

# **TEKNOFEST**

## **HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ**

### **BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI**

#### **PROJE DETAY RAPORU**

#### **PROJE KATEGORİSİ**

**PROJE ADI:**İki Katmanlı Kornea Benzeri Epitel Doku İskelesi  
Üretimi: Oküler İritasyon Testi Uygulaması

**TAKIM ADI:**BuggsBunnys

**TAKIM ID:**T3-18043-155

**DANIŞMAN ADI:**Dr. Ömer AKTÜRK

## İçindekiler

### 1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Avrupa mevzuatına göre, Avrupa Birliğinde kozmetik ürünler ve kozmetik bileşenler için hayvan testleri sırasıyla 2004 ve 2009 yıllarında yasaklanmıştır. Bununla birlikte hayvanlar üstünde test edilmiş bileşenlere sahip kozmetik ürünlerin ticarileşmesi de 2009 yılında yasaklanmıştır. Bu sınırlamaların sonucunda da Alternatif Metotların Onaylanması için Avrupa Merkezi Kurumu (ECVAM), kozmetik bileşenlerin toksisitesi ve güvenliğinin tahmini için onaylı hücre temelli in vitro modeller listesi önermiştir [1]. Karışımların ve formülasyonların göz tahrişi potansiyelinin değerlendirilmesi, aynı zamanda, kimyasalların taşınması için AB kozmetik Direktifi kapsamında kozmetik bileşenlerin etiketlenmesi ve pestisitlerin ve ev ürünlerinin etiketlenmesi için REACH (Kayıt, değerlendirme, yetkilendirme ve kimyasalların kısıtlanması) mevzuatına uymak için bir gerekliliktir[2]. GHS (Küresel Uyumlaştırılmış Kimyasal Sınıflandırma ve Etiketleme Sistemi) temel olarak, yabancı maddelerin ve karışımların doğrudan tavşan gözünün konjonktival kesesi içerisine sokulduğu en yaygın kullanılan göz tahrişi tahlili olan Draize göz tahriş testine dayanmaktadır[3]. GHS sınıflamasına göre, GHS Kategori 1 (oküler aşındırıcılar), maruz kaldıktan sonraki 21 gün içinde tamamen geri dönüşü olmayan göz dokularında ciddi ilk yaralanmalara veya göze ve görmede ciddi hasarlara neden olan test kimyasalları anlamına gelir [4,5]. GHS Kategori 2, maruziyetten sonraki 21 gün içinde tamamen geri dönüşümlü olan gözde önemli değişiklikler üreten test kimyasalları anlamına gelir. Aşındırıcılar ve tahriş edici olmayan test kimyasalları GHS No kategorisi olarak adlandırılır.

Bu proje ile de hayvanlarda yapılan göz iritasyon testlerinin önlenmesi amaçlanmaktadır. Buna dayanarak elektro-eğirme yöntemini kullanarak jelatin-PEO-bal çözeltisinin NHS aracılığı ile çapraz bağlanmasını sağlayıp bir kornea epitel doku iskelesi üretilir. Bu doku iskelesi üzerine insan kornea epitel hücresi ekilerek yeniden inşa edilmiş kornea epitel hücresi (RhCEc) elde edilir ve üzerinde denemeler yapılabilir. Kozmetik ürünlerin, kimyasalların ve deterjanlar gibi maddelerin etkilerinin yapay bir doku üzerinde uygulanmasına olanak sağlanmış olur.

### 2. Problem/Sorun:

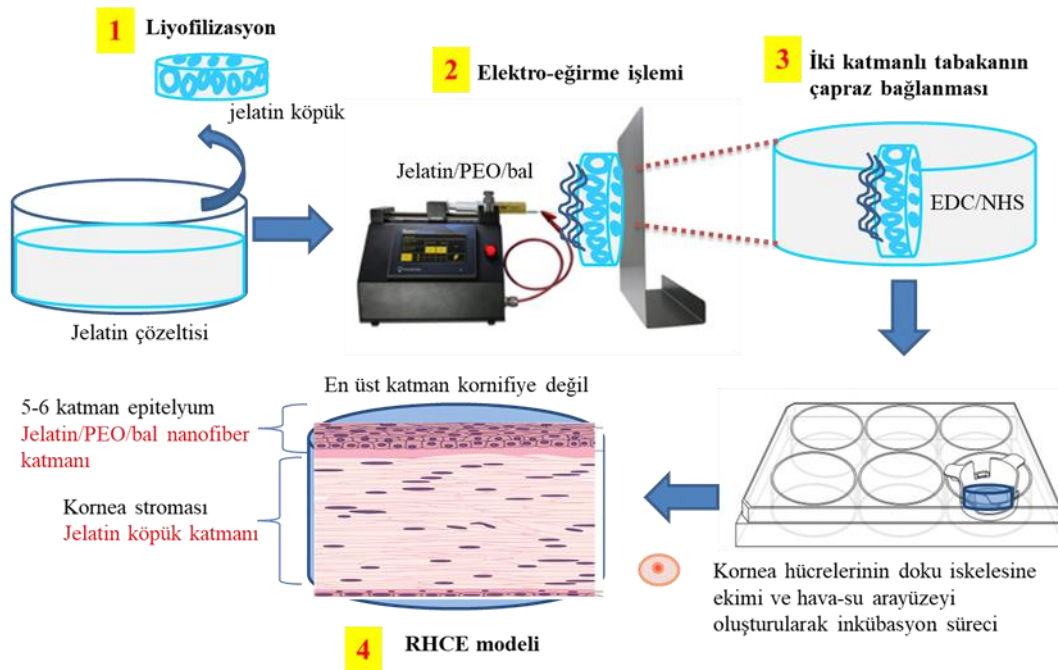
Bu projede ele alınan asıl sorun kozmetik ürünlerin, kimyasalların ve deterjanlar gibi ürünlerin hayvanlar üzerinde test edilmesi, bunun sonucunda göz dokularında geri dönüşü olmayan tahribatlara neden olmasıdır.



