, R., Kinney, M. A., Fridley, K. M., McDevitt, T. C. (2012). Stiffening of human mesenchymal stem cell spheroid microenvironments induced by incorporation of gelatin microparticles. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials,* 11, 63-71.

Barrow, P. A., & Soothill, J. S. (1997.) Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiology*, 5, 268-271.

Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., & Roveri, N. (2001). Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 22: 763-768.

Bigi, A., Cojazzi, G , Panzavolta, S., Rubini, K., & Roveri, N. ( (2002). Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials,* 23: 4827-4832.

Berthiaume, F., Maguire, T. J., & Yarmush, M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. *Annular Reviews Chemical Biomolecular Engineering,* 2, 403-2443.

Black, L. W., & Rao, V.B. (2012). Structure, assembly, and DNA packaging of the bacteriophage T4 head. *Advances in Virus Research*, 82, 119-153.

Blair, M. (2016). Diabetes mellitus review. *Urologic Nursing,* 36 (1), 27-36.

Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J.

(2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology,* 13, 42-51.

Blattner, F. R., Plunkett, G. I., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., ve ark. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science,* 277, 1453-1474.

Boccaccini, A. R., & Gough, J. E. (2007). Tissue engineering using ceramics and polymers. Cambridge, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.

Bonilla, N., Rojas, M. I., Cruz, G. N. F., Hung, S-H., Rohwer, F., & Barr, J.J. (2016). Phage on tapa quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. *Peer Journal,* 4: 2261.

Borysowski, J., Miedzkybrodzki, R., & Gorski, A. (2014). Phage therapy: Current research and applications. Norfolk, Caister Academic Press.

Boulton, A. J. (1996). The pathogenesis of diabetic foot problems: an overview. *Diabetic Medicine Journal*, 13, 12-16.

Boulton, A. J., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G., & Apelqvist, J. (2005). The global burden of diabetic foot disease. *Lancet,* 366, 1719-1724.

Boulton, A. J. 2006. The diabetic foot. *Medicine,* 34, 87-90.

Bourne, R., Steimeltz, J. D., Flaxman, S., Briant, P. S., Taylor, H. R., Resnikoff, S., ve ark. (2013). Trends in prevalence of blindness and distance and near vision impairment over 30 years: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet Global Health*, 9, 130-143.

Boyce, S. T. & Lalley, A. L. (2018). Tissue engineering of skin and regenerative medicine for wound care. *Burns Trauma,* 6, 4.

Bradley, D. E. (1963). The structure of coliphages. *The Journal General Microbiol*ogy, 31, 435-445.

Brandi, M., & Collin-Osdoby, P. (2006). Vascular biology and the skeleton. *Journal of Bone and Mineral Research,* 21, 183-192.

Bratt-Leal, A. M., Carpenedo, R. L., Ungrin, M. D., Zandstra, P. W., & McDevitte, T. C. (2011). Incorporation of biomaterials in multicellular aggregates modulates pluripotent stem cell differentiation. *Biomaterials,* 32, 48-56.

Britannica - www. britannica. com - 2016.

Broadley, K. N., Aquino, A. M., Woodward, S. C., Buckley-Sturrock, A., Sato, Y., ve ark. (1989). Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair. *Laboratory Investigation*, 61, 571-575.

Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D., Böhmer, M.M., Remschmidt, C., Wilking, H., ve ark. (2011). German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *New England Journal of Medicine,* 365, 1763.

Buie, T., McCune, J., & Cosgriff-Hernandez, E. (2020). Gelatin matrices for growth factor sequestration. *Trends in Biotechnology,* 38, 546-557.

Burgess, W.H., & Maciag, T. (1989). The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annual Review of Biochemistry,* 58, 575–606.

Caballero Aguilar L. M., Silva, S. M., & Moulton, S. E. (2019). Growth factor delivery: Defining the next generation platforms for tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 306, 40-58.

Cademartiri, R., Anany, H., Gross, I., Bhayani, R., Griffiths, M. & Brook, M.A. (2010). Immobilization of bacteriophages on modified silica particles. *Biomaterials,* 31, 1904-1910.

Carragee, E. J., Chu, G., Rohatgi, R., Hurwitz, E. L., Weiner, B. K., Yoon, S. T., ve ark. (2013). Cancer risk after use of recombinant bone morphogenetic protein-2 for spinal arthrodesis. *Journal of Bone Joint Surgery America,* 95, 1537-1545.

Carvalho, A. M., Alves, A. L. G., Golim, M. A., Moroz, A., Hussni, C. A., Oliveira, P. G. G., ve ark. (2009). Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology,* 132, 303-306.

Carvalho, C., Heberer, M., Germann, G., Vollmar, B., Michael D., & Menger, M. D. (2006). Angiogenesis in tissue engineering: Breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Engineering,* 12, 2093-2104.

Cesarz, Z., & Tamama, K. (2016). Spheroid culture of mesenchymal stem cells. *Stem Cells International,* 2016, 9176357.

Chammas, N. K., Hill, R. L., & Edmonds, M. E. (2016). Increased mortality in diabetic foot ulcer patients: The significance of ulcer type. *Journal of Diabetes Ressearch*, 2016, 2879809.

Chan, B. K., Abedon, S. T, & Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology,* 8, 769-783

Chanishvili, N. (2012). Phage therapy-history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Advance Virus Research,* 83, 3-40.

Chanishvili, N. (2016). Bacteriophages as therapeutic and prophylactic means: summary of the Soviet and post Soviet experiences. *Current Drug Delivery,* 13, 309-323.

Chang, W-H., Chang, Y., Lai, P-H., & Sung, H-W. (2003). A genipin-crosslinked gelatin membrane as wound-dressing material: *in vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition,* 14, 481-485.

Chatzinikolaidou, M. (2016). Cell spehroids: The new frotiers in in vitro models for cancer drug validation. *Drug Drug Discovery Today,* 21, 1553-1560.

Cheng, J., Jun, Y., Qin, J., & Lee, S. H. 2017. Electrospinning versus microfluidic spinning of functional fibers for biomedical applications. *Biomaterials.* 114, 121-143.

Childs, J. D., & Birnboim, H. C. (1975). Polyacrylamide gel electrophoresis of intact bacteriophage T4D particles. *Journal of Virology,* 16, 652–661.

Chhibber, S., Kaur, T., & Kaur, S. (2013). Co-therapy using lytic bacteriophage and linezolid: effective treatment in eliminating methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from diabetic foot infections. *PLoS One,* 8, e56022.

Chhibber, S., Kaur, J., & Kaur, S. (2018). Liposome entrapment of bacteriophages improves wound healing in a diabetic mouse MRSA infection. *Fronties in Microbiology*, 9, 1-12.

Chua, C. H., & Yeong, W. Y. (2015). Bioprinting: principles and applications. Singapore, World Scientific Publishing.

Clokie, M. R. J., & Kropinski, A. M. (2009). Bacteriophages: methods and protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. New York, Humana Press.

Collins, A. J., Foley, R. N., Gilbertson, D. T., & Chen, S. C. (2015). United States Renal Data System public health surveillance of chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Kidney International Supplements 2011,* 5, 2-7.

Cornelissen, D. J., Faulkner-Jones, A., & Shu, W. (2017). Current developments in 3D bioprinting for tissue engineering. *Current Opinion in Biomedical Engineering,* 2, 76-82.

Costa, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P., & Correia, I. J. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances,* 34, 1427-1441.

Crescenzi, V., Francescangeli, A., & Taglienti, A. (2002). New gelatin-based hydrogels via enzymatic networking. *Biomacromolecules*, 3, 1384-1391.

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli. Clinical Microbiology Reviews,* 26, 822-880.

Cummings, D. J., Kusy, A. R., Chapman, V. A., & Delong, S. S. (1970). Characterization of T-even bacteriophage substructures. *Journal of Virology,* 6, 534-544.

Daminki, L. H. H. O., Dijkstra, P. J., Vanluyn, M. J. A., Vanwachem, P. B., Nieuwenhuis, P., Feijen, J. (1995). Glutaraldehyde as a cross-linking agent for collagen-based biomaterials**.** *Journal of Material Science-Materials in Medicine,* 6, 460-472.

Dhand, C., Ong, S.T., Dwivedi, N., Diaz, S.M., Venugopal, J.R., Navaneethan, B., ve ark. (2016). Bio-inspired in situ crosslinking and mineralization of electrospun collagen scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials,* 104, 323-338.

D'Herelle F. (1917). On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. Note by M. F. d'Herelle, presented by M. Roux. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de Academia des Sciences*, 165, 373-375.

