

**POLİ (2-HİDROKSİETİL-METAKRİLAT) TEMELLİ
JELATİN VE AMİNO ASİT İÇEREN
SÜPERMAKROGÖZENEKLİ KRİYOJEL DOKU
İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF POLY (2-HYDROXYETHYL-
METHACRYLATE) BASED GELATIN AND AMINO ACID
CONTAINING SUPERMACROPOROUS CRYOGEL
TISSUE SCAFFOLDS**

GÜLŞEN BAYRAK

DOÇ. DR. IŞIK PERÇİN DEMİRÇELİK

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2019

GÜLŞEN BAYRAK'ın hazırladığı "Poli (2-Hidroksietil-Metakrilat) Temelli Jelatin ve Amino Asit İçeren Süpermakrogözenekli Kriyojel Doku İskelelerinin Geliştirilmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel SÜMER

Başkan



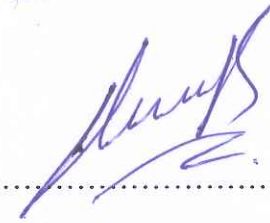
Doç. Dr. Işık PERÇİN DEMİRÇELİK

Danışman



Prof. Dr. Hatice MERGEN

Üye



Doç. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU

Üye



Doç. Dr. Fatma YILMAZ

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak / /..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Canım Ailem'e...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

21 / 06 / 2019

GÜLŞEN BAYRAK



YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

21... / 06 2019..

 (İmza)

GÜLŞEN BAYRAK

ÖZET

POLİ (2-HİDROKSİETİL-METAKRİLAT) TEMELLİ JELATİN VE AMİNO ASİT İÇEREN SÜPERMAKROGÖZENEKLİ KRİYOJEL DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Gülşen BAYRAK

Yüksek lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Işık PERÇİN DEMİRÇELİK

Haziran 2019, 99 sayfa

Kriyojeller, birbirleriyle bağlantılı geniş gözenekleri, hidrofilik yapıları, sentezlenirken çözücü ve gözenek yapıcı olarak toksik madde gerektirmemeleri ve mekanik olarak dayanıklı olmalarının yanında esnek yapıya sahip olmaları sayesinde doku mühendisliği çalışmalarında doku iskelesi olarak kullanım avantajı sunmaktadırlar.

Bu tez çalışmasında temel monomer olarak 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA), komonomer olarak N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) ve çapraz bağlayıcı olarak poli(etilen glikol) diakrilat (PEGDA) kullanılarak jelatin içeren süpermakrogözenekli kriyojeller hazırlanmıştır. Çalışmanın amacı PHEMA gibi geniş makrogözenekler bulunduran kriyojeli jelatin gibi doğal bir malzeme ve histidin amino

asidi türevli MAH komonomeri ile birleştirip hücrelerin üzerinde tutunabileceği, canlı kalabileceği ve çoğalabileceği bir doku iskelesi yapmaktır. MAH komonomerinin ve jelatinin birlikte etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için kriyojeller farklı oranlarda jelatin ve MAH içerecek şekilde hazırlanmıştır. Buna göre dört farklı özellikte; poli(2-hidroksietil metakrilat) [PHEMA], poli(2-hidroksietil metakrilat)-jelatin [PHEMA/GEL], poli(2-hidroksietil metakrilat N-metakriloil-(L)-histidin metil ester) [PHEMAH] ve poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(L)-histidin metil ester)-jelatin [PHEMAH/GEL] ve değişen jelatin oranına bağlı olarak toplam sekiz kriyojel grubu oluşturulmuştur. Çalışma kapsamında hazırlanan kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanılabilirlikleri değerlendirilmiştir. Jelatinin yapısında bulunan RGD (Arjinin-Glisin-Aspartik asit) dizisinin ve doku iskelesi yapımı çalışmalarında ilk kez kullanılan histidin amino asidi türevli MAH komonomerinin hücre çoğalması, hücre tutunması ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri *in vitro* hücre kültür deneyleri ile araştırılmıştır.

Kriyojellerin sentezi -18°C'de serbest radikal polimerizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Jelatin ve MAH polimerizasyon esnasında yapıya katılarak PHEMA kriyojele fonksiyon kazandırmıştır. Hazırlanan kriyojellerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında; şişme özellikleri makro gözeneklilik derecesi, jelleşme verimi, şişme derecesi ve şişme oranı hesaplanarak değerlendirilmiştir. PHEMA temelli kriyojellerde jelatin oranına bağlı olarak makrogözeneklilik derecesi, şişme derecesi ve şişme oranlarında düşüş gözlenmiştir. Jelatin ve MAH'ın çalışma kapsamında sentezlenen kriyojellerin yapısına katılıp katılmadığı FTIR (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi) ile incelenmiştir ve sonuç olarak yapıya başarılı bir şekilde katıldıkları görülmüştür. Mikro bilgisayarlı tomografi (mikro-ct) ile çalışma kapsamındaki kriyojellerin üç boyutlu karakterizasyon analizleri gerçekleştirilmiş, MAH ve jelatin içeren PHEMAH/GEL için gözenekliliğin %80,13 olduğu bulunmuştur. Farklı kriyojeller için hücrelerin canlılık özellikleri ve tutunma davranışları taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir, elde edilen görüntüler sonucunda PHEMAH/GEL kriyojellerin hücre tutunması ve dağılımı açısından daha başarılı olduğu bulunmuştur. Hücre canlılık ve biyouyumluluk deneyleri hazırlanan tüm kriyojeller için 24 ve 48. saatlerde L929 fare fibroblast

hücreleri kullanılarak 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile gerçekleştirilmiştir. Jelatin ve MAH komonomeri ile fonksiyon kazandırılan PHEMA/GEL ve PHEMAH/GEL kriyojeller için hücre canlılığının PHEMA kriyojelden daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Hazırlanan kriyojeller arasında PHEMAH/GEL kriyojellerin daha yüksek hücre canlılığı vermesiyle birlikte histidin amino asidi türevli MAH'ın hücrelerin canlılığı üzerinde arttırıcı etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak MAH ve jelatin ile hazırlanan PHEMAH/GEL kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanılabilir oldukları sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: PHEMA, MAH, jelatin, histidin, kriyojel, doku iskelesi, MTT, fibroblast

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF POLY (2-HYDROXYETHYL-METHACRYLATE) BASED GELATIN AND AMINO ACID CONTAINING SUPERMACROPOROUS CRYOGEL TISSUE SCAFFOLDS

Gülşen BAYRAK

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Associated Prof. Dr. Işık PERÇİN DEMİRÇELİK

June 2019, 99 pages

Cryogels offer the advantage of being used as tissue scaffold in tissue engineering studies due to their large interconnected pores, hydrophilic nature, they do not require toxic substances as solvents and pores forming agents when they synthesis, they are flexible and mechanically durable.

In this study, gelatin containing cryogels were prepared using 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) as a basic monomer, N-methacryloyl- (L) - histidine methyl ester (MAH) as a comonomer and poly (ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) as the crosslinker. The aim of the study is to combine supermacroporous PHEMA cryogels with a natural material such as gelatin and histidine amino acid derived comonomer MAH, to make a tissue scaffold for cells can attach, survive and proliferate. In order to better understand the effects of MAH comonomer and gelatin

together, cryogels were prepared to contain different amounts of gelatin and MAH. Accordingly, four different features; poly (2-hydroxyethyl methacrylate) [PHEMA], poly (2-hydroxyethyl methacrylate)-gelatin [PHEMA/GEL], poly (2-hydroxyethyl methacrylate N-methacryloyl- (L) -histidine methyl ester) [PHEMAH] and poly (hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-(L)-histidine methyl ester)-gelatin [PHEMAH/GEL] and a total of eight cryogel groups were formed depending on the varying gelatin ratio. The usability of prepared cryogels prepared as a scaffold was evaluated. The effects of RGD (Arginine-Glycine-Aspartic acid) sequence in the gelatin structure and effect of histidine amino acid derived MAH comonomer (which is used for the first time in tissue scaffold fabrication studies) to cell proliferation, cell adhesion and cell viability were investigated by *in vitro* cell culture experiments.

Synthesis of cryogels was carried out by free radical polymerization at -18 ° C. Gelatin and MAH were added to the structure during polymerization to give PHEMA cryogel function. Within the scope of characterization studies of prepared cryogels; swelling properties were evaluated by calculating the degree of macroporosity, gel fraction yield, swelling degree and swelling ratio. In PHEMA-based cryogels, the degree of macroporosity, swelling degree and swelling ratio were decreased due to the gelatin ratio. Whether gelatin and MAH were incorporated into the structure of the cryogels was examined by FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) and as a result, they were successfully incorporated into the structure of cryogels. Three-dimensional characterization analyzes of MAH and gelatin containin cryogels performed by microcomputed tomography (micro-ct) and the porosity was found 80,13% for PHEMAH/GEL. Cell viability and adherence behavior of the cells for different cryogels were examined by scanning electron microscopy (SEM), the results showed that PHEMAH/GEL cryogels showed better cell attachment and cell distribution. Cell viability and cell biocompatibility experiments were performed by using 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay using L929 mouse fibroblast cells at 24 and 48 hours for all cryogels prepared. It was found that cell viability was higher for PHEMA/GEL ve PHEMAH/GEL cryogels functionalised with gelatin and MAH comonomer than PHEMA cryogels. Among the cryogels prepared, it was concluded that the histidine amino acid derived MAH had an enhancing effect

on the cell viability as PHEMAH / GEL cryogels gave higher cell viability. As a result, it was concluded that PHEMAH / GEL cryogels prepared with MAH and gelatin can be used as tissue scaffold.

Keywords: PHEMA, MAH, gelatin, histidine, cryogel, tissue scaffold, MTT, fibroblast

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimimin ilk gününden beri bana danışmandan hep daha fazlası olan, çalışmalarım boyunca beni bilgisi ve gösterdiği güven sayesinde daha fazla çalışmam için yüreklendiren bana ışık olan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum ve örnek aldığım çok kıymetli hocam Doç. Dr. Işık Perçin Demirçelik'e

Deneyselerim boyunca bilimsel bilgi ve imkanlarından yararlandığım beni hep destekleyen çok değerli hocam Doç. Dr. Aysun Kılıç Süloğlu'na,

Çalışmalarım boyunca üzerimde desteğini hiç eksik etmeyen çok değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Neslihan İdil'e,

Bana her zaman kapılarının ve laboratuvarlarının açık olduğunu bildiğim Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki çok değerli hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Deneysel çalışmalarımda bana yardımını esirgemeyen çok değerli arkadaşım Çağla Şafak'a ve Selen Sanin'e

Yüksek lisans hayatımda kazandığım, beni hep destekleyen, hep yanımda olan çok değerli arkadaşım Dilara Şahin'e ve çok değerli hocam Arş. Gör. Merve Özcan'a

Tez süreci boyunca ihtiyacım olduğunda hep yanımda olan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dilara Karagüzel ve Arş. Gör. Başak Ezgi Saraç'a,

Lisans hayatım ve yüksek lisans hayatım boyunca beni hep destekleyen, yüksek lisansa başlamam için beni değerli danışman hocam Doç. Dr. Işık Perçin Demirçelik ile tanıştıran çok değerli hocam Dr. Tuğçe Karaduman'a

Ankara'ya geldiğim ilk günden beri, ailemin yokluğunda beni pozitif enerjileri ile kucaklayan, her zaman desteklerini arkamda hissettiğim Boğaç ve Nilüfer Sandallı ailesine,

Tüm öğrenim hayatım boyunca hep arkamda duran ve yanımda olan, tüm zorlukların üstesinden gelmemi sağlayan, daha ileri gidebilmem için beni cesaretlendiren canım aileme teşekkürlerimi sunarım...