**Şekil -1 :** Tavşan üzerindeki yapılan deneyleri sonuçlanan yaralanmalar.

### 3. Çözüm

Çözüm önerimiz daha stabil ve daha sağlam jelatin bazlı kornea epitel doku iskelelerinin zararlı toksik kimyasallar kullanılmadan yenilikçi bir yaklaşımla RcHE modeli olarak geliştirilmesi ve geliştirilen RcHE modelinin in vitro göz iritasyon testi için uygulanabilirliğinin araştırılması üzerinedir. İn vitro göz iritasyon testleri için kullanılan RcHE modelleri; deney hayvanları (tavşanlar) kullanılarak yapılan testlere (Draize test) alternatif olarak geliştirilmiş, deney hayvanlarının acı çekmesi veya öldürülmesini kısmen ya da tamamen engellemesi açısından önem taşır.



**Şekil-2:** Oluşturulacak yeniden inşa edilmiş insan kornea benzeri epitel doku modelinin şematize hali

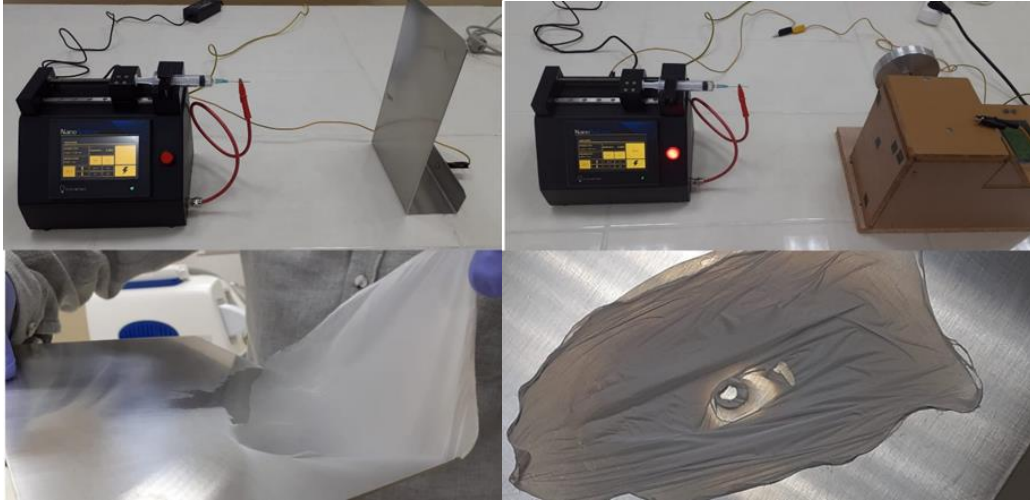
### 4. Yöntem

Burada ilk olarak doku iskelesi üretimi yapılacaktır. Yapılan bu doku iskelesi için çeşitli testler yapılacaktır. Daha sonra doku iskelesine hücre ekimi yapılarak bunlar içinde testler yapılacaktır. Genellikle test grupları ODTÜ Merlab'da gerçekleştirilecektir.