D'Herelle, F. (1918). *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales,* 81, 1160.

Djagnya, K. B., Wang, Z., Xu, S. (2010). Gelatin: A valuable protein for food and pharmaceutical industries: Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41, 481-492.

Doi, K., Ikeda, T., Marui, A., Kushibiki, T., Arai, Y., Hirose, K., ve ark. (2007). Enhanced angiogenesis by gelatin hydrogels incorporating basic fibroblast

growth factor in rabbit model of hind limb ischemia. *Heart and Vessels*, 22, 104-108.

Domnina, A., Novikova, P., Obidina, J., Fridlyanskaya, I. Alekseenko, L., Kozhukharova, I., ve ark. (2018). Human mesenchymal stem cells in spheroids improve fertility in model animals with damaged endometrium. *Stem Cells Research & Therapy*, 9, 50.

Dorresteijn, J. A. N., Kriegsman, D. M. W., Assendelft, W. J. J., & Valk, G. D. (2014). Patient education for preventing diabetic foot ulceration. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, CD001488.

*E. coli*- facts sheet, CS267331-A September 2016.

Edelman, E. R., Nugent, M. A., & Karnovsky, M. J. (1993). Perivascular and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: vascular and solid organ deposition. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA,* 90, 1513-1517.

Egger, D., Carla Tripisciano, C., Viktoria Weber, V., Massimo Dominici, M., & Cornelia Kasper, C. 2018. Dnynamic cultivation of mesenchymal stem cell aggregates. *Bioengineering*, 5, 50.

Ekim, M., & Ekim, H., (2016). Diyabetik ayak ülserlerinde etiyoloji ve tedavi. *Van Tıp Dergisi,* 23, 235-241.

Ergör, G., & Öztek, Z. (2000). The development of national health policy. *WHO Regional Publication. European Series,* 86, 194-208.

Esaki, J., Marui, A., Tabata, Y., & Komeda, M. (2007). Controlled release systems of angiogenic growth factors for cardiovascular diseases. *Expert Opinion Drug Delivery,* 4, 635-649.

Escherich, T. (1988). The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. *Reviews of Infectious Diseases,* 10, 1220-1225.

Fei, Y., Gronowicz, G., & Hurley, M. M. (2013). Fibroblast growth factor-2, bone homeostasis and fracture repair. *Current Pharmaceutical Design,* 19, 3354-3563.

Fischer, J., Kolk, A., Pautke, C., Warnker, P. H., Plank, C., & Smeets, R. (2011). Future of local bone regeneration-protein versus gene therapy. *Journal Cranio Maxillofacial Surgery,* 39, 54-64.

Fish, R., Kutter, E., Wheat, G., Blasdel, B., Kutateladze, M., & Kuhl, S. (2016). Bacteriophage treatment of intransigent diabetic toe ulcers: a case series. *Journal of Wound Care,* 25, 27-33.

Fish, R., Kutter, E., Wheat, G., Blasdel, B., Kutateladze, M., & Kuhl, S. (2018) Compassionate use of bacteriophage therapy for foot ulcer treatment as an effective step for moving toward clinical trials. In J. Azeredo and R. Oliveira R (eds), Bacteriophage therapy: from lab to clinical practice. New York, Humana Press.

Fishov, I., Zaritsky, A., & Grover, N. B. (1995). On microbial states of growth. *Molecular Microbiology*, 15, 789-794.

Florkiewicz, R. Z., Shibata, F., Barankiewicz, T., Baird, A., Gonzalez, A. M., Florkiewicz, E., ve ark. (1991). Basic fibroblast growth factor gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences,* 638, 109-126.

Fokine, A., Zhang, Z., Kanamaru, S., Bowman, V. D., Aksyuk, A. A. Arisaka, F. ve ark. (2013). The molecular architecture of the bacteriophage T4 neck. *Journal of Molecular Biology,* 425: 1731-1744.

Francis, F. J. (2000). Gelatin. *Encyclopedia of Food Science and Technology* (2nd ed.). (pp.1183-1188). New York, John Wiley & Sons.

Fonseca, K. B., Granja, P. L., & Barrias, C. C. (2014). Engineering proteolytically-degradable artificial extracellular matrices. *Progress in Polymer Scince,* 39, 2010-2029.

Freddy, F., Rachel, M., & Nagra, M. (2017). Phage overlay assay for quantification of infectious bacteriophage particles. *JEMI Methods,* 1, 18-21

Fukunaka, Y., Iwanaga, K., Morimoto, K., Kakemi, M., & Tabata, Y. (2002). Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogel beased on hydrogel degradation. *Journal of Controlled Release*, 80, 333-343.

Furfaro, L. L., Chang, B. J., & Payne, M. S. (2018). Applications for bacteriophage therapy during pregnancy and the perinatal period. *Frontiers in Microbiology,* https://doi.org/ 10.3389/ fmicb.2017.02660

Game, F. (2010). Management of osteomyelitis of the foot in diabetes mellitus. *National Reviews Endocrinology,* 6, 43-47.

Garbern, J. C., Minami, E., Stayton, P. S., & Murry, C. E. (2011). Delivery of basic fibroblast growth factor with a pH-responsive, injectable hydrogel to improve

angiogenesis in infarcted myocardium. *Biomaterials,* 32, 2407-2416.

Gay, D., Kwon, O., Zhang, Z., Spata, M., Plikus, M. V., Holler, P.D., ve ark. (2013). Fgf9 from dermal gammadelta T cells induces hair follicle neogenesis after wounding. *Nature Medicine,* 19, 916-923.

Ge, X., Leow, S. C., Sathiakumar, D., Stünkel, W., Shabbir, A., So., J. B. Y., ve ark. (2016). Isolation and culture of humen adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral white adipose tissue compratments. *Bio-protocols*, 6, www.bio-protocol.org/e2027.

Gervais, L., Gel, M., Allain, B., Tolba, M., Brovko, L., Zourob, M., ve ark. (2007) *Sensors and Actuators B Chemistry,* 125, 615.

Gill, J. J., & Hyman, P. (2010). Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Current Pharmaceutical Biotechnolgy,* 11, 2-14.

Gloria, A., De Santis, R., & Ambrosio, L. (2010). Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering. *Journal of Applied Biomaterials Biomechanics*, 8. 57.

Gnavi, S., di Blasio, L., Tondo-Turo, C., Mancardi, A., Primo, L., Ciardelli, G., ve ark. (2017). Gelatin-based hydrogel for vascular endothelial growth factor release in peripheral nerve tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11, 459-470.

Gnecchi, M., & Melo, L. G. (2009). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. In J. Audat and W. L. Stanford (eds.). Stem Cells in Regenerative Medicine: Methods and Protocols. New York, Humana Press.

Gómez-Guillén, M., &Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25, 1813-1827.

Gomez, T.A., Elias, W.P., Scaletsky, I.C., Guth, B.E., Rodrigues, F.F., Piazza, R.M., ve ark. (2016). Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Journal of Microbiogy,* 47: 3-30.

Gorski, A., Miedzybrodzki, R., Weber-Dabrowska, B., Fortuna, W., Letkiewicz, S., Rogoz, P., ve ark. (2016). Phage therapy: combating infections with potential for evolving from merely a treatment for complications to targeting diseases. *Frontiers Microbiology,* 7: 1515.

Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigerer, L., & Neufeld, G. (1987). Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocrine Reviews*, 8, 95-114.

Gratia A. (1936). Numrical relationships between lysogenic bacteria and particles of bacteriophages. *Annales de l'Insitut Pasteur,* 57: 652.

Groebe, K., & Mueller-Klieser, W. (1996). On the relation between size of necrosis and diameter of tumor spheroids. *International Journal Radiation Oncololgy Biolology Physics*, 34, 395-401.

Gunatillake, P. A., & Adhikari, R. (2003). Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *European Cells and Materials,* 5, 1-16.

Gutiérrez, D., Fernández, L., Rodríguez, A., & García P. (2018). Practical method for isolation of phage deletion mutants. *Methods and Protocols.* 1: 6.

Hafidz, R., Yaakob, C.M., Amin, I., & Noorfaizan, A. (2011). Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin. *International Food Research Journal*, 18, 813-817.

Handa, H., Gurczynski, S., Jackson, M. P., Auner, G., Walker, J., & Mao, G. (2008). Recognition of Salmonella typhimurium by immobilized phage P22 monolayers. *Surface Science,* 602, 1392-1400.

Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents,* 30, 118-128.

Hausler, T. (2006). Viruses vs. superbugs: A solution to the antibiotic crisis ? Palgrave Macmillan.