Gülşen BAYRAK

Haziran 2019, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kriyojeller	4
2.1.1. Jel Tanımı ve Kriyojeller	4
2.1.2. Kriyojellerin Sentezlenmesi	5
2.1.3. Kriyojellerin Kullanım Alanları	8
2.2. Doku Mühendisliği	9
2.2.1. Hücreler Arası Matriks (ECM)	10
2.2.2. Doku İskeleleri	11
2.2.2.1. İdeal Doku İskelesi	11
2.2.2.2. Doku Mühendisliği Uygulamalarında Kullanılan Doku İskeleleri....	12
2.2.2.3. Doku iskelesi olarak kriyojellerin kullanılması.....	14
2.3. Jelatin	19
2.4. PHEMA	20
2.5. PEGDA	21
2.6. Histidin amino asiti ve MAH komonomeri	22
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	24
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	24

3.2. PHEMA temelli jelatin ve amino asit içeren süpermakrogözenekli kriyojellerin hazırlanması	26
3.2.1 MAH Komonomerinin Sentezlenmesi.....	26
3.2.2. PHEMA Kriyojel sentezi	26
3.3 PHEMA temelli jelatin ve amino asit içeren süpermakrogözenekli kriyojellerin karakterizasyonu.....	28
3.3.1. Şişme Deneylei	28
3.3.2. Fourier transform infrared (FTIR) Spektrometresi ile yapı analizi	29
3.4. Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-CT).....	30
3.5. <i>In vitro</i> hücre kültürü deneylei	30
3.5.1. Sterilizasyon.....	30
3.5.2. Hücrelerin çoğaltılması.....	31
3.5.3 Hücrelerin kriyojel doku iskelelerine ekimi	31
3.5.4. MTT Hücre Canlılık Testi	32
3.5.5. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) Analizi	33
3.6. İstatistiksel Analiz.....	33
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	35
4.1 PHEMA temelli jelatin ve amino asit içeren süpermakrogözenekli kriyojellerin karakterizasyonu	35
4.1.1 PHEMA temelli kriyojellerin şişme özellikleri	36
4.1.2. FTIR Analizi	41
4.1.3. Mikro-CT analizi sonuçları.....	46
4.2. MTT analizi sonuçları.....	47
4.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri	52
5. YORUM.....	57
6. KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Kriyojel sentezlenmesi	8
Şekil 2.2.	Küre, tabaka, monolitik kolon ve disk gibi farklı şekillerde sentezlenebilen kriyojeller	8
Şekil 2.3.	Doku mühendisliği yaklaşımı.....	10
Şekil 2.4.	İdeal doku iskelesinde bulunması gereken özellikler	12
Şekil 2.5.	Jelatin; Soğuk su balığı, sığır ve domuz derisinden elde edilen kolajenin denaturasyonu veya hidrolizi sonucu elde edilebilir.	19
Şekil 2.6.	HEMA'nın kimyasal yapısı.....	21
Şekil 2.7.	PEGDA'nın kimyasal yapısı.	22
Şekil 2.8.	MAH komonomerinin kimyasal yapısı yapısı	23
Şekil 3.1.	Deney özeti. PHEMA temelli kriyojellerin polimerizasyonu, karakterizasyonu, L929 hücrelerinin kriyojellere ekimi, doku iskelesi olarak kullanılabilirliğinin kontrolü.....	25
Şekil 3.2.	MAH komonomerinin sentezi	26
Şekil 4.1.	Sentezlenen PHEMA temelli kriyojellerin optik fotoğrafları. PHEMA temelli kriyojeller serbest radikal polimerizasyonu ile -18°C'de sentezlenmiştir.....	36
Şekil 4.2.	Sentezlenen PHEMA temelli kriyojellerin makrogözeneklilik dereceleri.....	37
Şekil 4.3.	PHEMA temelli kriyojellerin jelleşme verimi.	38
Şekil 4.4.	Sentezlenen PHEMA temelli kriyojellerin şişme oranı	39
Şekil 4.5.	Sentezlenen PHEMA temelli kriyojellerin şişme derecesi	40
Şekil 4.6.	Çalışma kapsamında sentezlenen PHEMA temelli kriyojellerin optik fotoğrafları. (a) Kriyojellerin şişmiş ve kuru görüntüleri (b) MAH içermeyen PHEMA temelli kriyojellerin ıslak görüntüleri ve (c) MAH içeren PHEMA	

temelli kriyojellerin ıslak görüntüleri (d) Ayanı boyutlarda hazırlanan PHEMA kriyojellerin şişmiş ve sıkılmış görüntüleri.	41
Şekil 4.7. PHEMA kriyojelin FTIR spektrumu	42
Şekil 4.8. PHEMA kriyojelin yapısı	42
Şekil 4.9. PHEMA/GEL kriyojelin FTIR spektrumu	43
Şekil 4.10. Jelatinin kimyasal yapısı.....	43
Şekil 4.11. PHEMAH kriyojelin FTIR spektrumu	44
Şekil 4.12. PHEMAH kriyojelin olası kimyasal yapısı.	45
Şekil 4.13. PHEMAH/GEL kriyojelin FTIR spektrumu	46
Şekil 4.14. PHEMAH/0.2GEL kriyojelin mikro-CT görüntüleri.	47
Şekil 4.15. MAH komonoeri ve jelatin içeren PHEMA/02GEL kriyojelin gözenek boyutunun yüzde olarak dağılımı grafiği.....	47
Şekil 4.16. Çalışmada kullanılan L929 fibroblast hücrelerinin 10X ve 20X büyütme ışık mikroskobu görüntüleri.....	49
Şekil 4.17. 24 saat ve 48 saat MTT analizi sonuçları. PHEMA kriyojel kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, istatistiksel olarak anlamlı farklılık $n=6$ ve $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. Harfler 24 saat için anlamlı farklılığı ifade etmektedir: a, PHEMA ve PHEMA/02GEL; b, PHEMA ve PHEMAH/0.2GEL; c, PHEMA ve PHEMAH/04.GEL	52
Şekil 4.18. PHEMA kriyojellerin hüresiz (a) ve hücreli 48 saat için (b,c) SEM fotoğrafları: a ve b) 1,000 X, bar 10 μ m; c) 12,64 X, bar 2 μ m.	54
Şekil 4.19. PHEMA/0.2GEL kriyojellerin hüresiz (a) ve hücreli 48 saat için (b,c) SEM fotoğrafları: a 1,000 X, bar 10 μ ; b) 1,000 X, bar 10 μ m 10 c) 3,040 X, bar 2 μ m.....	54
Şekil 4.20. PHEMAH kriyojellerin hüresiz (a) ve hücreli 48 saat için (b,c) SEM fotoğrafları: a 1,000 X, bar 10 μ ; b) 1,000 X, bar 20 μ m 10 c) 10,14 X, bar 2 μ m.....	55

Şekil 4.21. PHEMAH kriyojellerin hücre-siz (a) ve hücreli 48 saat için (b,c) SEM fotoğrafları: a 1,000 X, bar 10µ; b) 1,000 X, bar 20µm 10 c) 5,000 X, bar 1µm.....56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Doku iskelesi yapma yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları ...	13
Çizelge 2.2.	Doğal polimer temelli kriyojellerin kullanım alanları	16
Çizelge 2.3.	Sentetik polimer temelli kriyojellerin kullanım alanları.....	17
Çizelge 2.4.	Doğal polimerlerin avantajları ve dezavantajları.....	18
Çizelge 2.5.	Sentetik polimerlerin avantajları ve dezavantajları	18
Çizelge 3.1.	Kriyojel grupları ve grupların yapımında kullanılan kimyasalların oranları	28

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

m_t	Polimer şurubundaki monomerlerin toplam kütlesi
$m_{\text{ıslak jel}}$	Islak haldeki kriyojelin ağırlığı
$m_{\text{şişmiş jel}}$	Denge şişme oranına ulaşmış kriyojelin ağırlığı
$m_{\text{sıkılmış jel}}$	Sıkılmış kriyojelin ağırlığı
S	Şişme derecesi
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
g	Gram
mg	Miligram
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
μ	Mikro
μm	Mikrometre
mm	Milimetre
%	Yüzde
v/v	Hacim/Hacim Oranı
w/v	Ağırlık/Hacim Oranı
w/w	Ağırlık/Ağırlık Oranı

Kısaltmalar

APS	Amonyum Persülfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
ECM	Hücreler Arası Matriks
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FTIR	Fourier dönüşümlü transform kızılötesi
HEMA	2 -Hidroksietil metakrilat
GEL	Jelatin
KVP	Kilovolt Pik
mA	Miliamper
MAH	N-metakriloil-(L)-histidin metil ester
Micro-CT	Mikro bilgisayarlı tomografi
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-Difeniltetrazolyum Bromür
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PEGDA	Poli Etilen Glikol Diakrilat
PHEMA	Poli (2-hidroksietil-metakrilat)
PHEMA/GEL	Poli (2-hidroksietil-metakrilat)-Jelatin
PHEMAH	Poli (2-hidroksietil-metakrilat-N-metakriloil-(L)-histidin metil ester)
PHEMAH/GEL ester)-	Poli (2-hidroksietil-metakrilat-N-metakriloil-(L)-histidin metil Jelatin
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilen Diamin

1. GİRİŞ

Geçmiş 50 yıl öncesine uzanan kriyojeller [1], sıfırın altındaki sıcaklıklarda sentezlenen [2], hidrofilik yapıda ve birbirleriyle bağlantılı geniş gözenekler bulunduran polimerlerdir [3]. Kriyojellerin sentezi genel olarak üç aşamada gerçekleşir. İlk aşamada uygun monomerler, polimer öncülleri, çapraz bağlayıcılar ve başlatıcıları içeren çözelti oluşturulur. İkinci aşamada hazırlanan monomer çözeltisi sıfırın altındaki sıcaklıklarda polimerleşmeye bırakılır. Bu aşamada çözelti içerisindeki çözücünün hızla donmasının etkisiyle, donmamış halde kalan monomerlerin ortamdaki derişimi artar ve bu donmamış sıvı kısım jel oluşturur. Üçüncü aşamada ise polimer içinde donmuş halde olan çözücü kristalleri oda sıcaklığında erir [2]. Buz kristalleri yerini geniş ve birbirleriyle bağlantılı gözeneklere bırakır [4].

Kriyojeller eşsiz yapıda geniş ve bağlantılı gözenekleri sayesinde çok farklı alanlarda kullanılırlar. Kriyojeller kromatografide; proteinlerin, plazmitlerin, enzimlerin ve nükleik asitlerin saflaştırılmasında ve ayırımında kullanılmaktadırlar. Oksijen ve besin maddelerinin geçişine izin verebilecek boyutta geniş ve bağlantılı gözenekler bulundurmaları sayesinde doku mühendisliği uygulamalarında da avantajlı polimerik malzemelerdir [5].