#### 4.1. Kornea doku iskelelerinin üretimi

Kornea doku iskelesinin alt katmanı olan jelatin köpüğü üretmek için öncelikle %3'lük asetik asit çözeltisi içinde jelatin çözeltileri hazırlanacak ve cam kalıplara dökülerek -80 °C buzdolabında 1 gün boyunca dondurulacaktır. Daha sonra liyofilizatörde dondurup-kurutma işlemiyle tamamen kuruyana kadar köpüksü yapı üretilecektir. Nanofiberli yapının, yani doku iskelesinin üst katmanının, üretilmesi için elektro-eğirme yöntemi

kullanılacaktır. Elektro-eğirme cihazı ile nanofibröz matris üretimi için ön denemeler yapılmıştır. Bu ilk denemelerde; alet çalışma parametreleri, yani şırınga pompası akış hızı 0,8-1 mL/saat, voltaj 15-20 kV, şırınga metal ucu toplayıcı arası mesafe 25-30 cm aralıklarında ayarlanarak sadece polietilen oksit (PEO, %1 su içinde çözünmüş) ile nanofiberli matrisler elde edilebilmiştir (Şekil 3). Bu çalışmada; iskele ana malzemesi olarak jelatin, elektro-eğirme işleminde yardımcı polimer olarak polietilen oksit ve katkı maddesi olarak lokal bir marketten alınmış bal kullanılacaktır. Bu 3 malzeme ile farklı içeriklerde karışımlar elde edilerek elektro-eğirme deneyleri yapılacaktır. Alet çalışma parametreleriyle oynanarak sağlam ve nanofiberli yapıda iskeleler üretilmeye çalışılacaktır. Bu nanofiberli iskeleler, toplayıcı alüminyum levha üstüne sabitlenmiş liyofilize jelatin köpükler üstünde toplanmaya çalışılacaktır. Alüminyum levha sabit ya da hareketli olarak seçilerek denenecektir. Deneyler için daha önceki benzer çalışmalar baz alınacaktır [6, 7]. Üretilen iskelelerin sulu ortam dayanıklılıklarını artırmak için ayrıca EDC (*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidehydrochloride)/NHS (*N*-Hydroxysuccinimide) kimyasallarıyla çapraz bağlama işlemi yapılacaktır. Bütün işlemler bittikten sonra bütün iskeleler, liyofilizatörde dondurup-kurutma işlemine tabi tutulacak ve +4 °C'de buzdolabında bir sonraki testlere kadar desikatör içinde saklanacaktır.



**Şekil-3:** Polietilen oksit kullanarak sabit ve dönen alüminyum toplayıcı levhalarda toplanan nanofiberli matris örnekleri.

## 4.2. Doku iskeleleri fizikokimyasalkarakterizasyon testleri

### 4.2.1. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi (FTIR) spektrofotometresi

Test gruplarının kimyasal yapısı; ATR Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometresi ile analiz edilecektir. Her bir spektrum ZnSe ATR kristal hücresi üstünde transmitansmodu içinde  $4 \text{ cm}^{-1}$  netliği ve  $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$  spektral aralıkta 256 taramanın toplamıyla elde edilecektir.

### 4.2.2. Termo-gravimetrik analiz (TGA)

Test gruplarının TGA analizi yapılacaktır. İskeleler azot içeren atmosferde 22- 700 °C sıcaklık aralığında dakikada 30 °C tarama hızıyla analiz edilerek termal degradasyon desenleri çıkarılacaktır.

#### 4.2.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Test gruplarının morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu ile incelenecektir. Analizden önce numuneler altın-paladyum ile kaplanacak ve iskelelerin tepeden ve yandan kesit mikrografi görüntüleri alınarak yüzey yapısı incelenecektir.

#### 4.2.4. Gözenek boyut dağılımı analizi

İskelelerin gözenek boyut dağılımı, cıvalı porozimetre ile düşük basınç analizi (0-50 psi) gerçekleştirilecektir. Kısaca, iskele gözenekleri basınç 0'dan (büyük gözenekler) 50 psi (nispeten küçük gözenekler) değerine artırılarak cıva ile doldurulacaktır. Gözenek hacmine (gözenekler içine giren cıva hacmi/iskele ağırlığı) karşı ilgili gözenek boyutunu gösteren dataporozimetre ile elde edilecektir.

#### 4.2.5. Sulu ortamda hidrolitik ve enzimatik bozunum testleri

Test gruplarının enzimli ya da enzimsiz sulu ortamlardaki degradasyonu incelenecektir [6, 7]. Hidrolitikdegradasyon (HD) için, kesilen numuneler (1 cm x 1 cm) PBS (pH: 7,2, 0,01M, 5 mL) içine konacak ve 37 °C' de 2 hafta kadar inkübe edilecektir. Enzimatik degradasyonu (ED) incelemek için ise, iskeleler 60 µL (1 mg/mL, d-H<sub>2</sub>O) tip I kollajenaz çözeltisi eklenmiş aynı inkübasyon ortamına (pH: 7,2, 0,01M, 5 mL) konularak tam degradasyon gerçekleşene kadar beklenilecektir. Belirli inkübasyonperiyotlarında iskeleler inkübasyon ortamından alınarak gravimetrik analiz ile kuru ağırlıkları ölçülecek ve % degradasyon sonuçları aşağıdaki denklemlerle hesaplanacaktır:

$$\%Degredasyon = \frac{W_d - W_t}{W_d} \times 100 \quad (1)$$

$W_d$  test örneklerinin başlangıçtaki kuru ağırlığını,  $W_t$  ise her bir inkübasyon zamanı sonundaki kuru ağırlıkları temsil etmektedir.