Hayashi, K., & Tabata, Y. (2011). Preparation of stem cell aggregates with gelatin microspheres to enhance biological functions. *Acta Biomaterialia*, 7, 2797-2803.

Hennink, W. E., & van Nostrum, C. F. (2012). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **64**, 223-236.

Hiraoka, Y., Yamashiro, H., Yasuda, K., Kimura, Y., Inamoto, T., & Tabata, Y., (2006). In situ regeneration of adipose tissue in rat fat pad by combining a collagen scaffold with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Tissue Engineering,* 12, 1475-1487.

Hirayama, N., Inui, C., Maezawa, A., & Tabata Y. (2018). Gelatin particles, method for producing gelatin particles gelatin-particle containing cells, method for producing gelatin-particle-containing cells, and cellular structure. *US Patent Applications Published,* US 0022789.

Hockett, K. L., & Baltrus, D. A. (2017). Use of the soft-agar overlay technique to screen for bacterially produced inhibitory compounds. *Journal of Visualized Experiments,* 119: e55064.

Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 13-28.

Hollinger, J. O., Hart, C. E., Hirsch, S. N., Lynch, S., &Friedlaender, G. E. (2008). Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *Journal of Bone Joint Surgery America,* 90, 48-54.

Hollister, S. J. (2005). Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials,* 4, 518-524.

Hong, L., Tabata, Y., Miyamoto, S., Yamamoto, M., Yamada, K., Hashimoto, N., ve ark. (1998a). Bone regeneration at rabbit skull defects treated with transforming growth factor-ß1 incorporated with different levels of biodegradabilitiy. *Journal of Neurosurgery*, 92, 315-325.

Hong, L., Tabata, Y., Yamamoto, M., Miyamoto, S., Yamada, K., Hashimoto, N., ve ark. (1998b). Comparison of bone regeneration in rabbit skull defect by recombinant human BMP-2 incorporated in biodegradable hydrogel and in solution. *Journal of Biometerial Science Polymer Edition*, 9, 1001-1014.

Hong, L., Tabata, Y., Miyamoto, S., Yamada, K., Aoyama, I., Tamura, M., ve ark. (2000). Role of gelatin in the release carriers of growth factor for tissue engineering. *Tissue Engineering,* 6, 331-340

Hori, Y., Inoue, S., Hirano, Y., & Tabata, Y. (2004). Effect of culture substrates and fibroblast growth factor addition on the proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells**.** *Tissue Engineering,* 10, 995-1005.

Housby, J. N. & Mann, N.H. (2009). Phage therapy. *Drug Discovery Today,* 14, 536-540

https://en.wikipedia.org/wiki/Diabetes_mellitus.

https://en.wikipedia.org/wiki/Gelatin#Technical_uses

Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials,* 21, 2529-2543.

Ichinohe, N., Kuboki, Y., & Tabata, Y. (2008). Bone regeneration using titanium nonwoven fabrics combined with FGF-2 release from gelatin hydrogel microspheres in rabbit skull defects. *Tissue Engineering Part A*, 14, 1663-1671.

Igai, H., Chang, S. S., Gotoh, M., Yamamoto, Y., Misaki, N., Okamoto, T., ve ark. (2006). Regeneration of canine tracheal cartilage by slow release of basic fibroblast growth factor from gelatin sponge. ASAIO Journal, 52, 86-91.

Ikada, Y., & Tabata, Y. (1998). Protein release from gelatin matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31, 287-301.

Inci, I., Odabas, S., Vargel, I., Guzel, E., Korkusuz, P., Cavusoglu, T., ve ark. (2014). Gelatin-hydroxyapatite cryogels with bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor Beta-1 for calvarial defects. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering,* 4, 1-8.

Inoo, K., Bando, H., & Tabata, Y. (2018). Insulin secretion of mixed insulinoma aggregates-gelatin hydrogel microspheres after subcutaneous transplantation. *Regenerative Therapy,* 8, 38-45.

Iwakura, A., Tabata, Y., Tamura, N., Doi, K., Nishimura, K., Nakamura, T., ve ark. (2001). Gelatin sheet incorporating basic fibroblast growth factor enhances healing of devascularized sternum in diabetic rats. *Circulation,* 104, 1325-1329.

Iwakura, A., Fujita, M., Kataoka, K., Tambara, K., Sakakibara, Y., Komeda, M., vea rk. (2003). Intramyocardial sustained delivery of basic fibroblast growth factor improves angiogenesis and ventricular function in a rat infract model. *Heart and Vessels*, 18, 93-99

Jaipan, P., Nguyen, A., & Narayan, R. J. (2017). Gelatin-based hydrogels for biomedical applications. *MRS Communications,* 7, 416-426.

Jameson, J., Ugarte, K., Chen, N., Yachi, P., Fuchs, E., Boismenu, R., ve ark., (2002). A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science,* 296, 747-749

Jamilah, B., & Harvinder, K. (2002). Properties of gelatins from skins of fish-black tilapia (Oreochromis mossambicus) and red tilapia (Oreochromis nilotica). *Food Chemistry*, 77, 81-84.

Jiang, T., Carbone, E. J., Lo, K. W. H., & Laurencin, C. T. (2015). Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. *Progress in Polymer Science*, 46, 1-24.

Joan, J. W. F. & Slonczewski, L. (2017). Microbiology: An evolving science. Norton eTextbook.

Kabuto, Y., Morihara, T., Sukenari, T., Kida, Y., Oda, R., Arai, Y., ve ark. (2015). Stimulation of rotator cu repair by sustained release of bone morphogenetic protein-7 using a gelatin hydrogel sheet. *Tissue Engineering Part A,* 21, 2025-2033.

Kahn, C. R, Weir, G., King, G., Jacobson, A., Smith, R., & Moses, A. (2018). Joslin's diabetes mellitus. 14th Edition, Cambridge, MA: Harward Medical School.

Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *National Reviews of Microbiology*, 2, 123-140.

Kawai, K., Suzuki, S., Tabata, Y., Ikada, Y., & Nishimura, Y. (2000). Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis. *Biomaterials,* 21, 489-499.

Kawaguchi, H., Kurokawa, T., Hanada, K., Hiyama, Y., Tamura, M., Ogata, E., ve ark. (1994). Stimulation of fracture repair by recombinant fibroblast growth factor. *Endocrinology,* 135, 774-*781*.

Keen, E. C. (2012). Phage therapy: concept to cure. *Frontiers in Microbiology,* 3, 238.

Kelm, J. M., Djonov, V., Ittner, L. M., Fluri, D., Born, W., Hoerstrup, S. P., ve ark. (2006). Design of custom-shaped vascularized tissues using microtissue spheroids as minimal building units. *Tissue Engineering,* 128, 2151-2160.

Khademhosseini, A., & Langer, R. (2007). Microengineered hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*, 28**,** 5087-5092.

Khademhosseini, A., & Langer, R. (2016). A decade of progress in tissue engineering. *Nature Protocols,* 11, 1775-1781.

Khalil, U., Younus, M., Asghar, N., Siddiqui, F., Gomez-Duarte, O. G. & Bokhari, T. (2016). APMIS: *Journal of Pathology, Microbiology and Immunulogy*, 124, 872.

Kikuchi, T., Kubota, S., Asaumi, K., Kawaki, H., Nishida, T., Kawate, K., ve ark. (2008). Promotion of bone regeneration by CCN2 incorporated into gelatin hydrogel. *Tissue Engineering Part A,* 14, 1089-1098.

Kim, W-S., Park, B-S., Sung, J-H., Yang, J-M., Park, S-B., Kwak, S-J., ve ark. (2007). *Journal of Dermatological Science*, 48, 15-24.

Kimura, Y., Ozeki, M., Inamoto, T., & Tabata, Y. (2002). Time course of de novo adipogenesis in Matrigel by gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *Tissue Engineering*, 8, 603-613.

Kimura, Y., Ozeki, M., Inamoto, T., & Tabata, Y. (2003). Adipose tissue engineering based on human preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic growth factor. *Biomaterial*, 24, 2513-2521.

Kimura, Y., & Tabata, Y. (2010). Controlled release of stromal-cell-derived factor-1 from gelatin hydrogels enhances angiogenesis. *Journal Biomaterial Science Polymer Edition,* 21, 37-51.

Kirker-Head, C. A. (2000). Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 43, 65-92.

Kishan, A., Walker, T., Sears, N., Wilems, T., & Cosgriff-Hernandez, E. (2018). Development of a biomodal, in situ crosslinking method to achieve multifactor release from electrospun gelatin. *Journal of Biomedical Materials Research*, 106, 1155-1164.