Doku mühendisliğinin amacı zarar görmüş dokuların doku iskelesi yardımıyla onarılmasıdır. Üç boyutlu doku iskeleleri hücreler arası matriksi (ECM) taklit etmeyi amaçlar. Bu amaç için doku iskeleleri sentetik ve doğal malzemeler kullanılarak hazırlanabilir [6]. Doku iskelesinin seçimi hücrelerin canlı kalabilmesi, çoğalabilmesi ve farklılaşabilmesi bakımından çok kritiktir [7]. Seçilen doku iskelesinin biyoyumlu olması, hücrelerin tutunmalarını sağlayabilecek yüzey özelliklerine sahip olması [6], geniş gözenekli olup hücrelerin yayılmasını kolaylaştırması [5] ve mekanik olarak sağlam olması beklenir [5].

Kriyopolimerizasyon ile kriyojel yapımı dışında doku mühendisliğinde doku iskelesi olarak faz ayırım, çözücü dökme/parçacık süzme, gaz köpürtme ve elektroegirme/

elektrodöndürme, gibi polimer yapma yöntemleri mevcuttur [2]. Doku iskelesi yapımı için çok fazla yöntem olmasına karşın kriyojellerin bağlantılı, kontrol edilebilir gözenek boyutu ve mekanik dayanıklılığı gibi özellikleri bir arada bulundurması doku iskelesi olarak kullanılmasını avantajlı kılar [5].

Kriyojeller sentetik ve doğal polimerlerin ayrı ayrı veya bir arada kullanılmasıyla sentezlenebilirler [8]. Kriyojel yapımında kullanılan doğal polimerler arasında kolajen, jelatin, kitosan, hiyaluronik asit [9], nişasta ve ipek fibroini örnek olarak verilebilir [10]. Jelatin kolajenin hidrolizi ile elde edilen bir proteindir [10]. Kolajen yerine jelatinin kullanılması immün yanıt oluşturmama [11] ve ekonomik olmasıyla avantajlıdır [12]. Ayrıca jelatin, kolajende yer alan biyoaktif sekans olarak bilinen arjinin-glisin-aspartik asitten oluşan RGD peptit dizisini de bulundurur. Bu peptit dizisinin hücre tutunması üzerinde arttırıcı etkisi olduğu bilinmektedir [11]. Bunun dışında jelatinin yapısında glisin, prolin ve hidroksiprolin amino asitleri fazla miktarda bulunmaktadır [13]. Jelatin biyoyumlu, suda çözünebilen, bozunabilir ve en önemlisi bozunduğu zaman toksik bileşikler oluşturmayan bir madde olmasına karşın mekanik olarak sağlam değildir [8].

Sentetik polimerlere poli glikolitik asit (PGA), poli kaprolakton (PCL), poli L-laktik asit (PLA) [14], poli vinil alkol (PVA), poli-N-isopropilakrilamit (PNIPAM) [10] ve Poli (2-hidroksietil-metakrilat) (PHEMA) örnek olarak verilebilir [12]. PHEMA mekanik olarak sağlam ve esnek yapıda, biyoyumlu, toksik olmayan, kimyasal olarak stabil yapıda, yüksek düzeyde su tutma özelliği gösteren sentetik bir polimerdir. [12] PHEMA kriyojeller kontak lens yapımında, ilaç salım sistemlerinde [15], implantlarda [16] ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır [17].

Sunulan tez çalışmasında eşsiz karakteristik özelliklerine karşın tek başına hücre tutunması için uygun yüzey özellikleri taşımayan PHEMA kriyojeller, jelatin ve fonksiyonel MAH komonomeri ile fonksiyon kazandırılarak PHEMAH/GEL kriyojeller sentezlenmiştir. Jelatinin yapısında yer alan RGD amino asitlerinin ve histidin amino asidinden türevli üretilmiş MAH komonomerinin hücre tutunmasına olan katkısı incelenmiş ve literatürde ilk kez MAH komonomerinin hücre kültür çalışmalarında doku iskelesi olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Çalışmada en uygun doku iskelesinin bulunabilmesi amacıyla dört farklı kriyojel (PHEMA, PHEMA/GEL, PHEMAH ve PHEMAH/GEL) farklı oranlarda jelatin içerecek şekilde hazırlanmıştır. PHEMA temelli kriyojellerin MAH ve jelatin ile fonksiyonlandırılması polimerizasyon sırasında gerçekleştirilmiştir. Bu kriyojellerin karakterizasyon alışmaları; Şişme testleri, SEM, Mikro-CT ve FTIR ile yapılmıştır. Daha sonra bu kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanılabilirlikleri hücre ekimi sonrasında 24 ve 48. saatler için yapılan MTT analizi ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan kriyojellerin biyoyumluluğu bu analiz ile ortaya konmuştur. Ekilen hücrelerin kriyojeller ile olan bağlanma, tutunma, yayılma gibi etkileşimi SEM görüntüleri ile gösterilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kriyojeller

Bir jel çeşidi olan kriyojel kelimesinin kökeni Yunancaya dayanmaktadır. Yunanca'da kırı'os (kryos) buz ya da donma anlamına gelir [18]. Kriyojeller, serbest radikal polimerizasyonu ile sıfırın altındaki sıcaklıklarda monomer veya polimer öncülleri kullanılarak sentezlenen, hidrofilik ve süpermakrogözeneklere sahip, genellikle elastik ve sünger benzeri yapıda jellerdir [19-21]. Bu jeller fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağlanmış homojen veya heterojen polimer ağlarının oluşturulmasıyla elde edilebilirler [22]. Ayrıca kriyojellerin yapımında farklı öncüller kullanılarak ve farklı kimyasal reaksiyon uygulanarak kullanılacağı alan doğrultusunda çok farklı şekil ve özelliklerde sentezlenebilirler [20].

2.1.1. Jel Tanımı ve Kriyojeller

Şişmiş üç boyutlu polimerik malzemeler olan jeller, makromoleküler zincirlerin birbirlerine fiziksel veya kimyasal yollar ile bağlanmasıyla oluşan polimer ve polimer içerisinde immobilize çözücünden oluşan sistemlerdir [23]. Çözünen maddenin polimer içerisine immobilize olabilmesi kaliteli jel oluşumu açısından çok önemli bir aşamadır. Bu durum başarıyla sağlandığında sistemin bütünlüğünün bozulmasına sebebiyet verecek kadar sıkı olmayan esnek bir polimer ağ oluşabilir [24]. Jeller yapılış ve içerik gibi özelliklerine göre farklı şekillerde sınıflandırılabilirler. Genel olarak immobilize edilen çözücünün türüne göre ve çapraz bağlayıcı türüne göre bir sınıflandırma yapacak olursak;

- i) İmmobilize edilen çözücünün türüne göre jeller

İmmobilize edilen çözücü su ise bu jellere hidrojeller denir. Kriyojeller de hidrojeller sınıfına dahil sistemlerdir. İmmobilize edilen çözücü organik bir sıvı ise bu jellere organojeller denmektedir.

- ii) Çapraz bağlayıcı türüne göre jeller

Jellerin içeriğinde bulunan öncüllerin çapraz bağlanması kimyasal madde kullanılarak gerçekleştiriliyorsa bu jellere kimyasal çapraz bağlı jeller denir. Jellerin çapraz bağlanması kimyasal madde kullanılmadan fiziksel yollar ile gerçekleştiriliyorsa bu jellere fiziksel çapraz bağlı jeller denir. Çapraz bağlama işlemi iyonik yükler sayesinde yapılıyorsa bu jellere iyonik çapraz bağlı jeller denir [23].

Bir jel çeşidi olan kriyojeller diğer bilinen jellerin aksine soğuk ortamda polimerleşen malzemelerdir [24]. Kriyojellerin ve diğer jellerin yapımında kullanılan çoğu malzemeler ortaktır ancak kriyojeller sıfırın altındaki sıcaklıklarda polimerleşirken diğer jeller genellikle oda sıcaklığında polimerleştirilerek sentezlenen malzemelerdir. Kriyojeller genel olarak bilinen diğer jellerin aksine çözücünün hem polimerin yapısında hem de makrogözeneklerin içerisinde bulunduğu heterofaz sistemlerdir. Kriyojeller makrogözeneklerin yanı sıra mikrogözeneklere sahip jellerdir. Diğer bilinen jeller homofaz sistemlerdir ve çoğunlukla mikrogözeneklere sahiptirler [20, 26].

Sentezlenmesinde çözücü olarak su kullanılan kriyojeller yukarıda da bahsedildiği gibi aynı zamanda hidrojeller sınıfına dahil jellerdir. Aynı sınıftan olmalarına rağmen hidrojellerin kriyojellere göre elastikiyeti daha azdır. Ayrıca hidrojellerde, kriyojellerde bulunan birbirleriyle bağlantılı gözeneklere daha az sayıda rastlanır [25]. Hidrojellerin kriyojellere oranla gözenek boyutunun daha küçük olması sebebiyle hidrojellerin şişme oranı daha düşüktür [26]. Hidrojeller kriyojellere oranla mekanik olarak daha az dayanıklı jellerdir, bu durum birçok çalışmada hidrojellerin yerine kriyojellerin tercih edilmesine sebep olmaktadır [27].

2.1.2. Kriyojellerin Sentezlenmesi

Kriyojellerin sentezlenmesini genel olarak 3 ana basamakta verebiliriz. Bu basamaklar sırasıyla;

- 1) Polimer çözeltisinin hazırlanması
- 2) Sistemin dondurulması ve sistemin inkübasyonu
- 3) Sistemin erimesi

Kriyojellerin sentezlenme basamakları aşağıda sırasıyla açıklanmış ve Şekil 2.1'de verilen görselde özetlenmiştir.

1) Polimer çözeltisinin hazırlanması

Sentezlenmek istenen kriyojel tipine göre hazırlama yönteminde küçük değişiklikler olmasına karşın genel olarak ilk aşamada uygun polimer öncülleri/monomerler uygun

çözücü içerisinde çözülerek, içerisinde çapraz bağlayıcıların ve polimerizasyon başlatıcılarının eklendiği polimer çözeltisi hazırlanır [14]. Bu aşama oda sıcaklığında gerçekleştirilen bir aşamadır ve en kritik noktası dondurma aşamasına geçmeden önce hazırlanan sistemin oda sıcaklığında polimerleşmeye başlama olasılığıdır. Bu istenmeyen bir durumdur, kriyojeller soğuk ortamlarda polimerleştirilerek sentezlenen jeller oldukları için eğer polimerizasyon oda sıcaklığı koşullarında gerçekleşirse kriyojelin kendine özgü birbirleriyle bağlantılı makrogözenekli yapısı oluşamaz. Bu istenmeyen durumun oluşmasını önlemek amacıyla çapraz bağlayıcı ve reaksiyon başlatıcılarını eklemeyen önce polimer çözeltisini soğutmak gerekir [23].

2) Sistemin dondurulması ve sistemin inkübasyonu

İkinci aşamada hazırlanan polimer çözeltisi uygun koşullar ve uygun sıcaklıkta dondurulup, polimerizasyonu başlatılır ve 17-24 saat boyunca inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrasında birbiriyle bağlantılı makrogözeneklerin yanı sıra mikro gözeneklerin de oluştuğu kriyojel yapısını tamamlanmış olur [23]. Dondurma sıcaklığı sentezlenecek olan kriyojel çeşidine göre değişmekle birlikte yaklaşık olarak -10°C ile -20°C arasındadır [20]. Bu aşamayı dondurma sıcaklığı, polimer çözeltisinin önceden soğutulup soğutulmadığı, polimer çözeltisinin içine döküldüğü (içinde dondurulacağı) malzemenin fiziksel özellikleri gibi parametreler doğrudan etkiler [23].