### 4.3. Doku iskeleleri *in vitro* biyouyumluluk testleri

#### 4.3.1. Hücre kültürü

Yetişkin insan kornea epitel hücreleri (HCEc) kornea epiteli benzeri doku oluşumu deneylerinde kullanılacaktır. Hücreler, insan kornea büyüme katkısı (HCGS) ile hacimsel olarak 100:1 oranında karıştırılmış serumsuz vasat (Epilife® bazal vasat) içinde hücre kültür flasklarında kültüre edileceklerdir. Hücreler %70-80 konfluansulaştıkları zaman ya pasajlanacak ya da tripsin/EDTA ile yüzeyden kaldırılarak otomatik hücre sayıcı canlı hücre yoğunluğu hesaplanacaktır. Hücre kültürü için hücre sağlayıcı firmanın önerdiği standart hücre kültür protokolleri takip edilecektir.

#### 4.3.2. Sitotoksitesite testleri

Doku iskeleleri önce sterilizasyon işlemine maruz bırakılacaktır. Örnekler sterilizasyon

sıvısında (%70 etanol, %1 penisilin-streptomisin karışımı) 1 gece bekletilecek ve bu süre sonunda ayrıca UVC ışığına 30 dakika boyunca maruz bırakılacaktır. En son olarak, iskeleler etanol kalıntılarında arındırmak için steril PBS ile iyice yıkanacaktır. 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür flasklarında %70-80 konfluensiye çoğaltılan HCEc hücre hattı tripsinaj edilerek kaldırılacak ve 96 kuyucuklu plakaya ekilecektir (1×10<sup>4</sup> hücre/kuyu). Hücreler kuyucuklara ekildikten sonra 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve nemli hava içeren inkübatörde 1 gün bekletilecektir. Doku iskeleleri de özütleme sıvısında (HCEc kültür besiyeri) inkübatöre koyulup iki zaman periyodu (1 ve 3 gün) boyunca özütlenecektir. Bu 1 günlük inkübasyon sonunda hücreli plakalarda bulunan hücre besi yeri özüt sıvısı (1 ve 3 günlük) ile değiştirilecektir. İskele özütü içermeyen, sadece tam hücre kültür vasatı içeren kuyucuklar negatif kontrol grubu olarak kullanılacaktır. 1 günlük inkübasyon süresi sonunda, kuyucuklardan vasat çekilecek, PBS ile yıkanarak yerine 100 µL methylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromide (MTT) çalışma çözeltisi (0,5 mg/mL, fenol içermeyen DMEM içinde çözülmüş) eklenecektir. 3 saat boyunca karanlık ortamda inkübe edildikten sonra oluşan formazan kristalleri 100 µL DMSO ile çözülecektir. 200 rpm'de 5 dakika boyunca çalkalanan mikropalakalara ELİSA plaka okuyucuda 550 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler yapılacaktır. Test örneklerinin elde edilen OD sonuçları, negatif kontrol (örnek içermeyen tam hücre kültür medyumunu) sonuçlarına normalize edilerek % hücre canlılığı (HC) sonuçları aşağıdaki formüle göre hesaplanacaktır:

$$\%HC = \frac{OD_{\text{örnek}}}{OD_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (2)$$

#### 4.3.3. Hücre yapışması ve morfoloji inceleme deneyleri

Hücre yapışması ve morfoloji inceleme deneyleri için yukarıdaki deney prosedürüne benzer bir yaklaşım kullanılacaktır. Hücre sayıcı ile sayılan hücreler, içinde steril coverslip bulunan 48 kuyucuklu plakaya ekilecek (2×10<sup>4</sup> hücre/kuyu) ve 1 gün boyunca inkübe edilecektir. Bu 1 günlük inkübasyon sonunda hücreli plakalarda bulunan hücre besi yeri özüt sıvısı (1 ve 3 günlük) ile değiştirilecek ve 1 gün daha inkübe edilecektir. İnkübasyon süresi sonunda kuyular öncelikle PBS ile yıkanacak, daha sonra ise glutaraldehit çözeltisiyle (%25) 15 dakika oda sıcaklığında fikse edilecektir. Fiksasyon işleminden sonra hücreli coverslipler PBS ve ardından steril saf su ile yıkanarak iyice kurutulacaktır. Örnekler, SEM ile incelenecektir. Analizden önce numuneler altın-paladyum ile kaplanacak ve hücrelerin yüzey yapısı incelenecektir.