Kotloff, K. L., Nataro, J. P., Blackwelder, W. C., Nasrin, D., Farag, T. H., Panchalingam, S., ve ark. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet.* 382, 209-222.

Kropinski, A.M., Mazzocco, A., Waddell, T.E., Lingohr, E., Johnson, R.P. (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In: M. R. J. Clokie and A. M. Kropinski AM (eds.). Bacteriophages: methods and protocols, vol 1. (pp 69-77). Ne York, Humana Press.

Kuijpers, A. J., Engbers, G. H., Krijsveld, J., Zaat, S. A., Dankert, J., Feijen, J. (2000a). Cross-linking and characterization of gelatin matrices for biomedical applications. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition,* 11, 225-243.

Kuijpers, A. J., van Wachem P. B., van Luyn, M. J., Plantinga, J., A., Engbers, G. H., Krisgveld, J., ve ark. (2000b). In vivo compatibility and

degredation of cross-linked gelatin gels incorporated in knitted Dacron. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(1), 136-145.

Kumagai, M., Marui, A., Tabata, Y., Takeda, T., Yamamoto, M., Yonezawa, A., ve ark. (2016). Safety and effcacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia. *Heart and Vessels*, 31, 713-721.

Kumagai, M., Minakata, K., Masumoto, H., Yamamoto, M., Yonezawa, A., Ikeda, T., ve ark. (2018). A therapeutic angiogenesis of sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogel sheets in a canine chronic myocardial infarction model. *General Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 66, 641-647.

Kushibiki, T., Tomoshige, R., Iwanaga, K., Kakemi, M., & Tabata, Y. (2006). Controlled release of plasmid DNA from hydrogels prepared from gelatin cationized by different amine compounds. *Journal of Controlled Release,* 112, 249-256.

Kutter, E., & Sulakvelidze, A. (2005). Bacteriophages: Biology and application. Boca Raton (FL): CRC Press.

Laschke, M. W., & Menger, M. D. (2017a). Life is 3D: Boosting spheroid function for tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 35, 133-144.

Laschke, M.W., & Menger, M. D. (2017b). Spheroids as vascularization units: From angiogenesis research to tissue engineering applications. *Biotechnology Advances,* 35, 782-791.

Lakshmanan, R. S., Guntupalli, R., Hu, J., Kim, D. J., Petrenko, V. A., Barbaree, J. M., ve ark. (2007a). Phage immobilized magnetoelastic sensor for the detection of Salmonella typhimurium. *Journal of Microbiological Methods,* 71, 55-60.

Lakshmanan, R. S., Guntupalli, R., Hu, J., Petrenko, V. A., Barbaree, J. M. & Chin, B. A. (2007b). Detection of Salmonella typhimurium in fat free milk using a phage immobilized magnetoelastic sensor. *Sensors and Actuators B Chemistry,* 126, 544-550.

Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science,* 260, 920-941.

Laquerriere, A., Peulve, P., Jin, O., Tiollier, J., Tardy, M., Vaundry, H., ve ark. (1994). Effect of basic fibroblast growth factor and alpha-melanocytic stimulating hormone on nerve regeneration through a collagen channel. *Microsurgery,* 15, 203-210.

Lazarous, D. F., Shou, M., Scheinowitz, M., Hodge, E., Thirumurti, V., Stiber, J. A., ve ark. (1996). Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation,* 94, 1074-1082.

Lee, J. E., Park, J. C., Hwang, Y. S., Kim, J. K., Kim, J. G., & Sub, H. (2001). Characterization of UV-irradiated dense/porous collagen membranes: morphology, enzymatic degradation, and mechanical properties. *Yonsei Medical Journal,* 42, 172-179.

Lee, J., Cuddihy, M. J., & Kotov, N. A. (2008). Three-dimensional cell culture matrices: State of the art. *Tissue Engineering,* 14, 61-86.

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews,* 101, 1869-1879.

Leiman, P. G., Kanamaru, S., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F., & Rossmann, M. G. (2003). Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cellular and Molecular Life Sciences,* 60, 2356-2370.

Li, Z., Qu, T., Ding, C., Ma, C., Sun, H., Li, S., & Liu, X. (2015). Injectable gelatin derivative hydrogels with sustained vascular endothelial growth factor release for induced angiogenesis. *Acta Biomaterial*, 13, 88-100.

Li, Z., Masumoto, H., Jo, J-I., Yamazaki, K., Ikeda, T., Tabata, T., & Minatoya, K. (2018). Sustained release of basic fibbroblast growth factor using gelatin hydrogel improved left ventricular function through the alteration of collagen subtype in a rat chronic myocardial infarction model. *General Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 66, 641-647.

Liang, H.C., Chang, W-H., Lin, K.J., & Sung, H-W. (2003). Genipin-crosslinked gelatin microspheres a drug carrier for intramuscular administration: in vitro and in vivo studies. *Journal of Biomedical Material Research A,* 65, 271-282.

Liberman, J. R., Daluiski, A., & Einhorn, T. A. (2002). The role of growth factors in repair of bone. Biology and clinical appliacations. *Journal of Bone Joint Surgery America*, 84, 1032-1044.

Lie, C. G., Zhengwei, M., Jiacong, S., Xueqing, H., & Chunmao, H. (2003). Thermal dehydration treatment and glutaraldehyde cross-linking to increase the biostability of collagen-chitosan porous scaffolds used as dermal equivalent. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition,* 14, 861-874.

Lin, R.Z., & Chang, H.Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal,* 3, 1172-1184.

Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology Therapy,* 8, 162-173.

Lind, M. (1996). Growth factors, possible new clinical tools: a review. *Acta Orthopaedica Scandinavia,* 67, 407-417.

Lipsky, B. A., Berendt, A. R., Cornia, P. B., Pile, J. C., Peters, E. J., Armstrong, D. G., ve ark. (2012). Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clinical Infectious Diseases.* 54, 132-173.

Lipsky, B. A., Aragón-Sánchez, J., Diggle, M., Embil, J., Kono, S., Lavery, L., Senneville, É., ve ark. (2016). International Working Group on the Diabetic Foot, Peters EJ: IWGDF guidance the diagnosis and management of foot infections in persons with diabetes. *Diabetes Metabolic Research Reviews,* 32, 45-74

Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2015). Collagen and gelatin. *Annual Reviews Food Science and Technology*, 6, 527-557.

Liu, C., Bayer, A., Cosgrove, S. E., Daum, R. S., Fridkin, S. K., Gorwitz, R.J., ve ark. (2011). Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clinical Infectious Diseases,* 52, 18-55.

Lutolf, M., & Hubbell, J. (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature Biotechnology,* 23, 47-55.

Maddaluno, L., Urwyler, C., & Werner, S. (2017). Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair. *The Company of Biologists Ltd Development,* 144, 4047-4060.

Madigan, M., & Atoui, R. (2018). Therapeutic use of stem cells for myrocardial infarction. *Bioengineering,* 5, 28.

Maitra, J., & Shukla, V. K. (2014). Cross-linking in hydrogels-a review, *American Journal of Polymer Science,* 4, 25-31.

Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., & Kim, D. H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*, 34, 422-434.

Manickam, B., Sreedharan, R., & Elumalai, M. (2014). Genipin - the natural water soluble cross-linging agent and its importance in the modified drug delivery systems: an overview. *Current Drug Delivery*. 11, 139-145.

Manohar, P., Tamhankar, A.J., Lundborg, C.S., & Ramesh, N. (2018). Isolation, characterization and *in vivo* effcacy of *Escherichia* phage myPSH1131. *PloS one.* 13: e0206278.

Martino, M. M., & Briquez, P. S. (2015). Extracellular matrix-inspired growth factor delivery systems for bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 94, 41-52.

Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med,* 3, e442.

Mazzocco, A., Waddell, T.E., Lingohr, E., & Johnson, R.P. (2009). Enumeration of bacteriophages by the direct plating plaque assay. *Methods in Molecular Biology,* 501, 77-80.

Mcgrath, R. (1972). Protein measurement by ninhydrin determination of amino acids released by alkaline hydrolysis. *Analytical Biochemistry*. 49, 95-102.

McKee, C., & Chaudhry, G. R. (2017). Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 159, 62-77.

Mackenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., ve ark. (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through public water supply. *New England Journal of Medicine,* 331, 161-167.

Meyer, M., Muller, A.-K., Yang, J., Moik, D., Ponzio, G., Ornitz, D. M., ve ark. (2012). FGF receptors 1 and 2 are key regulators of keratinocyte migration *in vitro* and in wounded skin. *Journal of Cell Science,* 125, 5690-5701

Michen, B., & Graule, T. (2010). Isoelectric points of viruses. *Journal of Applied Microbiology,* 109, 388-397.