Dondurma sıcaklığı bu aşamayı etkileyen parametreler arasında en önemli olanıdır ve sentezlenecek olan kriyojelin özelliklerini etkiler. Kriyojeller dondurulurken hızlı soğutma yapmak buz kristallerinin genişlemesine engel olur, bu durum boyut olarak küçük ve sayıca çok fazla kristalin oluşmasına yol açar. Sonuç olarak düzensiz ve çoğunlukla mikrogözenekli, katı, esnek olmayan yapıda ve mekanik olarak sağlamlığı az olan kriyojeller oluşur. Hızlı soğutma yapılmadığı zaman, buz kristallerinin genişlemesi için yeterli süre olur ve bu sayede sayıca daha az ve daha geniş kristallerin oluşumu mümkün olur. Sonuç olarak büyük gözenekler içeren düzenli yapıya sahip, mekanik olarak sağlam ve esnek kriyojeller elde edilir. Kriyojeller sentezlenirken dondurma sıcaklığı değiştirilerek kullanım alanına ve amacına göre istenen boyutta ve miktarda gözeneklere sahip kriyojeller üretilebilir, gözenek durumu ayarlanabilir [25,30].

Dondurma işlemi sonrasında sistem 17-24 saat inkübasyona bırakılır. Kriyojellerin polimerleşmesi yarı donmuş bir ortamda gerçekleşir. Kriyojeller sentezlenirken kullanılan çözücü (genellikle su kullanılır) hızla donarak buz kristallerini meydana getirir. Bu buz kristalleri daha sonra birbirleriyle bağlantılı makrogözenekleri oluşturur [20]. Çözücünün donması sebebiyle ortamda çözücünün derişiminde azalma meydana gelir. Çözücünün derişiminin azalması polimer şurubunda bulunan polimer öncüllerinin/monomerlerin jel oluşturmasını tetikler [29]. Bu polimer öncülleri/monomerler buz kristallerinin etrafında polimerleşirler ve bu sayede kriyojelin kendine özgü birbirleriyle bağlantılı makrogözeneklere sahip ağsı yapısı oluşur [14]. Burada buz kristalleri gözenek yapıcı ajan olarak rol oynar [30].

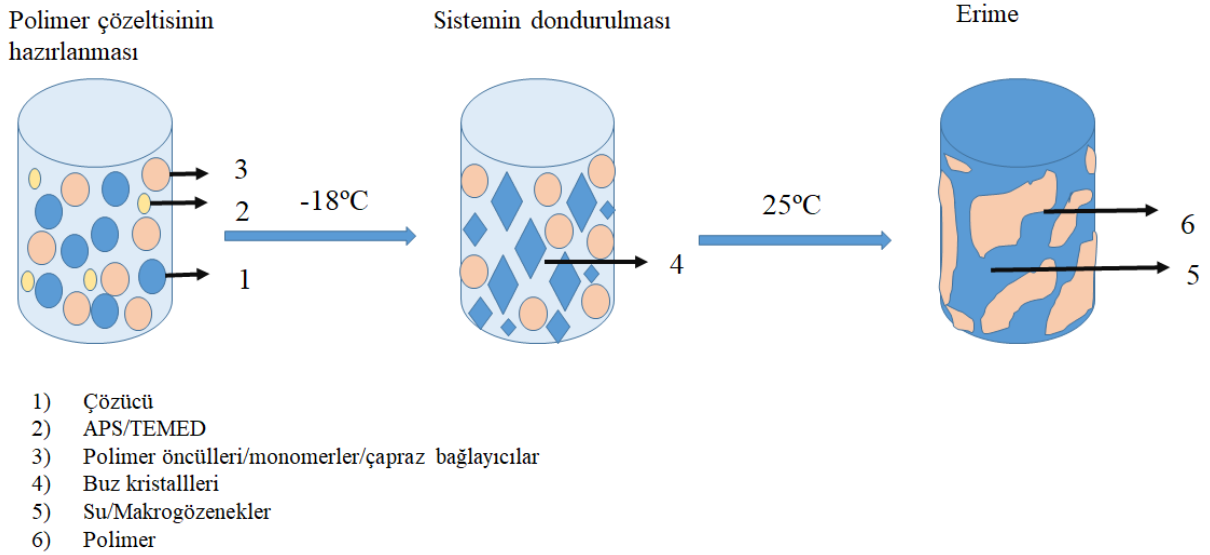
Gözenek yapıcı olarak kullanılan ajanlar özellikle biyomedikal alanda kullanılacak malzemeler açısından kritiktir. Hücre çalışmalarında bu gözenek yapıcı ajanlar kullanılarak yapılan doku iskelelerinin hücreler üzerinde toksik etki gösterme olasılığı yüksektir [31]. Kriyojellerin sentezinde buz kristallerinin yani çözücü olarak kullanılan suyun donmasıyla gözenekler oluşur. Kimyasal bir madde yerine gözenek yapıcı ajan olarak su kullanılması, kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanımını avantajlı kılar [32].

Kriyojeller yukarıda da bahsedildiği gibi yalnızca makrogözeneklerden oluşmazlar aynı zamanda mikro gözenekler de içerirler. Kriyojellerin gözeneklerinin boyutu yaklaşık olarak 10-200 µm arasında değişim gösterir. Kriyojellerin gözenekleri çoğunlukla dairesel şekildedir. Bu durum çözücünün gözenek duvarında yarattığı yüzey geriliminden kaynaklanır [14]. Gözeneklerin şekil, boyut ve dağılımını monomer derişimi, kullanılan çözücü ve polimerizasyon sıcaklığı gibi birçok parametre etkilemektedir [33]. Ayrıca büyük gözenekler hızla şişebilme özelliği gösteren kriyojellerin oluşumunu sağlar. Gözenek duvarlarının kalınlığı, büyüklüğü ve yoğunluğu kriyojellerin mekanik özelliklerini ve dolayısıyla uygulama alanlarını etkiler [28].

3) Sistemin erimesi

Üçüncü aşama olan erime aşaması kriyojel oluşumunun tamamlandığı aşamadır. Bir önceki aşamada oluşmuş olan kriyojelin birbirleriyle bağlantılı makrogözenekleri bu aşamanın sonunda çözücünün oda sıcaklığında erimesiyle ortaya çıkmış olur [23].

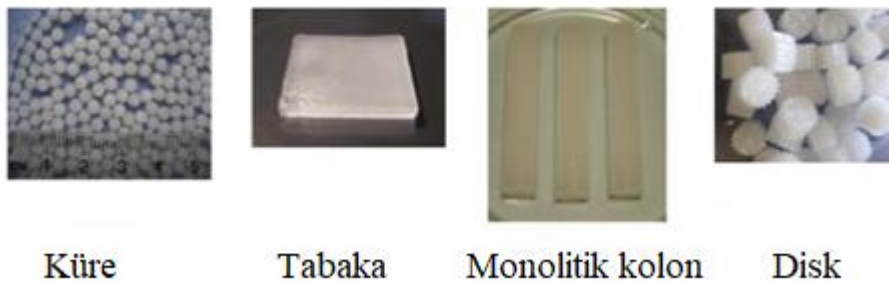
Böylece sünger benzeri, mekanik olarak dayanıklı ve esnek kriyojeller elde edilir [28]. Özetleyecek olursak kriyojellerin fiziksel özellikleri yapımında kullanılan polimer şurubuna, çapraz bağlayıcı mekanizmasına, sıcaklığa, dondurma süresine, dondurma derecesine ve dondurup-çözdürme döngüsüne bağlıdır [28].



Şekil 2.1. Kriyojellerin sentezlenmesi.

2.1.3. Kriyojellerin Kullanım Alanları

Kriyojeller birbirleriyle bağlantılı makrogözenekleri ve mekanik dayanıklılığı sayesinde çok geniş kullanım alanına sahiptirler. Şekil 2.2’de de görüldüğü gibi kriyojeller monolitik kolon (tek bir parça), disk, küre veya kullanım amacına göre istenilen şekillerde sentezlenebilmelerinin yanı sıra sentetik malzemelerden, doğal malzemelerden veya ikisi birlikte kullanılarak sentezlenebilirler [34,29,28,27].



Şekil 2.2. Küre, tabaka, monolitik kolon ve disk gibi farklı şekillerde sentezlenebilen kriyojeller [35].

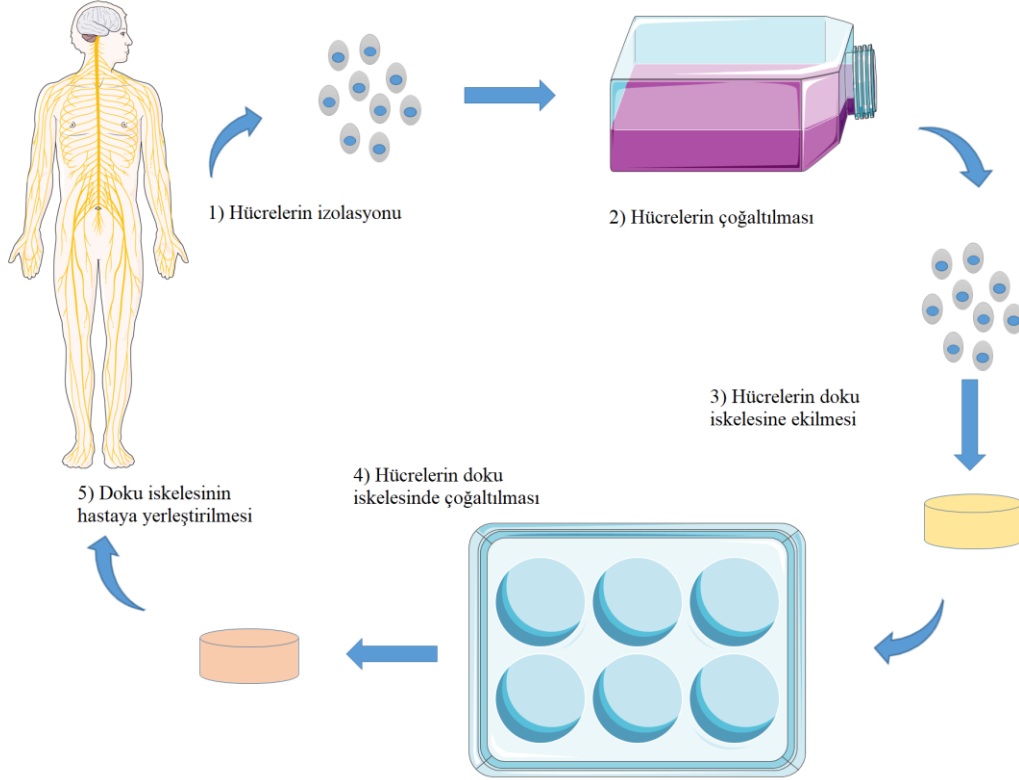
Devamlı sıvı akışını sağlayabilecek genişlikte ve sağlamlıkta gözenekler sayesinde kriyojeller kromatografik malzemeler olarak hücrelerin, virüslerin, plazmitlerin, organellerin, proteinlerin, nükleik asitlerin ayırımında ve biyoreaktör olarak kullanılırlar [14,34,22]. Çevresel uygulamalarda adsorbent olarak [36] ve doku mühendisliği çalışmalarında doku iskelesi olarak kullanılırlar. [25].