#### 4.4. Tekrardan inşa edilmiş insan kornea epitel benzeri (RHCE) doku modeli oluşturulması

##### 4.4.1. Hücrelerin doku iskelelerine ekimi

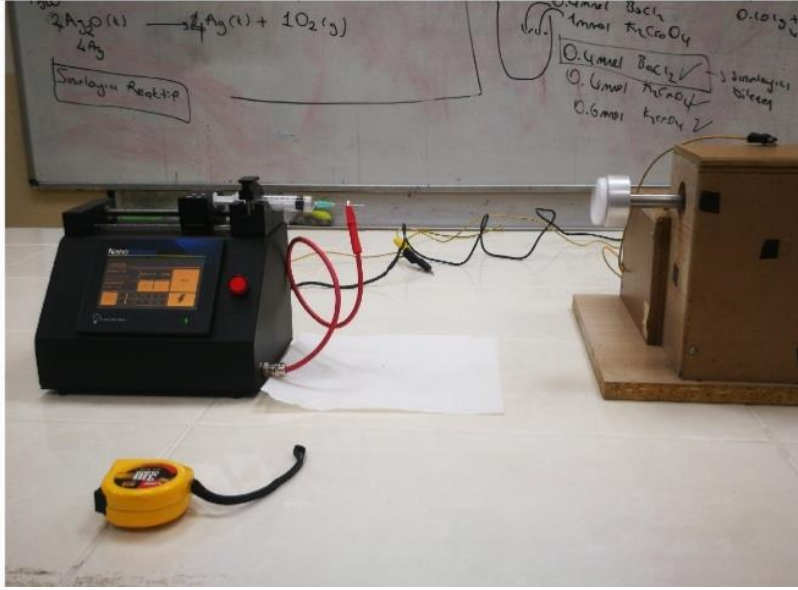
Daha önceki testlere göre, en uygun fiziksel/kimyasal özellikleri olan ve sitotoksik etkisi olmayan iskeleler seçilecek ve UVC ışığına 1 saat boyunca maruz bırakılacaktır (her bir yüzeyi birer saat). Daha sonra iskeleler sterilizasyon sıvısında (%70 etanol, %1 penisilin-

streptomisin karışımı) 1 gece bekletilecek ve bu süre sonunda etanol kalıntılarında arındırmak için steril PBS ile iyice yıkanacaktır. Sterilize edilen iskeleler, 48-kuyucuklu plakaların içine yerleştirilecek ve HCEc ile üstlerine ekim yapılacaktır. İskelede yapışan ve çoğalan hücrelerin farkı zamanlardaki (1, 7 ve 14 gün) takibi MTT hücre canlılık testi ile daha önce bahsedildiği şekilde yapılacaktır. Ayrıca SEM analizi ile iskele üstündeki hücreler fikse edildikten sonra incelenecektir. RHCE doku modeli oluşturma deneyleri için ise iskeleler 6-kuyucuklu hücre kültür plakaları içindeki hücre kültür insertleri üstüne yerleştirilerek HCEc ile belirli bir hücre yoğunluğunda ( $2 \times 10^5$  /insert) ekim yapılacaktır. 7 gün boyunca tam hücre kültür besiyerine (büyüme sıvısı ilaveli Epilife® bazal vasat) içine batırılmış bir şekilde hücreler büyütülecek, daha sonra hava-su ara yüzeyi oluşturularak 14 gün boyunca daha tam hücre kültür besiyeri içinde inkübasyon işlemi devam edecektir. Besi ortamı her iki günde bir değiştirilecektir. İnkübasyon sonunda elde edilen RHCE modeli alınarak iskele içinde büyüyen HCEc morfolojisi hematoksilin ve eozin (H & E boyama) histolojik boyama testleri ile incelenecektir. Bu test ile hücrelerin iskele kesitindeki katman katman farklılaşmış yapısı gözlemlenmeye çalışılacaktır.

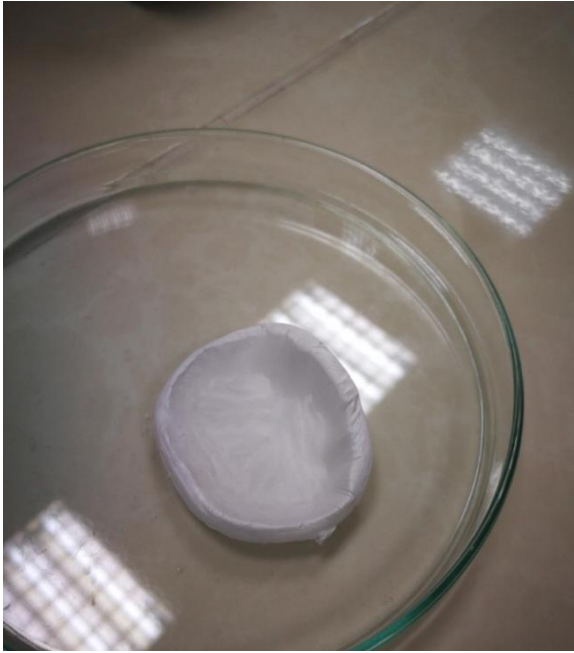
#### **4.4.2. Negatif ve pozitif kontrol hücre canlılık testleri**