Middleton, J. C., & Tipton, A. J. (2000). Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials,* 21, 2335-2346

Miller, E. S., Kutter, E., Mosig, G., Arisaka, F., Kunisawa, T., & Ruger, W. (2003). Bacteriophage T4 genome. *Microbiology Molecular Biology Reviews,* 67, 86-156.

Mironov, V., Visconti, R. P., Kasyanov, V., Forgacs, G., & Drake, C.J. (2009). Organ printing: Tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials,* 30, 2164-2174

Moghtader, F., Congur, G., Zareie, H. M., Erdem, A., & Piskin, E. (2016). Impedimetric detection of pathogenic bacteria with bacteriophages using gold nanorod deposited graphite electrodes. *RSC Advances*, 6, 97832-97839.

Moghtader, F., Eğri, S. & Piskin, E. (2017). Phages in modified alginate beads. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology,* 45, 357-363.

Moghtader, F., Tomak, A., Zareie, H. & Piskin, E. (2018). Bacterial detection using bacteriophages and gold nanorods by following time-dependent changes in Raman spectral signals. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology,* 46, 122-130.

Mohan, N., Nair, P.D., Tabata, Y. (2009). A 3D biodegradable protein based matrix for cartilage tissue engineering and stem cell differentiation to cartilage. *Journal of Material Science: Materials in Medicine,* 20, 49-60.

Morozova, V.V., Vlassov, V.V., & Tikunova, N.V. (2018). Applications of bacteriophages in the treatment of infections in humans. *Frontiers in Microbiology, https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.0169.*

Moscona, A., & Moscona, H. (1952). The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *Journal of Anatomy,* 863, 287-301.

Nair L. S. & Laurencin, C. T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science,* 32, 762-798.

Nakajima, H., Sakakibara, Y., Tambara, K., Iwakura, A., Doi, K., Marui, A., ve ark. (2004). Therapeutic angiogenesis by the controlled release of basic fibroblast growth factor for ischemic limb and heart injury: toward safety and minimal invasiveness. *Journal of Artificial Organs*, 7, 58-61.

Nakamura, T., Hanada, K., Tamura, M., Shibanushi, T., Nigi, H., Tagawa, M., Fukumoto, S., Matsumoto, T. (1995). Stimulation of endosteal bone formation by systemic injection of fibroblast growth factor. *Endocrinology,* 136, 1276-1284.

Nam, J. H., Ermonval, M., & Sharfstein, S.T. (2007). Cell attachment to microcarriers affects growth, metabolic activity, and culture productivity in bioreactor culture. *Biotechnolog Progress*. 23, 652-660.

Nanduri, V., Sorokulova, I. B., Samoylov, A. M., Simonian, A. L., Petrenko, V. A. & Vodyanoy, V. (2007). Phage as molecular recognition elements in biosensors immobilized by physical adsorption. *Biosensors and Bioelectronics,* 22, 986-992.

Napa Valley- www.napavalley.edu - 2016.

Narita, A., Takahara, M., Ogino, T., Fukushima, S., Kimura, Y., & Tabata, Y. (2009). Effect of gelatin hydrogel incorporating fibroblast growth factor 2 on human meniscal cells in an organ culture model. *Knee,* 16, 285-289.

Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., ve ark. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D.C.

Nguyen, A. H., McKinney J., Miller, T., Bongiorno, T., & McDevitt, T.C. (2015). Gelatin methacrylate microspheres for controlled growth factor release. *Acta Biomaterialia*, 13, 101-110.

Numata, Y., Terui, T., Okuyama, R., Hirasawa, N., Sugiura, Y., Miyoshi, I., ve ark. (2006). The accelerating effect of histamine on the cutaneous wound-healing process through the action of basic fibroblast growth factor. *Journal of Investigative Dermatology,* 126, 1403-1409.

Nunes, Q. M., Li, Y., Sun, C., Kinnunen, T. K. & Fernig, D. G. (2016). Fibroblast growth factors as tissue repair and regeneration therapeutics. *Peer Journal*, 4, e1535.

Odabas, S., Feichtinger, G. A., Korkusuz, P., Inci, I., Bilgic, E., Yar, A. S., ve ark. (2013). Auricular cartilage repair using cryogel scaffolds loaded with BMP-7-expressing primary chondrocytes. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7, 831-840.

Odabas, S., Elcin, E., & Elcin, Y. M. (2014). Isolation and characterization of mesenchymal stem cells. *Methods in Molecular Biology,* 1109, 47-63.

Okamoto, T., Yamamoto, Y., Gotoh, M., Huang, C-L., Nakamura, T., Shimizu, Y., ve ark. (2004). Slow release of bone morphogenetic protein 2 from a gelatin sponge to promote regeneration of tracheal cartilage in a canine model. *Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery,* 127, 329-334.

Oladipupo ve ark., Oladipupo, S. S., Smith, C., Santeford, A., Park, C., Sene, A., Wiley, L. A., ve ark. (2014). Endothelial cell FGF signaling is required for injury response but not for vascular homeostasis. *Proceesdings National Academy of Sciences USA,* 111, 13379-13384.

Olde Damink, L. H. H, Dijkstra, P. J., & Luyn, M. J. (1995). Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *Journal of Materials Science Materials in Medicine,* 6, 460-472.

Olsen, T. R., & Alexis, F. (2014). Bioprocessing of tissues using cellular spheroids, *Journal of Bioproces Biotechniques,* 4, 2.

Ortega, S., Ittmann, M., Tsang, S. H., Ehrlich, M. & Basilico, C. (1998). Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proceeding of National Academy of Sciences USA,* 95, 5672-5677.

Oryan, A., Kamali, A., Moshiri, A., Baharvand, H., & Daemi, H. (2018). Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds. *International Journal of Biology and Macromolecules,* 107, 678-688.

Owen, M., & Friedenstein, A.J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation Symposium,* 136, 42-60.

Ozeki, M., Ishii, T., Hirano, Y., & Tabata, Y. (2001). Controlled release of hepatocyte growth factor from gelatin hydrogels based on hydrogel degradation. *Journal of Drug Targeting*. 9, 461-471.

Ozeki, M., & Tabata, Y. (2005) In vivo degradability of hydrogels prepared from different gelatins by various cross-linking methods. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*, 16, 549-561.

Panec, M., & Katz, D.S. (2013). Plaque Assay Protocols. Available from: Microbelibrary. or. at http//www.microlibrary.org/component/resources/laboratory-test/3073-plaque-assay-protocols.

Park, S. A., Lee, S. H., S. H., & Kim, W. D. (2011). Fabrication of porous

polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering. *Bioprocess and Biosystems Engineering,* 34, 505-513.

Patel, Z. S., Ueda, H., Yamamoto, M., Tabata, Y. & Mikos, A. G. (2008a). In vitro and in vivo release of vascular endothelial growth factor from gelatin microparticles and biodegradable composite scaffolds. *Pharmaceutical Research,* 25, 2370-2378.

Patel, Z. S., Yamamoto, M., Ueda, H., Tabata, Y. & Mikos, A. G. (2008b). Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2. *Acta Biomaterialia,* 4, 1126-1138.

Patil, J. V., Mali, S. S., Kamble, A. S., Hong, C. K., Kim, J. H., & Patil, P. S. (2017). Electrospinning: A versatile technique for making of 1D growth of nanostructured nanofibers and its applications: An experimental approach. *Applied Surface Science,* 423, 641-674.

Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., & Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Phamnaceutics and Biopharmaceutics,* 50, 27-46.

Perala, G., & Hilborn, J. (2017). Bioresorbable polymers for biomedical applications: From fundamentals to translational medicine. ebook, Woodhead Publishing.

Piaggesi, A., & Apelqvist, J. (2018). The diabetic foot syndrome. Basel, Karger.

Pina, S., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2015). Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A Review. *Advanced Materials,* 1143-1169.

Pirisi, A. (2000). Phage therapy - advantages over antibiotics. *The Lancet,* 356, 1418.

Piskin, E. (2012). Biodegradable polymers as biomaterial. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition,* 6, 775-795

Piskin, E., Bolgen, N., Egri, S., & Isoglu, A. (2007). Electrospun matrices made of poly(α-hydrox acids) for medical use. *Nanomedicine,* 2, 441-457.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., ve ark. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal

stem cells. *Science,* 284, 143-147.

Pham, Q. P., Sharma, U., & Mikos A. G. (2006). Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Engineering,* 12, 1197-1211.