2.2. Doku Mühendisliği

Çeşitli sebeplerden dolayı hasar görmüş ve işlevini yitirmiş organların hastanın yaşam kalitesini devam ettirebilmesi için onarılması gerekir [37]. Küçük hasarlar meydana geldiği zaman vücut kendi kendine bu hasarın tamamını onarabilir veya hasarı azaltabilir [38]. Meydana gelen hasar büyük olduğu zaman onarım için nakil gibi müdahaleler gerekebilir. Ancak nakil işlemlerinin; kişiler arasında uygunluğun kolay bulunamayışı, uyum sağlanıp nakil yapılsa bile sonrasında hastada meydana gelebilecek doku reddi veya hayat boyu immün baskılayıcı kullanmak durumunda kalma gibi olumsuz tarafları bulunmaktadır [37]. Nakil işleminden kaynaklı olumsuzlukları ortadan kaldırmak için yüksek potansiyeli olan uygulamalı biyoloji ve mühendislik bilimlerini bir araya getirmiş disiplinler arası bir alan olan doku mühendisliği ortaya çıkmıştır [39,40]. Langer ve Vacanti tarafından tanımlanan bu alan [41], hücre biyolojisini, moleküler biyolojiyi ve biyomalzeme bilimini bir araya getirerek oluşturmuştur [42]. Doku mühendisliği yaklaşımının amacı hasarlı dokunun/organın onarımını sağlamak ve fonksiyonunu yitirmiş dokunun/organın yerine yenisini yapmaktır [43]. Bu yaklaşımda doku iskelesi, hücreler ve sinyal molekülleri bir araya getirilir [44], oluşturulan bu biyomalzeme hastaya implante edilir. Bu sayede nakil için uygun doku/organ aranmasına gerek kalmayacak ve nakil sonrası meydana gelebilecek olumsuzluklar görülmeyecektir [42]. Doku mühendisliği yaklaşımı Şekil 2.3’de verilen görselde özetlenmiştir.

Doku mühendisliği uygulamaları için prensip olarak *in vitro* ortamda hücrelerin üzerinde tutunabileceği, çoğalabileceği, büyüyebileceği ve farklılaşabileceği uygun bir doku iskelesi yapmak gereklidir [37]. Doku iskelesinin üzerindeki hücrelerle birlikte hastaya yerleştirilmesi ve hasarlı bölgenin onarımı hedeflenir [22]. Doku iskeleleri kullanım amacına göre farklı özelliklerde hazırlanabilirler. Doku iskeleleri kullanım amacına göre biyobozunur ve biyobozunur olmayan şekilde sentezlenebilirler, sentetik veya doğal

polimerlerin birlikte veya ayrı kullanımıyla oluşturulabilirler. Tasarlanan doku iskeleleri sadece hücre taşımak için değil aynı zamanda hasarlı bir bölgenin iyileşmesine katkı sağlamak amacıyla ilaç da taşıyabilirler [38].



Şekil 2.3. Doku mühendisliği yaklaşımı.

2.2.1. Hücreler Arası Matris (ECM)

ECM hücre mikroçevresini oluşturan, hücrelerin birbirleriyle bağlantı yapmalarına ve birbirleriyle haberleşmelerine olanak veren çok önemli bir yapıdır [40]. ECM hücrelere yapısal destek sağlamak ve hücre çoğalması, farklılaşması, tutunması ve ölümünde önemli roller oynamaktadır. Doku mühendisliği uygulamalarında da hasarlı dokunun onarımı için ECM'yi taklit edebilmek başarılı sonuçların alınmasını sağlamaktadır [28].

ECM'nin yapısını proteinler, glikoproteinler ve proteoglikanlar oluşturmakta ve yapısında devamlı olarak kolajen, fibronektin, elastin ve büyüme faktörleri sentezlenmektedir [28]. Bu bileşenlerin dağılımı ve miktarı dokudan dokuya değişiklik gösterir [38]. ECM'nin yapısını tüm yönüyle yapmak şimdilik zor olsa da yapısı

aydınlatıldıkça ECM'yi taklit edip ona benzer doku iskeleleri yapma çalışmaları devam etmektedir.

2.2.2. Doku İskeleleri

Hücre kültürü çalışmalarında iki boyutlu yapılan hücre kültürü çalışmaları ile üç boyutlu hücre kültürü çalışmaları arasında büyük fark vardır. İki boyutlu kültürlerde hücrelerin çoğalmasıyla birlikte hücre kültür kabını kaplaması ve dolayısıyla yüzey alanlarının azalmasından kaynaklı besin ve oksijen gibi yaşamsal önemdeki bileşenlerin hücrelere ulaşmasında sıkıntılar yaşanır. Ayrıca iki boyutlu hücre kültürleri hücre-ECM bağlantılarının oluşturulmasında yetersiz kalmaktadır [45]. Doku mühendisliği çalışmaları ECM'yi taklit edebilecek ve hasarlı bölgede yeniden hücre büyümesini ve hasarlı dokunun onarımını sağlayabilecek üç boyutlu bir doku iskelesi yapmayı amaçlamaktadır [46].

2.2.2.1. İdeal Doku İskelesi

Doku mühendisliği çalışmalarında çok farklı yöntemlerle doku iskeleleri tasarlamak mümkün olmasına rağmen bu tasarlanacak doku iskelelerinde aranan özellikler ortaktır. Gözenek boyutu tasarlanacak doku iskelesi için en kritik parametredir [47]. Yetersiz gözenek büyüklüğü ve biçimsiz gözenek şekli doku iskelelerinin kullanımlarını kısıtlar [48]. Gözeneklerin küçük oluşu hücrelerin tutunmasını ve yayılmasını doğrudan etkiler [47]. İdeal bir doku iskelesinde bulunması gereken özellikler Şekil 2.4'de kısaca özetlenmiştir. İdeal bir doku iskelesi hücre tutunma olasılığını arttırabilmek, besin ve gazların geçişini kolaylaştırabilmek için gözenekli yapıda olmalı [49], atık ürünlerin de geçişine izin vermeli, elastik olmalı, mekanik zorlamalara karşı dayanıklı olmalı [22], hidrofilik olmalı [50], kullanım amacına göre kontrollü biyobozunur özellikte olmalı, hasarlı bölgeye yerleştirildiği zaman o bölgeyi tamir edebilir olmalı ve yerleştirildiği bölgede immün yanıt oluşturmamalıdır. Özetleyecek olursak ideal bir doku iskelesi hücrelerin üzerinde tutunabileceği, büyüyüp çoğalabileceği, farklılaşabileceği gözenekli bir yapıya sahip olmalıdır [48].



Şekil 2.4. İdeal doku iskelesinde bulunması gereken özellikler.

2.2.2.2. Doku Mühendisliği Uygulamalarında Kullanılan Doku İskeleleri

Doku mühendisliği uygulamaları için sentezlenen polimerler hem sentetik hem de doğal malzemeler kullanılarak yapılabilirler. Çizelge 2.1’de avantajları ve dezavantajlarıyla verilen bu polimerler çözücü dökme/parçacık süzme, gaz köpürtme, dondurarak kurutma, fiber bağlama, eriterek kalıplama, faz ayırma gibi farklı yöntemlerle sentezlenebilirler [39,42,43].

Çizelge 2.1. Doku iskelesi yapma yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları

	Avantajlar	Dezavantajlar
Çözücü Dökme/ Parçacık Süzme	Sentezlenmesi kolaydır[47].	Yapımında organik çözücü kullanılır [51].
	Gözenek yapıcı olarak yaygın olarak tuz parçacıkları kullanılır [47].	Sentezlenen membranlar oldukça ince oldukları için parçacıkların uzaklaştırılmasında zorluklar yaşanır [42].
	Gözenek yoğunluğu ve boyutu tuz/polimer oranını değiştirerek ayarlanabilir [47].	Geniş ve birbirleriyle bağlantılı gözeneklerin yapımında yetersiz kalır [39].
Gaz Köpürtme	Çok gözeneklidir [47].	Gözenek boyutunun kontrolü zordur [51].
	Mekanik olarak sağlam polimerlerdir [47].	Gözenekler bağlantılı değildir [51].
	Geniş gözenekler elde edilir [51].	Gözenek boyutu hücre tutunması için çok geniştir [51].
	Organik çözücü kullanılmaz [51].	Kullanılan köpürtücü ajanlar gözenek yapımında yetersiz kalır [25].
Dondurup Kurutma	Yoğun ve bağlantılı gözenekleri vardır. Mikro ve makrogözeneklerden oluşur [51].	Yaygın olarak mikro gözeneklidir [52].
	Ekonomik ve çevre dostudur [53].	Yapımı vakit alır [52].
	Gözenek yapıcı olarak buz kristalleri, çözücü olarak su kullanılır [47,51].	Yapımı yüksek enerji gerektirir [52].
Fiber Bağlama	Yapımı kolay bir yöntemdir. Küçük fiberlerin yapımı da mümkündür. Hücreler için geniş yüzey alanı sağlar [47].	Tek başına doku iskelesi olarak kullanımı avantajlı değildir, başka bir polimerle desteklenmelidir [47].
Faz Ayırım	Kolay bir yöntemdir [54].	Fazla malzeme seçeneği yoktur, kullanılabilen malzemelerden biri jelatindir [54].
	Hücre tutunması için elverişlidir [54].	Jelatinle hazırlandığında yeterli mekanik dayanıklılık elde edilemez [54].
Elektroeğirme	Yapımı kolaydır [55].	Üç boyutlu doku iskelesi yapımında iki boyutlu kadar başarılı değildir [54].
	Gözenek boyutu ve yoğunluğu kontrol edilebilir [54].	Gözenek boyutu küçüktür [55].
Eriterek Dökme	Hızlı ve ekonomiktir [51].	Kalıbın yapımı karmaşıktır [51].
	Gözenek boyutu ve şekli ayarlanabilir. Çeşitli boyut ve şekillerde yapılabilirler [51].	Kullanılan gözenek yapıcının uzaklaştırılması zordur [51].
	Yapımında organik çözücü kullanılmaz [51].	Yapımı için yüksek sıcaklıklar gerekir [51].