Negatif veya pozitif kontrol hücre canlılığı MTT analizi ile değerlendirilecektir. Kuyucuklu hücre kültür plakalarına yerleştirilen RHCE modeli öncelikle 30 dakika boyunca PBS ile yıkanacaktır. Daha sonra model dokular de-iyonize su (negatif kontrol) veya metil asetata (pozitif kontrol) 37 °C' de 30 dakika boyunca maruz bırakılacak ve sonra hücre kültür besiyerine 12 dakika batırılacaktır. Daha sonra 120 dakika boyunca hücre kültür besiyerinde inkübe edilecektir. Bu süreç sonunda, MTT (0,5 mg/mL) solüsyonunda 180 dakika boyunca inkübe edilerek inkübasyon sonunda dokular PBS ile yıkanacak ve DMSO eklenerek formazan kristalleri 120 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda özütlenecektir. Formazan özütlüleri 96 kuyucuklu plakalara eklenerek ELISA plaka okuyucuda 550 nm dalga boyunda OD ölçümleri yapılacaktır. Sadece DMSO eklenerek ölçülen OD değerleri kör (blank) olarak kullanılacaktır.

Yaptığımız denemelerde ilk olarak optimum koşullar saptanmıştır. Alt katman için kornea doku iskele üretiminde bahsedilen şekilde yapılmıştır. Üst katman için ise elektro-eğirme solüsyonu (Jelatin 0,1g/PEO 0,2g/ Bal 0,2g), döner levhada küçük disk(D=5 cm), elektro-eğirme cihazındaki şırınga ile döner levha arası mesafe: 23,5 cm, şırıngadaki solüsyonun akış hızı: 0,8 mL/saat, voltaj:0,8 kV. Bu koşullarda yapılan deneylerde elde edilen görüntüler Şekil-4 ve Şekil-5 de gösterilmiştir. Sonuç olarak doku iskelesi üretimi için yapılan ilk denemelerde başarı sağlanmıştır.



Şekil-4: Optimum koşullarda üretilmeye çalışılan doku iskelesi



Şekil-5: Liyofilizatörde üretilen alt katmanın üzerine elektro-eğirme cihazı ile spinlenmiş solüsyon

### 5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Projemiz piyasa da var olan Draize Göz Testinin yeri olarak hayvan deneylerinin yapılmasını engelleyecektir. Bu sayede kozmetik ürünlerin, deterjanların ve kimyasalların hayvanlar üzerinde test edilmesi yerine geliştireceğimiz kitler üzerinde test edilmesi sağlanacaktır.



Bu projeye geliştirilecek olan model, halihazırda ticari olarak satılan yabancı menşeli diğer kilitlere muadil nitelikte olacağı ve daha önce Türkiye’de benzeri yapılmadığı veya yapılmaya çalışılmadığı için büyük önem ve yenilik özelliği taşımaktadır.

Yurt dışında benzeri bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Fakat o çalışmada ticari insan kornea benzeri epitel (RhCE) kiti kullanılmıştır. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada ise doku iskelesini iki aşamada laboratuvar şartlarında kendimiz ürettik. Projede bal ve jelatin gibi organik malzemeler kullandık. Bal kullanarak ekim yaptığımız hücrenin beslenmesini ve yapışmasını sağladık.

## 6. Uygulanabilirlik

Projemiz 4 ay sürecek olan bir çalışma sonucunda hazırlanacaktır. Laboratuvarında geçecek olan bu süreçte kornea doku iskelesi üretimi, bu iskeleye fizikokimyasal ve karakterizasyon testleri uygulanacaktır. Kornea doku iskelesine in vitro biyouyumluluk testi de yapıldıktan sonra, tekrardan inşa edilmiş insan kornea epitel benzeri (RHCE) doku modeli oluşturulacaktır.

Tekrardan inşa edilmiş insan kornea benzeri epitel doku (RHCE) modeli olarak anılan kornea doku iskeleleri bu projeye ticari ürünlerle eşdeğer niteliktedir. Ve ülke genelinde benzer bir ürün mevcut olmadığından ticarileşebilir. Karakterizasyon testlerinin sağlıklı olmaması, test kitinin Avrupa standartlarına uygun olmaması, doku iskelesi üretilirken çatlaklar meydana gelmesi ve maddi olarak mevcut testten pahalı olursa ticarileşmesi mevcut riskler arasındadır.