Plaque assay-www.virology.ws/2009/07/detecting-viruses-the-plaque-assay/, 2018.

Polak, J. M., & Bishop, A. E. (2006). Stem cells and tissue engineering: Past, present, and future". *Annals of the New York Academy of Sciences,* 1068, 352-366.

Powlson, A. S., & Coll, A. P. (2010). The treatment of diabetic foot infections. *Journal of Antimicrobiotics and Chemotherapy,* 65, 3-9.

Pryce, T.D. (1887). A case of perforating ulcers of both feet associated with diabetes and ataxic symptoms. *Lancet,* 2, 11-12.

Qadri, F., Svennerholm, A. M., Faruque, A. S. & Sack, R. B. (2005). Enterotoxigenic *E. coli* in developing countries epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, prevention. *Clinical Microbiology Reviews,*18, 465.

Radetsky, P. (1996). The good virus. *Discover,* 17, 52.

Rifkin, D. B., & Moscatelli, D. (1989). Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *Journal of Cell Biology*, 109, 1-6.

Reardon, S. (2014). Phage therapy gets revitalized: the rise of antibiotic resistance rekindles interest in a century-old virus treatment. *Nature,* 51, 15-16.

Rediguieri, C. F., Sassonia, R. C., Dua, K., Kikuchi, I. S., & Pinto, T. J. A. (2016). Impact of sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering. *European Polymer Journal,* 82, 181-195.

Rezvani, Z., Venugopal, J. R., Urbanska, A. M., Mills, D. K., Ramakrishna, S., Mozafari, M., ve ark. (2016). A bird's eye view on the use of electrospun nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering: Current state-of-the-art, emerging directionsand future trends. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12, 2181-2200.

Rhoads, D. D., Wolcott, R. D., Kuskowski, M. A., Wolcott, B. M., Ward, L. S., & Sulakvelidze, A. (2009). Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *Journal of Wound Care,* 18, 237-243.

Ripamonti, U. (2006). Soluble osteogenic molecular signals and the induction of bone formation. *Biomaterials,* 27, 807-822.

Reddy, N., Reddy, R., & Jiang, Q. (2015). Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology,* 33, 362-369.

Rosenblatt-Velin, N., Lepore, M. G., Cartoni, C., Beermann, F., & Pedrazzini, T. (2005). FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. *Journal of Clinical Investigation,* 115, 1724-1733.

Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., ve ark. (2017). Scaffolds for bone tissue engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering C,* 78, 1246-1262.

Rouwkema, J., de Boer, J., & Van Blitterswijk, C.A. (2006). Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Engineering,* 129, 2685–93.

Ryden, L., Standl, E., Bartnik, M., Berghe, G., Beteridge, J., Boer, M. J., ve ark., (2007). Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary: The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *European Heart Journal*, 28, 88-136.

Saleh, F. A., Whyte, M., & Genever, P. G. (2011). Effects of endothelial cells on human mesenchymal stem cellactivity in a three-dimensional in vitro model, *European Cells and Materials,* 22, 242-257.

Santoro, M., Tatara, A. M., & Mikos, A. G. (2014). Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 190, 210-218.

Santos, J. M., Camões, S.P., Elysse Filipe, E., Cipriano, M., & Miranda, J. P. (2015). Three-dimensional spheroid cell culture of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells leads to enhanced paracrine induction of wound healing. *Stem Cell Research & Therapy,* 6, 90.

Sarwar, N., Gao, P., Seshasai, S.R., Gobin, R., Kaptoge, S., Di Angelantonio, ve ark. (2010). Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. Emerging risk factors collaboration. *Lancet,* 375, 2215-2222.

Sart, S., Tsai, A.C., Li, Y., & Ma, T. 2014. Three-dimensional aggregates of mesenchymal stem cells: cellular mechanisms, biological properties, and applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews,* 20, 365-380

Saso, Y., Kawazoe, T., Goji, M., Suzuki, S., Tabata, Y., Tomihata, K., ve ark. (2003). The effects of basic fibroblast gwoth factor (bFGF) impregnated gelatin microspheres on proliferation of fibroblasts and formation of epithelial layer grafting cell-preconfluent cultured skin. *Japanese Journal of Burn Injuries*, 29, 24-30.

Seeherman, H., & Wozney, J. H. (2005). Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Revews,* 16, 329-345.

Selva Olid A., Solà, I., Barajas-Nava, L. A., Gianneo, O. D., Bonfill Cosp, X., Lipsky, B. A. (2015). Systemic antibiotics for treating diabetic foot infections. *Cochrane Database of Systematic Reviews,* 9, CD009061.

Senneville, E. (2018). Antibacterial treatment in diabetic foot infections". In A. Piaggesi and J. Apelqvist (eds.), The diabetic foot syndrome (pp.167-183). Basel, Karger.

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & Ari, D. R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology,* 189, 8746-8749.

Shabani, M., Zouro, B., Allain, C.A., Marquette, M.F., Lawrence, R. & Mandeville, S. (2008). Bacteriophage-modified microarrays for the direct impedimetric detection of bacteria. *Analytical Chemistry,* 80, 9475.

Showe, M. K., & Onorato, L. (1978). Kinetic factors and form determination of the head of bacteriophage T4. *PNAS,* 75, 4165-4169.

Shulman, S. T., Friedman, H. C., & Sims, R. H. (2007). Theodor Escherich: The first pediatric infectious diseases physician? *Clinical Infectious Diseases*, 45, 1025-1029.

Singh, N., Armstrong, D. G., & Lipsky, B. A. (2015). Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA,* 293, 217-228.

Singh, A., Glass, N., Tolba, M., Brovko, L., Griffiths, M., & Evoy, S. (2009). Immobilization of bacteriophages on gold surfaces for the specific capture of pathogens Biosensors and Bioelectronics, 24, 3645-3651.

Singh, A., Poshtiban, S. & Evoy, S. (2013) Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection. *Sensors*, 13, 1763-1786.

Simons, M., & Ware, J. A. (2003). Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *National Reviews Drug Discovery*, 2, 863-872.

Slide Player-http://slideplayer.com/slide/4683531/ - 2016.

Slide Share-www.slideshare.net - 2016.

Smith, H. W., & Huggins, M. B. (1983). Effectiveness of phages in treating experi- mental Escherichia coli diarrhoea in calves, piglets and lambs. *Journal of General Biology,* 129, 2659-2675.

Study Blue - www.studyblue.com - 2016.

Su, K., & Wang, C. (2015). Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnology Letters,* 37, 2139-2145.

Sulaiman, S., Chowdhury, S. R., Fauzi, B., Rani, R. A., Yahaya, N. H. M., Tabata, Y., ve ark. (2020). 3D culture of MSCs on a gelatin microsphere in a dynamic culture system enhances chondrogenesis. *International Journal of Molecular Sciences,* 21, 2688-2705.

Sulakvelidze A, Kutter E. (2005). Bacteriophage therapy in humans. In: E. Kutter and A. A. Sulakvelidze (eds.),, Bacteriophages: Biology and Application (pp. 381-436). Boca Raton (FL): CRC Press.

Sung, H. J., Meredith, C., Johnson, C., & Galis, Z. S. (2004). The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials,* 25, 5735-5742.

Summers, W. C. (2001). Bacteriophage therapy. *Annual Reviews Microbiology,* 55, 437-451

Suvarnapathaki, S., Nguyen, M. A., Wu, X., Nukavarapu, S. P., Gulden Camci-Unal, G. (2019). Synthesis and characterization of photocrosslinkable hydrogels from bovine skin gelatin. *RSC Advances*, 9, 13016-13025.

Stocum, D. L. (1997). New tissues from old. *Science,* 276, 59.

Tabata, Y., Hijikata, S., & Ikada, Y. (1994). Enhanced vascularization and tissue granulation by basic fibroblast growth factor impregnated in gelatin hydrogels. *Journal of Controlled Release,* 31, 189-199.

Tabata, Y., & Ikada, Y. (1998). Protein release from gelatin matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 31, 287-301.

Tabata, Y., & Ikada Y. (1999). Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released from gelatin hydrogels with different biodegradabilities. *Biomaterials,* 20, 2169-2175.

Tabata, Y., Hijikata, S., Muniruzzman, M., & Ikada, Y. (1999). Neovascularization effect of biodegradable microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 10: 79-94.

Tabata, Y. (2000), Importance of drug delivery in tissue engineering. *Pharmaceutical Sceince and Technology Today*, 3, 80-89.