2.2.2.3. Doku iskelesi olarak kriyojellerin kullanılması

Doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan doku iskelelerinde en büyük sorunlardan biri gözenek boyutunun ayarlanamamasıdır. Geniş gözenekler sadece hücrelerin tutunması için alan yaratmaz aynı zamanda oksijen ve besin maddelerinin geçişi için de çok önemlidir. Oksijen hücre canlılığının devam ettirilebilmesi, hücrelerin büyüüp çoğalabilmesi ve farklılaşabilmesi için çok önemlidir. Oksijenin yetersiz olduğu durumlarda yani hipoksi durumunda serbest radikaller oluşup hücrelere zarar verebilir ve hücrelerin nekroza dolayısıyla ölüme sürüklenmesi kaçınılmaz bir hal alır. Bu durum çalışmaların devam edebilmesini doğrudan kısıtlar. Oksijen geçişini sağlayabilmek için geniş gözenekli doku iskelelerin kullanılması olumlu sonuçlar verir [56]. Daha önce yukarıda da bahsedildiği gibi birçok farklı yöntemle doku iskeleleri yapılmıştır. Doku iskelelerinin yapımında kullanılan çözücülerin hücreler üzerinde toksik etkisinin olması, istenilen boyutta yapılamayan veya kontrol edilemeyen gözenek boyutu ve bu gözeneklerin birbirleriyle olan bağlantılarının az oluşu veya hiç olmayışı dolayısıyla ağ şeklinde bir yapının sağlanamayışı gibi problemler alternatif doku iskelelerinin geliştirilmesini gerektirmiştir [37]. ECM benzeri yapılar olan hidrojelilerin bir çeşidi olan kriyojeller [57], sıfırın altındaki sıcaklıklarda sentetik ve doğal polimerlerin ayrı ayrı veya birlikte kullanılmasıyla sentezlenen polimerlerdir [37,58]. Kriyojellerin geniş ve birbirleriyle bağlantılı gözeneklere sahip olmaları, biyouyumlu olmaları, hücreler üzerinde toksik etkilerinin bulunmaması, hücre bağlanmasına izin vermeleri, mekanik olarak dayanıklı ve esnek olmaları, canlı dokular gibi yüksek miktarda su tutabilme kapasiteleri sayesinde doku mühendisliği çalışmalarında doku iskelesi olarak kullanılmaları avantajlıdır [59,60]. Kriyojellerin sahip olduğu birbirleriyle bağlantılı makrogözenekleri besin ve oksijenin hücrelere iletilmesini, metabolik atıkların da hücrelerden kolayca uzaklaştırılmasını sağlar [58]. Ayrıca kriyojeller sentezlenirken diğer bazı doku iskelelerinde olduğu gibi organik çözücüler kullanılmadığı için kriyojeller çevre dostudur [36,58]. Organik çözücülerin hücreler üzerinde toksik etkisi bulunmaktadır. Organik çözücüler kullanılarak yapılmış doku iskelelerinin hücre uygulamalarında kullanımı için öncelikle bu organik çözücülerin tamamen uzaklaştırılması gerekir, ancak bu işlem oldukça zordur [58].

Yukarıda da bahsedildiği gibi sentetik ve doğal malzemelerin kullanılmasıyla kriyojeller sentezlenebilir [28]. Sentetik ve doğal malzemeler birlikte kullanılarak sentezlenen

kriyojeller doku mühendisliği uygulamalarında kullanımını açısından daha avantajlıdır [28]. Doğal malzeme kaynaklı sentezlenen kriyojeller ECM bileşenlerinin kullanılmasıyla oluşturulabileceği gibi, ECM bileşeni olmayan doğal malzemelerden de sentezlenebilirler [44]. Doğal malzeme temelli sentezlenen kriyojellere hiyaluronik asit [61], laminin [62], alginat, kitosan, agaroz, dekstran, jelatin, kolajen [63], selüloz, ipek fibroin, alginat-agaroz, kitosan-jelatin, jelatin-fibrinojen örnek olarak verilebilir [64]. Doğal polimer temelli kriyojeller ve kullanım alanları çizelge 2.2’de özetlenmiştir. Sentetik malzeme temelli sentezlenen kriyojellere örnek olarak PHEMA, PEG, Poli vinil pirolidon (PVP) [63], PVA [62], poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), PGA ve PCL verilebilir [61]. Sentetik temelli kriyojeller ve kullanım alanları çizelge 2.3’de özetlenmiştir. Bu tez çalışmasında sentetik PHEMA kriyojeller doğal malzeme olan jelatin ve fonksiyonel komonomer olarak kullanılan MAH komonomeri ile birlikte sentezlenmiştir.

Çizelge 2.2. Doğal polimer temelli kriyojellerin kullanım alanları

Doğal Polimer Adı	Kullanım Alanları
Alginat	Doku mühendisliği, eczacılık, ilaç taşıma sistemleri [65]
Kitosan	Kontak lens malzemesi, kemik doku mühendisliği, kıkırdak doku mühendisliği [52], eczacılık, deri doku mühendisliği, sinir doku mühendisliği [66], afinite saflaştırma, enzim immobilizasyonu [28], kontrollü ilaç salınımı, ilaç taşıma sistemleri ve yara örtü malzemesi [67].
Selüloz	Eczacılık [68], deri doku mühendisliği [69], kıkırdak doku mühendisliği, ilaç taşıma sistemi [70] ve kemik doku mühendisliği [71].
İpek fibroini	Kemik doku mühendisliği [72].
Laminin	Sinir doku mühendisliği [73], kas doku mühendisliği, intervertebral disk doku mühendisliği [74].
Hyalüronik asit	Sinir doku mühendisliği [75], kıkırdak doku mühendisliği, kemik doku mühendisliği [76], kalp doku mühendisliği ve deri doku mühendisliği [77].
Kolajen	Sinir doku mühendisliği [75], kemik doku mühendisliği [78], kıkırdak doku mühendisliği [79] ve yara örtü malzemesi [80].
Agaroz	Kıkırdak doku mühendisliği [42], sinir doku mühendisliği ve ilaç taşıma sistemleri [81].
Jelatin	Kıkırdak doku mühendisliği [46], Kemik doku mühendisliği ve deri doku mühendisliği [76].
Kitosan-jelatin	Kemik doku mühendisliği [64].
Dekstran	İlaç taşıma sistemi, yara örtü malzemesi [80] ve deri doku mühendisliği [7].

Çizelge 2.3. Sentetik polimer temelli kriyojellerin kullanım alanları

Sentetik Polimer Adı	Kullanım Alanları
Poli 2-hidroksietil metakrilat (PHEMA)	Kıkırdak doku mühendisliği [82] ve kemik doku mühendisliği [83].
Poli vinil alkol (PVA)	Kıkırdak doku mühendisliği [84], biyoayrım, hücre immobilizasyonu ve ilaç taşıma sistemi [85].
Poli vinil pirolidon (PVP)	Yara örtü malzemesi [80].
Polietilenimin (PEI)	Boya/ ağır metal giderimi [86].
Poli kaprolakton PLC	Kemik doku mühendisliği [61].
Poli etilen glikol (PEG)	Kıkırdak doku mühendisliği [87], ilaç taşıma sistemi [88] deri doku mühendisliği [7], kemik doku mühendisliği [71] ve sinir doku mühendisliği [89].
Poli laktik asit (PLA)	Kıkırdak doku mühendisliği ve deri doku mühendisliği [82].
Poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA)	Deri doku mühendisliği [39].
Poli (laktik asit) PLG	İlaç taşıma sistemi [90] ve kemik doku mühendisliği [71].
Poli (glikolik asit) (PGA)	Kıkırdak doku mühendisliği, deri doku mühendisliği [82] ve kemik doku mühendisliği [71].

Yukarıda kullanım alanları özetlenen sentetik ve doğal polimerler bazı avantaj ve dezavantajları bir arada bulundurulur. Çizelge 2.4 ve Çizelge 2.5’de sırasıyla sentetik ve doğal polimerler için avantajlar ve dezavantajlar tablosu verilmiştir.

Çizelge 2.4. Doğal polimerlerin avantajları ve dezavantajları

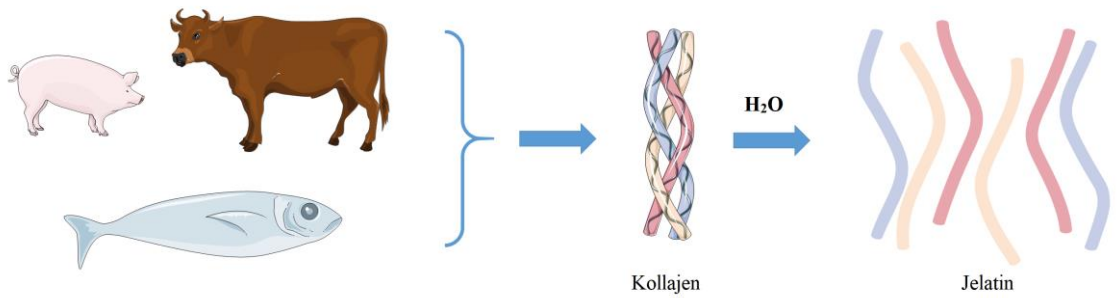
Avantajlar	Dezavantajlar
Hücre tutunabilmesi için uygun yüzey özelliklerine sahiptirler [42].	Yetersiz mekanik özelliklere sahiptirler [91].
ECM yapımını desteklerler [84].	Doğal enzimlerle çok kolay denatüre olurlar. Denatüre olmamaları için kimyasal maddelerle modifiye edilmelidirler. Bu durum toksik etkiye sebep olabilir [82].
Hücreleri üzerinde toksik etkileri bulunmaz ve biyouyumludurlar [92,82].	İmmün yanıt oluşturma riskleri vardır [91].
Ekonomiktirler [92].	Tekrar kullanılabilirlikleri düşüktür [84].
Biyobozunurdurlar [92].	Çözünebilirlik sorunu vardır [91].

Çizelge 2.5. Sentetik polimerlerin avantajları ve dezavantajları

Avantajlar	Dezavantajlar
Kontrol edilebilir kimyasal yapıya sahiptirler [91].	Hücre tutunması için yetersiz yüzey alanına sahiptirler [42].
Biyoyumludurlar [90].	Biyobozunurluğu azdır [28].
Kaynak sıkıntısı yoktur, miktarca boldurlar [28].	Bozunma esnasında zararlı yan ürünler oluştururlar [91].
Saflık derecesi yüksektir [28].	Yerleştirildiği alanda reddedilme olasılığı vardır [28].

2.3. Jelatin

ECM'nin temel bileşenlerinden biri olan kolajen, ECM yapısında en çok bulunan proteinlerden biridir [93]. Kolajen hücre kültür ve doku mühendisliği çalışmalarında başka biyomalzemelerle bir arada kullanılmaktadır. Ancak kolajenin immün yanıt oluşturma riski taşıması, elastikiyetinin az olması ve patojen taşıma riski yüksek olması biyomedikal alanda kullanımını kısıtlar [94]. Jelatin kolajenin denatürasyonu veya hidrolizi ile elde edilen bir çeşit kolajen yan ürünüdür. Jelatin soğuk su balığı derisinden, domuzdan ve sığırdan elde edilebilir [95]. Şekil 2.5'deki görselde jelatinin elde edilme kaynakları özetlenmiştir. Triptofan amino asidi dışında tüm amino asitler jelatinin yapısında mevcuttur [96]. Amino asit içeriği jelatinin elde edildiği kaynağa göre değişim göstermesine rağmen [96], genel olarak arjinin, glisin ve asparajin aminoasit dizileri bakımından zengindir. Bu diziyeye RGD dizisi adı verilir [42], Bu dizi hücrelerin tutunmasını, yayılmasını ve farklılaşmasını desteklemektedir [59]. İki tip jelatin elde etme yöntemi vardır. Jelatin kolajenin asitle muamelesiyle elde edilince tip A, baz ile muamele edilmesiyle elde edilince tip B olarak adlandırılır [97]. Aynı kolajen kaynağından elde edilseler bile farklı yöntemle yapıldıkları için tip A ve tip B jelatin farklı özellikler taşır. Tip A jelatin tip B jelatine göre daha dayanıklıdır, prolin ve glisin amino asitlerince zengindir, pozitif yüklüdür ve izoelektrik noktası 8.0 ile 9.0 arasındadır. Tip B jelatin ise tip A'ya oranla daha kırılabilir yapıdadır, negatif yüklüdür ve izoelektrik noktası 4.8 ile 5.4 arasındadır [98].