## 7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

İP No	İş Paketlerinin Adı ve Hedefleri	Kim(ler) Tarafından Gerçekleştirileceği	Zaman Aralığı (..-.. Ay)	Başarı Ölçütü ve Projenin Başarısına Katkısı
1	Kornea doku iskelelerinin üretimi	Takım lideri ve bütün araştırmacı öğrenciler	1-29 Şubat	Liyofilizasyonla sağlam ve köpüksü yapıda alt katmanın üretimi, elektro-eğirme operasyon parametrelerinin nanofiberli matris üretimi için optimizasyonu
2	Doku iskeleleri fizikokimyasal karakterizasyon testleri	Takım lideri ve bütün araştırmacı öğrenciler	15-30 Haziran	İskelenin alt katmanının gözenekli, üst katmanın nanofiberli (100-300 nm) olması, iki katmanlı yapının çapraz bağlama sonucu sulu ortam kararlılığının yüksek olması (en az 14 gün bozunuma dayanması).

3	Doku iskeleleri <i>in vitro</i> biyouyumluluk testleri	Takım lideri ve bütün araştırmacı öğrenciler	1-30 Temmuz	Hücre canlılığı oranlarının en az %70 olması. Doku özütlerinin hücreler üstünde herhangi bir toksik etkisi olmaması
4	Tekrardan inşa edilmiş insan kornea epitel benzeri (RHCE) doku modeli oluşturulması	Takım lideri ve bütün araştırmacı öğrenciler	1-30 Ağustos	Hücrelerin doku iskeleleri içinde zamanla hızlı bir şekilde sayısının artması, iskele içinde farklılaşmış katmanlar oluşturması

**Tablo-1:** Proje Zaman Planlaması \*Covid-19 sebebiyle çalışmalara bir müddet ara verildi.\*

<b>Kuruluştaki Bulunan Altyapı/Ekipman Türü, Modeli</b> (Laboratuvar, Araç, Makine-Teçhizat, vb.)	<b>Projede Kullanım Amacı</b>
Kırıkkale Üniversitesi Biyomühendislik Laboratuvarı (Bütün laboratuvar makine-teçhizat ve malzemeleri)	Doku iskelesi hazırlanması ve üretimi, hidrolitik ve enzimatik bozunum testleri
Elektro-eğirme Cihazı (Starter Kit, İnovento, Türkiye)	Nanofiberli yapıda doku iskelesi üretimi
Otomatik hücre sayıcı (Countess™ II FL Automated Cell Counter)	Hücre sayım deneyleri
Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (KÜBTUAM) (Hücre kültür labı, altyapı ve diğer olanakları)	Doku iskeleleri <i>in vitro</i> hücre kültür testleri
UV-Vis spektroskopisi (PowerWave XS2 Microplate Spectrophotometer, BioTek, ABD)	MTT testlerinde OD ölçümü
Floresan mikroskobu (Leica, DMI6000B)	Floresan boyalı hücreleri görüntüleme
Liyofilizatör (Christ, Alpha 1-2 LD Plus)	Köpük yapıda doku iskelesi üretimi
Santrifüj cihazı (Benchmark LC-8, Benchmark Scientific)	Hücre kültür deneylerinde

**Tablo-2:** Ekipmanlar ve kullanım amaçları

**Proje tahmini bütçesi:** Projeye harcanacak tutar malzemeler için 8,800 TRY, hizmet alımı için ise 1000 TRY olmak üzere 9,800 TRY bütçe gerekmektedir.

**Projenin en az maliyet ile uygulanabilirliği:** Kornea hücresi yerine elimizde mevcut bulunan deri keratinosit hücrelerini kullanarak ve polietilen oksit, çapraz bağlayıcılar gibi kimyasalları elimizde olduğu kadar kullanarak proje maliyetini toplamda 9,800 TRY'den 3,600 TRY'ye kadar düşürebiliriz.

\*Harcamaların bir kısmı doku iskelesi oluşturulurken harcanmıştır (2,600 TRY).

\*Hizmet alımı harcamaları (1000 TRY) 15 Haziran-30 Temmuz tarihleri arasında yapılacaktır.

\*Hücre alınması durumunda Ağustos ayında son harcamalar yapılacaktır. Ancak yeni bir hücre almak yerine elimizde var olan hücre kullanılabilir durumdadır.

### 8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):

Hayvan severler, kozmetik ve kimyasal ürünleri üretenler, denendiği laboratuvarlar ve bu laboratuvardaki çalışanlar hedef kitemizdi. Problemi yaşayanlar denek hayvanları yani tavşan, fare vb. benzeri hayvanlar.