Tabata, Y. (2006). Potential of drug delivery technology in tissue regeneration therapy. *Journal of Hard Tissue Therapy*, 15, 73-81.

Tabata, Y., Nagano, A., Muniruzzaman, M., & Ikada, Y. (1998a). In vitro sorption and desorption of basic fibroblast growth factor from biodegradable hydrogels. *Biomaterials*, 19, 1781-1789.

Tabata, Y., Yamada, K., Miyamoto, S., Nagata, I., Kikuchi, H., Aoyama, I., ve ark. (1998b). Bone regeneration by basic fibroblast growth factor complexed with biodegradable hydrogel. *Biomaterials,* 19, 807-815.

Tabata, Y., Hijikata, S., Muniruzzman, M., & Ikada, Y. (1999a). Neovascularization effect of biodegradable microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*, 10, 79-94.

Tabata, Y., & Ikada, Y. (1999). Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released from gelatin hydrogels with different biodegradabilities. *Biomaterials,* 20, 2169-2175.

Tabata, Y., Ikada, Y., & Morimoto, K. (1999b); Surfactant-free preparation of biodegradable hydrogel microspheres for protein release. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers,* 14, 371-384.

Tabata, Y., Nagano, A., & Ikada, Y. (1999c). Biodegredation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Engineering,* 5, 127-138.

Tabata, Y., Yamada, K., Hong, L., Miyamoto, S., Hashimoto, N., & Ikada, Y. (1999d). Skull bone regeneration in primates in response to basic fibroblast growth

factor. *Journal of Neurosurgery*, 91, 851-856.

Tabata, Y., Hong, L., Miyamoto, S., Miyao, M., Hashimoto, N., & Ikada, Y. (2000a). Bone formation at a rabbit skull defect by autologous bone marrow combined with gelatin microspheres containing TGF-ß1. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition,* 11, 891-901.

Tabata, Y., Miyao, M., Inamoto, T., Ashii, T., Hirano, Y., Yamaoki, Y., ve ark. (2000b). De novo formation of adipose tissue by controlled release of basic fibroblast growth factor. *Tissue Engineering,* 6, 279-289.

Tabata, T., Miyao, M., Ozeki, M., & Ikada, Y. (2000c) Controlled release of vascular endothelial growth factor by use of collagen hydrogels. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*, 11, 915-930.

Taipale, Y., & Keski-Oja, J. (1997). Growth factors in extracellular matrix. *FASEB Journal*, 11, 51-59.

Tajima, S., & Tabata, Y. (2012). Preparation and functional evaluation of cell aggregates incorporating gelatin microspheres with different degradabilities. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine,* 7, 801-811.

Tajima, S., & Tabata, Y. (2017). Preparation of EpH4 and 3T3L1 cells aggregates incorporating gelatin hydrogel microspheres for a cell condition improvement. *Regenerative Therapy,* 6, 90-99.

Tajima, S., & Tabata, Y. (2018). Preparation of cell aggregates incorporating gelatin hydrogel microspheres containing bone morphogenic protein-2 with different degradabilities. *Journal of Biomaterial Science: Polymer Edition*, 29, 775-792.

Takahashi, Y., Yamamoto, M., & Tabata, Y. (2005). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and ß-tricalcium phosphate. *Biomaterials,* 26, 3587-3596

Takahashi, Y., Yamamoto, M., Yamada, K., Kawakami, O., & Tabata, Y. (2007). Skull bone regeneration in nonhuman primates by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel. *Tissue Engineering,* 13, 293-300.

Takehara, N., Tsutsumi, Y., Tateishi, K., Ogata, T., Tanaka, H., Ueyama, T., ve ark. (2008). Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes

human cardiosphere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction. *Journal of American College of Cardiology*, 52,1858-1865.

Tassi, E., McDonnell, K., Gibby, K. A., Tilan, J. U., Kim, S. E., Kodack, D. P., ve ark. (2011). Impact of fibroblast growth factor-binding protein-1 expression on angiogenesis and wound healing. *American Journal of Pathology,* 179, 2220-2232.

Tatar, M. (2013). Management diabetis and diabetis polisies in Turkey. *Globalization and Health,* 9, 16.

Tayalia, P., & Mooney, D. J. (2009). Controlled growth factor delivery for tissue engineering. *Advanced Materials*, 21, 3269-3285.

Thompson, J. A., Anderson, K. D., Dipietro, J.M., Zwiebel, J. A., Zametta, M. & Anderson, W.F. (1988). Site-directed neovessel formation in vivo. *Science*, 241, 1349-*1352.*

Tolba, M., Minikh, O., Brovko, L. Y., Evoy, S. & Griffiths, M. W. (2010). Oriented immobilization of bacteriophages for biosensor applications. *Applied Environmental Microbiology,* 76, 528-535.

Tondera, C., Hauser, S., Krüger-Genge, A., Jung, F., Neffe, A. T., Lendlein, A., ve ark. (2016). Gelatin-based hydrogel degradation and tissue interaction *in vivo*: Insights from multimodal preclinical imaging in immunocompetent nude mice. *Theranostics,* 6, 2114-2128.

Trippel, S. B. (1995). Growth factor action on articular cartilage. *The Journal of Rheumatology*, 22, 129- 132.

Tronci, G., Neffe, A. T., Pierce, B. F., & Lendlein, A. (2010). An entropy-elastic gelatin-based hydrogel system. *Journal of Material Chemistry,* 20, 8875-8884.

Turner, P. A., Thiele, J. S., & Stegemann, J. P. (2017). Growth factor sequestration and enzyme-mediated release from genipin-cross-linked gelatin microspheres. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition,* 28, 1826-1846.

Twort, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *The Lancet,* 186, 1241-1243.

Ueda, H., Nakamura, T., Yamammoto, M., Nagata, N., Fukuda, S., Tabata, Y., ve ark. (2003). Repairing of rabbit skull defect by dehydrothermally crosslinked collagen sponges incorporating transforming growth factor beta 1.

*Journal of Controlled Release,* 88: 55-64.

Xavier, W., Sukumaran, M. T., Varma, A. K., Kumar, H., Chellan, G. (2014). Emergence of multi drug resistant bacteria in diabetic patients with lower limb wounds. *Indian Journal of Medical Research,* 140, 435-437.

Xu, J., Chau, Y., & Lee, Y. (2019). Phage-based electrochemical sensors. *Micromachines*, 10, 855.

Veis, A. (1964). The macromolecular chemistry of gelatin. New York. Academic Press.

Vandenheuvel, D., Lavigne, R., & Brüssow, H. (2015). Bacteriophage therapy: Advances in formulations strategies and human clinical trials. *Annual Review of Virology,* 2, 599-618.

Ward, A. G., & Courts, A. (1977). The science and technology of gelatin. New York: Academic Press.

Wang, J.S. (1996). Basic fibroblast growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 67, 1-33.

Wang, Z., Lu, W. W., Zhen, W., Yang, D., & Peng, S. (2017). Novel biomaterial strategies for controlled growth factor delivery for biomedical application. *NPG Asia Materials,* 9, 435-452.

Washio, A., Teshima, H., Yokota, K., Kitamura, C., & Tabata, Y. (2019). Preparation of gelatin hydrogel sponges incorporating bioactive glass capable for the controlled release of fibroblast growth factor-2. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition,* 30, 49-63.

Watanabe, M., Jo, J., Radu, A., Kaneko, M., Tabata, Y. & Flake, A. W. (2010). A tissue engineering approach for prenatal closure of myelomeningocele with gelatin sponges incorporating basic fibroblast growth factor. *Tissue Engineering Part A,* 16, 1645-1655.

WHO (2012). World Health Organization. The evolving threat of antimicrobial resistance. Options for action. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

World Press - Bacteriophageacd. worldpress. com - 2016a.

World Press - Bioinfo2010.worldpress.com - 2016b.

WHO. Bulletin of the World Health Organization, 95 (2017) 233.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., & King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care,* 27, 1047-1053.

Weadock, K. S., Miller, E. J., Bellincampi, L. D., Zawadski, J. P., & Dunn, M. G. (1995). Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *Journal of Biomedical Materials Research,* 29, 1373.

Weadock, K. S., Miller, E. J., Keuffel, E. L., & Dunn, M. G. (1996). Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *Journal of Biomedical Materials Research,* 32, 221-226.

Wenger, A., Stahl, A., Weber, H., Finkenzeller, G., Augustin, H. G., Stark, G. B., ve ark. (2004). Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. *Tissue Engineering,* 109, 1536-1547.