Şekil 2.5. Jelatin; Soğuk su balığı, sığır ve domuz derisinden elde edilen kolajenin denatürasyonu veya hidrolizi sonucu elde edilebilir.

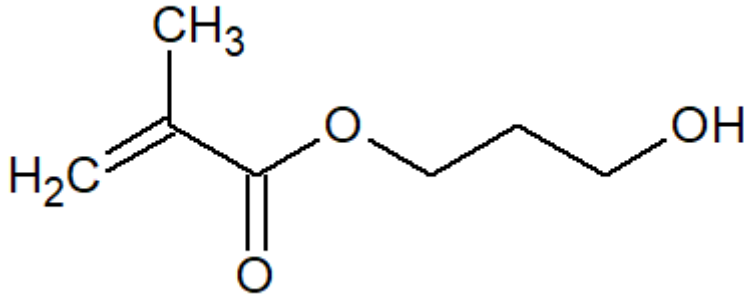
Jelatin kolajen ile büyük yapısal benzerlik göstermektedir. Bu sayede ECM ile de benzerlik gösterir ve doku iskelesi olarak kullanımı avantajlı bir malzemedir [95]. Jelatin kolajenin denatürasyonu ile elde edildiği için patojen taşıma riski yoktur [94], immün cevap oluşturmaz [93], toksik ve karsinojenik değildir [99]. Jelatin ayrıca biyouyumludur, biyobozunurdur ve en önemlisi düşük maliyetli bir üründür [93]. Jelatinin sahip olduğu bu özellikleri sayesinde doku mühendisliği çalışmalarında kolajenin yerine kullanımı oldukça avantajlıdır [21]. Jelatinin doku mühendisliği çalışmalarında doku iskelesi, yara örtü malzemesi ve ilaç taşıma sistemi olarak çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır [99]. Jelatinden yapılan doku iskeleleri doku mühendisliği çalışmaları için süngerimsi yapıda sentezlenerek hücrelerin üzerine tutunabileceği yüzey alanı artırılabilir. Ancak yalnızca jelatinden yapılmış doku iskeleleri oldukça zayıf mekanik özellikler göstermenin yanı sıra hidrolize karşı da dayanıklı değildirler. Bu olumsuz özellikleri tersine çevirmek için jelatin doku iskeleleri çapraz bağlanarak kararlı hale getirilir [82,99]. Kolajen ve jelatin için çapraz bağlayıcı olarak formaldehit, gluteraldehit ve karbodiimid kullanılır [76].

Bu tez çalışmasında jelatin için çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehit kullanılmıştır. Gluteraldehitin çapraz bağlama prensibi jelatinin yapısında yer alan lizin veya hidroksilizin serbest amin grubu ile gluteraldehitin yapısında yer alan aldehit grubu arasındaki reaksiyona dayanmaktadır. Biyomedikal alanda en çok kullanılan çapraz bağlayıcı olan gluteraldehit [99], ekonomiktir, kolajen ve kolajen türevlerini oldukça etkili bir şekilde bağlayabilir [55,99]. Genellikle çapraz bağlayıcı olarak kullanılan maddelerin hücreler üzerinde toksik etkisi bulunur. Gluteraldehitin hücreler üzerindeki toksik etkisi oldukça azdır [55]. Bu özellikleri sayesinde çalışmamızda gluteraldehit çapraz bağlayıcı olarak seçilmiştir.

2.4. PHEMA

PHEMA, Şekil 2.6'de kimyasal yapısı verilen HEMA monomerinin çapraz bağlanmasıyla sentezlenen sentetik bir malzemedir. Suda çözünebilir, biyouyumludur, kimyasal ve hidrolitik olarak kararlı yapıdadır [100]. PHEMA kriyojellerin çok yüksek oranda su tutabilme kapasiteleri vardır [50]. PHEMA kan ile biyouyumludur ve hidrofilik karakterdedir [15]. PHEMA tıp ve eczacılık alanında ilk kullanılan sentetik polimerdir [16]. PHEMA kontrollü ilaç salınım sistemlerinde [15], sentetik deri çalışmalarında,

göğüs büyütme ameliyatlarında [16], yumuşak kontakt lenslerin yapımında, dental adeziv uygulamalarda [101] ve doku mühendisliğinde doku iskelesi olarak kullanılmaktadır [16]. PHEMA'dan yapılan malzemeler, içerisine hapsolmuş hücreler için toleranslıdır [100]. Biyo-kararlılığı çok yüksek olduğu için PHEMA kriyojel kendiliğinden zor bozunur [102,103]. PHEMA kriyojellerin en önemli özelliklerinden biri çok iyi şişme özelliği göstermesidir. Kriyojellerin şişme özelliği polimerizasyon için kullanılan öncüllere, yapılış yöntemine ve kullanılan çapraz bağlayıcıya bağlıdır [16]. PHEMA kriyojeller isteğe bağlı olarak çok farklı şekillerde sentezlenebilirler [102]. Ayrıca PHEMA kriyojeller otoklavda sterilize edilebilirler [50].



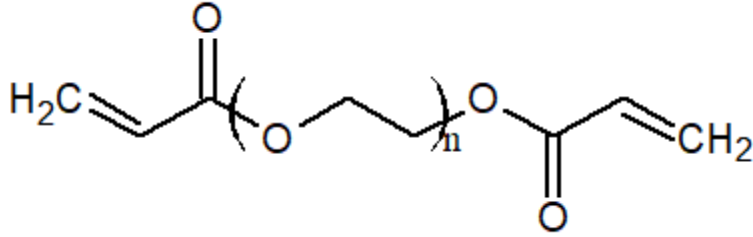
Şekil 2.6. HEMA'nın kimyasal yapısı.

Tüm bu olumlu özelliklerine rağmen ve tek başına kullanıldıklarında hücrelerin yüzeye tutunması için yeterli değildirler [50]. PHEMA'nın bu dezavantajı sebebiyle çalışmamızda jelatin gibi doğal bir malzeme ve MAH gibi histidin amino asitince zengin komonomer kullanılarak hücrelerin yapılan doku iskelesi tarafından daha kolay tanınması, tutunması ve burada çoğalması amaçlanmaktadır.

2.5. PEGDA

Bu tez çalışmasında HEMA için çapraz bağlayıcı olarak kullanılan PEGDA aynı zamanda komonomer olarak da kullanılabilen bir malzemedir. Şekil 2.7'de kimyasal yapısı verilen PEGDA sahip olduğu hidrofilik yapısı sayesinde suda rahatlıkla çözünebilir [88]. PEGDA ister çapraz bağlayıcı isterse komonomer olarak kullanıldığı çalışmalarda kriyojelin şişme özelliğini ve elastikiyetini doğrudan etkiler [104]. PEGDA bazlı oluşturulan malzemeler geniş gözeneklidir ve hücreler üzerinde toksik etkisi bulunmayan

bir çapraz bağlayıcı olduğundan doku mühendisliği uygulamalarında da kullanımı avantajlı malzemelerdir [104,67]. Daha önceki yapılan çalışmalarda da belirtildiği gibi PEGDA ile yapılan PHEMA kriyojellerin yüzeyi oldukça pürüzlüdür. Bu özelliği ile yukarıda bahsedilen PHEMA kriyojellerde hücre tutunması bakımından zayıf olma dezavantajını terse çevirerek hücrelerin yapıya daha kolay tutunabileceği bir ortam oluşturulmasını sağlar [105].

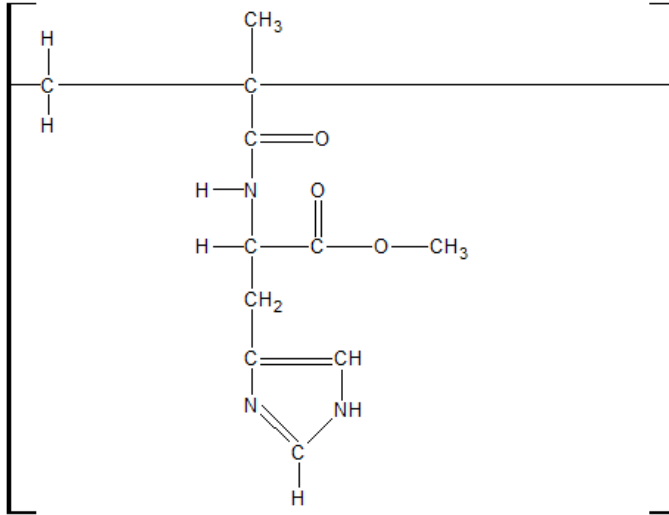


Şekil 2.7. PEGDA'nın kimyasal yapısı.

2.6. Histidin amino asiti ve MAH komonomeri

Temel amino asitlerden biri olan histidin [106], dokuların büyümesi ve onarımında önemli rol oynar [107]. Histidinin yetersiz veya hiç olmaması canlılarda çeşitli sorunlara neden olur [107]. Histidin organ nakillerinde, nakil işlemi yapılana kadar organları koruyucu tampon görevinde kullanılmaktadır [108]. Organ nakillerinde tampon olarak yüksek derişimde PBS'in kullanılması hücreler üzerinde toksik etki yaratır. Histidin tamponu PBS tamponuna göre daha az toksik etki göstermesi sayesinde kullanımı daha avantajlıdır [108].

Kimyasal yapısı Şekil 2.8'da verilen MAH komonomeri histidin amino asidinden sentezlenir [109]. MAH hidrofilik yapıda, düşük maliyetli, biyouyumlu bir monomerdır [110]. Pseudospesifik ligand veya ko-monomer olarak kullanılabilir [111]. Histidin hücreler üzerindeki avantajlı özelliklerden yararlanmak amacıyla bu çalışmada MAH komonomer olarak kullanılmıştır. Bu komonomeri içeren kriyojellerin hücrelerin canlılıklarını devam ettirmesi ve çoğalmalarına katkı sağlaması beklenmektedir.