Bu hayvanlar her ne kadar deneyler için kullanılmak üzere üretilse de üzerlerinde denenen ilaçlar, deterjanlar ve çeşitli kimyasallar hayvanlar üzerinde tahribata sebebiyet veriyor.

### 9. Riskler

#### \*Risk Yönetimi Tablosu\*

İP No	En Önemli Riskler	Risk Yönetimi (B Planı)
1	Sağlam yapıda liyofilize köpük üretilmemesi. Gözeneklerde başarı elde edilmez. Nanofiber yapı elde edilemez.	Jelatin yerine daha sağlam özellikte kollajen kullanılabilir.
2	EDC/NHS çapraz bağlama işleminin yeterli olmaması. Hücreler birbirine tutunmaz	Gluteraldehit kullanılabilir.
3	Kornea hücrelerinde sıkıntı olması Epidermal Deri keratinosit hücreleri kullanılabilir.	L929 fibroblastlar da sitotoksisite testleri için uygundur.
4	Kornea hücrelerinde sıkıntı olması	Bunun yerine insan epidermalkeratinositi kullanılabilir. MatTek firmasının <i>in vitro</i> modeli olan EpiOcular™ ticari ürününde insan epidermalkeratinositi kullanılmıştır.

**Tablo-3:** Riskler ve Çözüm Önerileri

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

### Proje hayata geçirilirken ortaya çıkabilecek problemler

- Polietilen tam çözünmez ise spinlenme gerçekleşmeyebilir.
- Elektro eğirme metodu uygulanırken optimum koşullar belirlenemezse doku iskelesi istenen şartlara uygun üretilemeyebilir.
- Sağlam yapıda liyofilize köpük üretilemez ise gözenekli ve nanofiber yapı elde edilemez. Bu sebeple liyofilizasyon sonrası oluşan köpüksü yapı tam anlamıyla kurumuş olmalı.
- EDC/NHS çapraz bağlama işleminin yeterli olmaması durumunda hücreler birbirine tutunamayabilir.
- Kornea hücrelerinin tedarikinde bir sorun gerçekleşebilir bu durumda epidermal deri keratinosit hücreleri kullanılabilir.

Zaman planlamasında iş paketleri, iş tanımları ve süreçleri ayrıntılı bir şekilde tablo-1’de gösterilmiştir.

Malzeme	Fiyat
Hücre besiyeri	1,550 TRY
Jelatin fiyatı (150 gr)	36 TRY
Balparmak bal	20,45 TRY
Polietilen oksit	72,99+KDV-1.926,97+KDV TRY
Asetik asit fiyatı	350,47 TRY
Kornea hücresi (Yetişkin)	6,200TRY (572\$)

**Tablo-4:** Gerekli malzeme listesi ve fiyatları

### 10. Proje Ekibi

**Takım Lideri:** Yaren ERDEM

Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Okul	Projeyle veya problemle ilgili tecrübesi
Raziye KORAŞ	Araştırmacı	Kırıkkale Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü- 4.Sınıf	Laboratuvar dersleri ve yapılan proje denemeler
Sahra Ezgi SÜNGÜ	Araştırmacı	Kırıkkale Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü- 4.Sınıf	Laboratuvar dersleri ve yapılan proje denemeler
Baraa MEHYO	Araştırmacı	Kırıkkale Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü- 4.Sınıf	Laboratuvar dersleri ve yapılan proje denemeler
Beyza Nur CAN	Araştırmacı	Kırıkkale Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü- 4.Sınıf	Laboratuvar dersleri ve yapılan proje denemeleri

## 11. Kaynaklar

- [1] Almeida, A., Sarmiento, B., Rodrigues, F., 2017, "Insights on In Vitro Models for Safety and Toxicity Assessment of Cosmetic Ingredients", *International Journal of Pharmaceutics*, 519, pp. 178-185.
- [2] European Commission. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. OJ. L396, (49), 1-849 (2006).
- [3] Draize, J. H., Woodard, G., Calvery, H. O. Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *J Pharmacol Exp Ther* November. 82, 377-390 (1944).
- [4] Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). United Nations New York and Geneva (2013).
- [5] Adriaens, E. Retrospective analysis of the Draize test for serious eye damage/eye irritation: importance of understanding the in vivo endpoints under UN GHS/EU CLP for the development and evaluation of in vitro test methods. *Archtox*. 88, 701-723 (2014).
- [6] Akturk, O., & Keskin, D. Collagen/PEO/gold nanofibrous matrices for skin tissue engineering. *Turkish Journal of Biology*. 40, 380-398 (2016).
- [7] Akturk O., Kismet K., Yasti A.C., Kuru S., Duymus M.E., Kaya F., Caydere M., Hucumenoglu S., Keskin D., Wet electrospun silk fibroin/gold nanoparticle 3D matrices for wound healing applications. *RSC Advances*. 6 (16), 13234-13250 (2016).