Werner, S., Smola, H., Liao, X., Longaker, M.T., Krieg, T., Hofschneider, P.H. Williams, L.T. 1994. "The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds". *Science,* 266, 819-822

Wietecha, M. S., Chen, L., Ranzer, M. J., Anderson, K., Ying, C., Patel, T. B. ve ark. (2011). Sprouty2 downregulates angiogenesis during mouse skin wound healing". *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology,* 300, H459-H467.

World Press - Bacteriophageacd. worldpress. com - 2016a.

World Press - Bioinfo2010.worldpress.com -**2016b**.

www.diabetesatlas.org/across-the-globe.html

www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index1.html

Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., & Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature,* 407, 242-248.

Yamamoto, M., Tabata, Y., & Ikada, Y. (1998). Ectopic bone formation induced by biodegradable hydrogel incorporating bone morphogenetic protein. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition,* 9, 439-458.

Yamamoto, M., Tabata, Y., Hong, L., Miyamoto, S., Hashimoto, N., & Ikada, Y. (2000). Bone regeneration by transforming growth factor beta1 released from

a biodegradable hydrogel. *Journal of Controlled Release,* 64, 133-142.

Yamamoto, M., Takahashi, Y., & Tabata, Y. (2003). Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. *Biomaterials*, 24, 4375-4383.

Yamamoto, M., Takahashi, Y., & Tabata, Y. (2006). Enhanced bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein-2 a biodegradable hydrogel. *Tissue Engineering,* 12, 1305-1311.

Yamamoto, N., Akamatsu, H., Hasegawa, S., Yamada, T., Nakata, S., Ohkuma, M., ver ark. (2007). Isolation of multipotent stem celss from mouse adipose tissue. *Journal of Dermatological Science,* 48, 43-52.

Yanagawa, F., Sugiura, S., & Kanamori, T. (2016). Hydrogel microfabrication technology toward three dimensional tissue engineering. *Regenerative Therapy,* 3, 45-57.

Yang, S., Leong, K. F., Du, Z., & Chua, C. K. (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Engineering,* 7, 679-689.

Yang, M., He, S., Su, Z., Yang, Z., Liang, X., & Wu, Y. (2020). Thermosensitive injectable chitosan/collagen/β-glycerophosphate compositey for enhancing wound healing by encapsulating mesenchymal stem cell spheroids. *ACS Omega,* 5, 21015-21023.

Yap, M. L., & Rossman, M. G. (2014). Structure and function of bacteriophage T4. *Future Microbioogy,* 9, 1319-1327.

Yoon, H. H., Bhang, S. H., Shin, J. Y., Shin, J., & Kim, B. S., (2012). Enhanced cartilage formation via three-dimensional cell engineering of human adipose-derived stem cells. *Tissue Engineering Part A,* 18, 1949-1956.

Yoshimoto, H., Shin, Y., Terai, H., & Vacanti, J. (2003). A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials,* 24, 2077-2082.

Young, S., Wong, M., Tabata, Y., & Mikos, A.G. (2005). Gelatin as a delivery vehicle for controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release,* 109, 256-274.

Yun, Y.-R., Won, J. E., Jeon, E., Lee, S., Kang, W., Jo, H., ve ark. (2010). Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *Journal Tissue Engineering,* 2010, 218142.

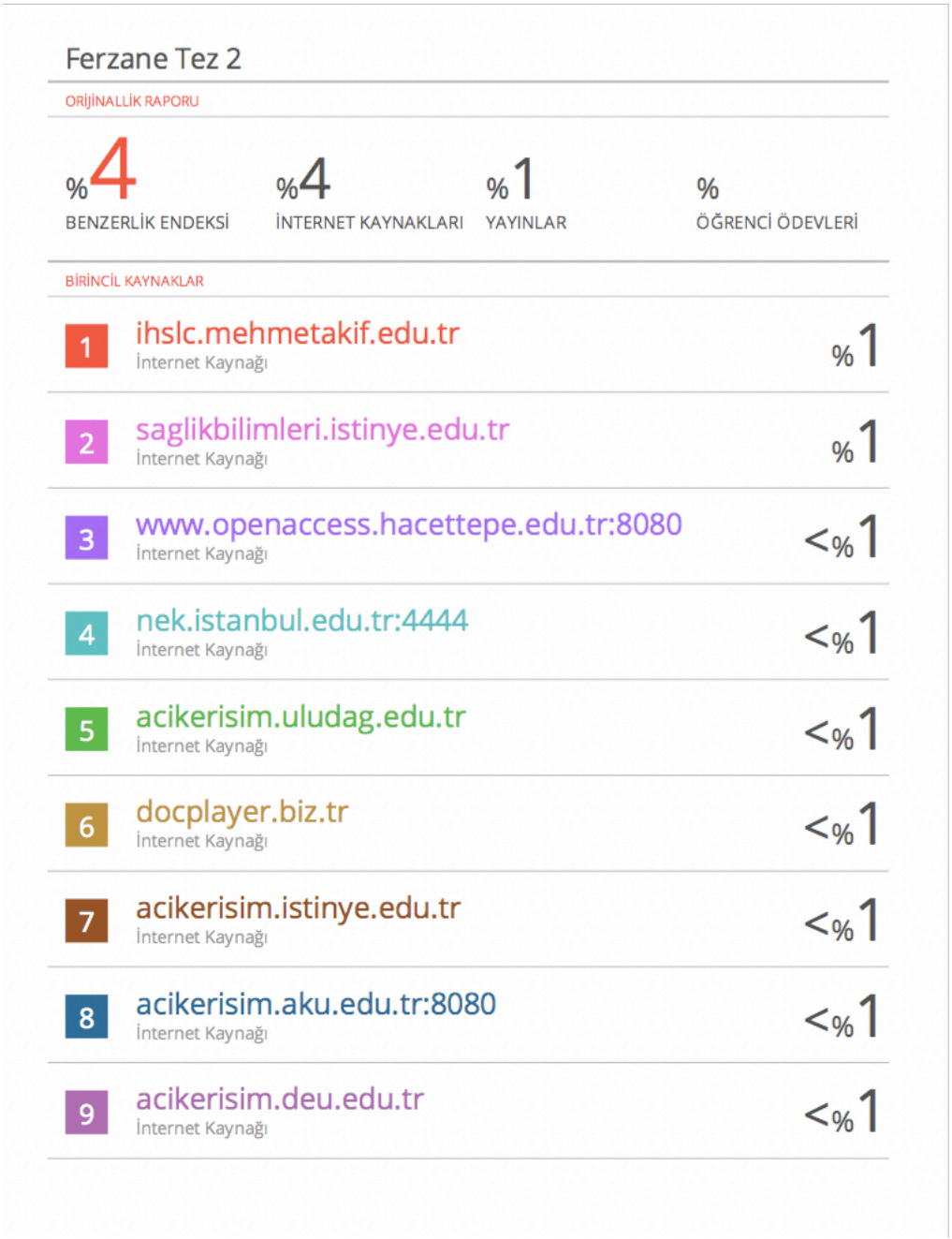
Zhang, J., & Li, Y. (2016). Therapeutic uses of FGFs. *Seminars in Cell and Development Biology,* 53, 144-154.

Zhang, Y., Peng, X., Zhang, H., Watts, A.B., Ghosh, D. (2018). Manufacturing and ambient stability of shelf freeze dried bacteriophage powder formulations. *International Journal of Pharmacology.*. 542, 1-7.

Zhu, X., H., Tabata, Y., Wang, C. H., & Tong, Y. W. (2008). Delivery of basic growth factor from gelatin microsphere scaffold for the growth of human embilical vein endothelial cells. *Tissue Engineering. Part A*, 14, 1939-1947.

Zimmet, P., Alberti, K. G., Magliano, D. J., & Bennett, P. H. (2016). Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. *National Reviews Endocrinology*, 12, 616-222.

**İNTİHAL RAPORU**



Ferzane Tez 2

ORİJİNALLİK RAPORU

| %4 | %4 | %1 | % |
|---|---|---|---|
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

BİRİNCİL KAYNAKLAR

| | | |
|---|---|---|
| 1 | ihslc.mehmetakif.edu.tr<br>İnternet Kaynağı | %1 |
| 2 | saglikbilimleri.istinye.edu.tr<br>İnternet Kaynağı | %1 |
| 3 | www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 4 | nek.istanbul.edu.tr:4444<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 5 | acikerisim.uludag.edu.tr<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 6 | docplayer.biz.tr<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 7 | acikerisim.istinye.edu.tr<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 8 | acikerisim.aku.edu.tr:8080<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 9 | acikerisim.deu.edu.tr<br>İnternet Kaynağı | <%1 |