Şekil 2.8. MAH komonomerinin kimyasal yapısı yapısı

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

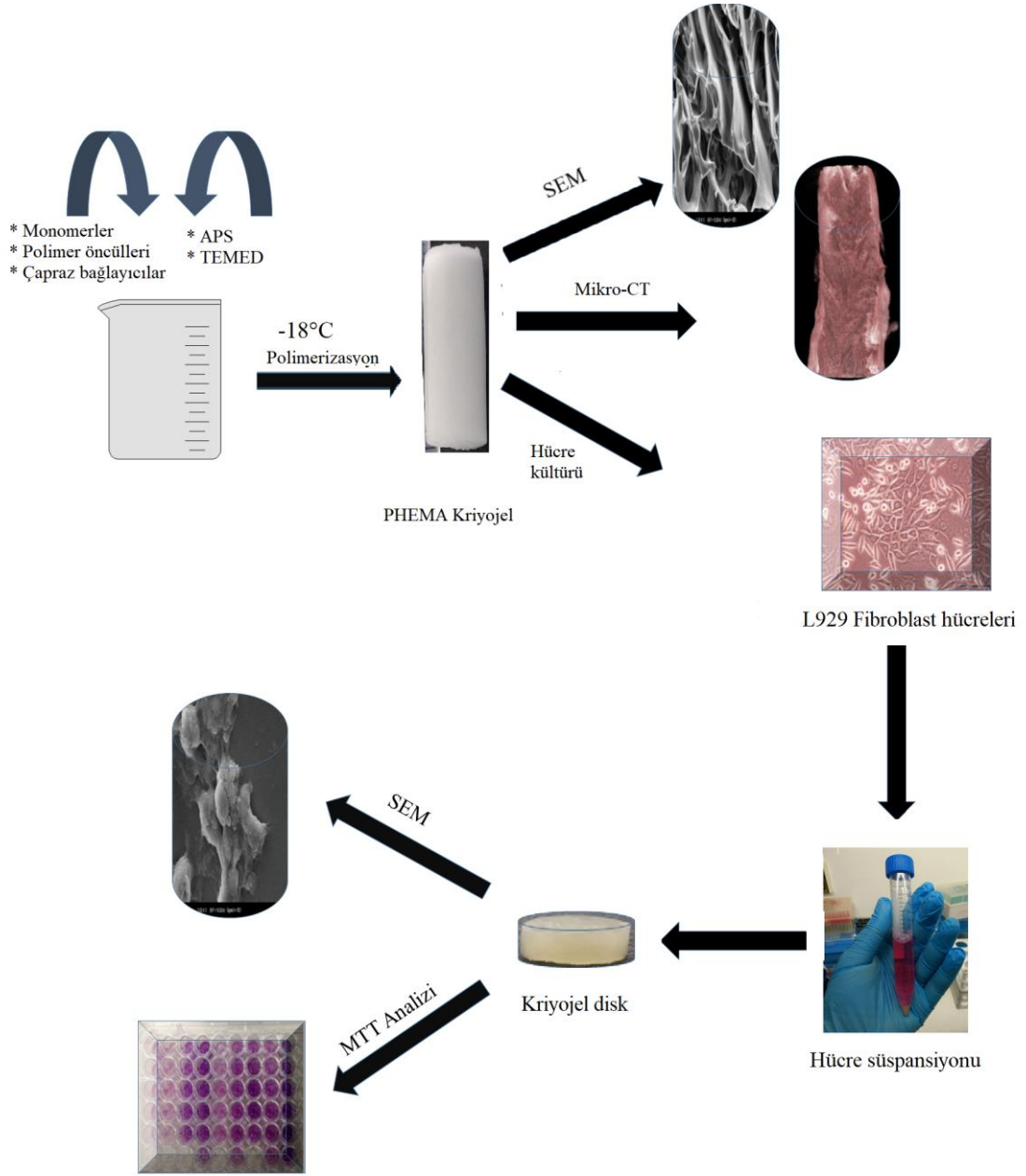
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kriyojellerin sentezinde monomer olarak kullanılan HEMA, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan PEGDA Sigma (St Louis, USA) firmasından, reaksiyon hızlandırıcı olarak kullanılan N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) Merck (Darmstadt Almanya) firmasından, reaksiyon başlatıcı olarak kullanılan amonyum persulfat (APS), jelatin (domuz derisinden, Tip A) ve jelatin için çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutraldetit (%25'lik) Sigma (St Louis, USA) firmasından alınmıştır.

Hücre kültür çalışmaları kapsamında kullanılan L929 fare fibroblast hücreleri Hücre Kültür Kataloğu (HÜKÜK) (Ankara, Türkiye)'nden alınmıştır. Besi ortamı olarak kullanılan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Merck (Berlin, Almanya) firmasından, Fetal Sığır Serum Cegrogen (Stadtallendorf Almanya) firmasından, penicilin, streptomisin, tripsin/EDTA çözeltisi Sigma (St Louis, USA) firmasından temin edilmiştir.

Hücre canlılık testlerinde ve SEM örneklerinin hazırlanmasında kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]difenilterazolyum bromür (MTT), PBS (0,01M, toz halde), dimetil sülfoksit (DMSO), heksametildisilazan (HMDS) ve amonyak Sigma (St Louis, USA) firmasından alınmıştır. Çalışmalarda sterilizasyon ve SEM örneklerinin dehidrasyonunda kullanılan alkol Riedel de haen (Seelze, Almanya) firmasından alınmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında yapılan deneylerin ve analizlerin özeti Şekil 3.1'de özetlenmeye çalışılmıştır.

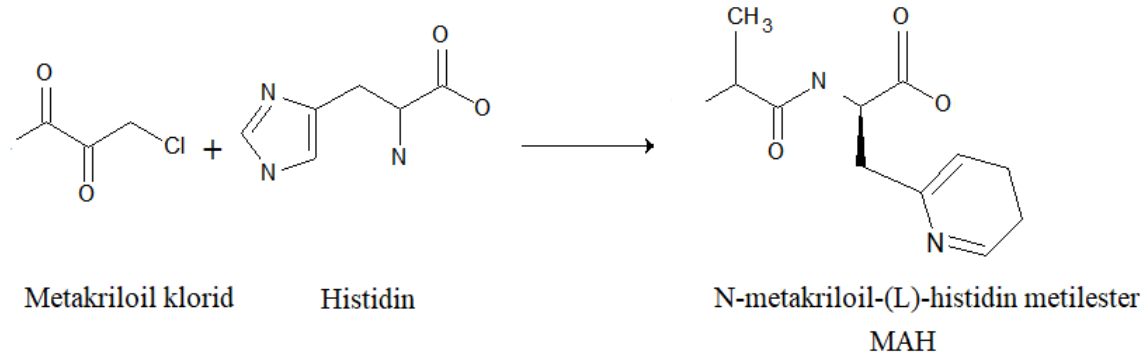


Şekil 3.1. Deney özeti. PHEMA temelli kriyojellerin polimerizasyonu, karakterizasyonu, L929 hücrelerinin kriyojellere ekimi, doku iskelesi olarak kullanılabilirliğinin kontrolü.

3.2. PHEMA temelli jelatin ve amino asit içeren süpermakrogözenekli kriyojellerin hazırlanması

3.2.1 MAH Komonomerinin Sentezlenmesi

Şekil 3.2’de sentezi özetlenen MAH komonomerinin sentezi için uygulanacak yöntem kısaca şöyledir: L-histidin metil esterden 5.0 g ve hidrokinonda 0.2 g, 100 mL CH₂Cl₂ çözeltisinin içinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 0°C’a soğutulduktan sonra üzerine 12.7 g trietilamin eklenmiştir. Daha sonra çözelti üzerine yavaşça 5.0 mL metakroil klorür eklenmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımı azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı yardımı ile 2 saat oda ısısında karıştırılmıştır. Sonrasında reaksiyona girmeyen metakroil klorür, %10'luk NaOH çözeltisi kullanılarak ortamdan ekstrakte edilmiştir. Sulu faz döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MAH) etanolde çözülmüştür.



Şekil 3.2. MAH komonomerinin sentezinin özeti.

3.2.2. PHEMA Kriyojel sentezi

1.3 mL monomer olan HEMA ve çapraz bağlayıcı olan 0.506 mL PEGDA 13.5 mL ultra saf su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülmüştür. Sistem buz banyosunda soğutulmuştur. Daha sonra polimerizasyon başlatıcıları olan 20 mg APS, 25 µL TEMED sırasıyla eklenip karışım önceden soğutulmuş çapı 8mm olan cam kolonlar içine 1ml olacak şekilde dökülmüştür. Cam kolonlar -18°C sıcaklıkta olan dondurucuya hızlı bir şekilde kaldırılmıştır. Kolonlar dondurucuda 24 saat boyunca bekletilmiştir, sonrasında dondurucudan çıkarılarak oda sıcaklığında kriyojellerin erime aşamasının tamamlanması sağlanmıştır. Bu aşama hazırlanan polimer çözeltisi içerisindeki donarak buz kristallerini

oluşturan sulu kısmın eriyip birbirleriyle bağlantılı makrogözenekleri oluşturduğu aşamadır. Erime aşaması tamamlandıktan sonra yapıya giremeyen monomer/polimer öncüllerinin ve çapraz bağlayıcıların ortamdan uzaklaştırılması için kriyojeller birkaç kez distile su ile yıkanmıştır. 8mm çapında hazırlanmış kolonlar 3mm boyutunda olacak şekilde kesilmişlerdir. Üzerinde kalan polimer parçalarının uzaklaştırılması için tekrardan distile su ile yıkama yapılmıştır. Hazırlanan kriyojeller kullanılacakları zamana kadar +4°C’de sodyum azid çözeltisi (20g/L %0.02 (w/v)) içerisinde saklanabilirler.

Bu tez çalışmasında dört farklı özellikte kriyojel (PHEMA, PHEMA/GEL, PHEMAH, PHEMAH/GEL) ve jelatin oranına göre toplamda sekiz farklı kriyojel oluşturulmuştur. Bu grupların isimleri kullanılan jelatin miktarına uygun olarak verilmiştir. Sentezlenen tüm kriyojeller yukarıda verilen PHEMA kriyojel sentezine uygun olarak hazırlanmışlardır. MAH ve jelatin polimerizasyon esnasında ortama eklenmiştir. Jelatin bulunduran kriyojeller hazırlanırken önce jelatin (PHEMA/0.1GEL ve PHEMAH/0.1GEL için 0.1g; PHEMA/0.2GEL ve PHEMAH/0.2GEL için 0.2g; PHEMA0.4GEL ve PHEMAH/0.4GEL için 0.4g jelatin kullanılmıştır.) sıcak su banyosunda ultra saf su içerisinde eritilmiş ve oda sıcaklığında soğutulduktan sonra diğer monomerler, çapraz bağlayıcılar vs. eklenmiştir. Jelatin için çapraz bağlayıcı olarak glutraldehit (20µL) kullanılmıştır. Sıvı halde olan MAH komonomeri (0.228mL) polimer şurubuna doğrudan eklenerek kriyojeller sentezlenmiştir. Aşağıda verilen çizelge 3.1’de çalışma kapsamında sentezlenen tüm kriyojellerin içerikleri daha iyi anlaşılabilmesi için + ve – işaretleriyle özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında sentezlenen kriyojellerin içerikleri.

KRIYOJELLER	Kullanılan Kimyasallar			
	HEMA	PEGDA	JELATİN	MAH
PHEMA	+	+	-	-
PHEMA/0.1GEL	+	+	+	-
PHEMA/0.2GEL	+	+	+	-
PHEMA/0.4GEL	+	+	+	-
PHEMAH	+	+	-	+
PHEMAH/0.1GEL	+	+	+	+
PEHMAH/0.2GEL	+	+	+	+
PHEMAH/0.4GEL	+	+	+	+

3.3 PHEMA temelli jelatin ve amino asit içeren süpermakrogözenekli kriyojellerin karakterizasyonu

Sentezlenen kriyojellerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında kriyojellerin şişme özellikleri, yüzey özellikleri ve yapısal özellikleri incelenmiş ve birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

3.3.1. Şişme Deneyleri

i) Jelleşme verimi

Kriyojellerin jelleşme veriminin incelenebilmesi için su ile şişmiş kriyojeller 40°C sıcaklığa ayarlanan inkübatörde kurutulmuştur. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra kuruyan kriyojelin ağırlığı ($m_{\text{kuru jel}}$) ölçülmüştür. Aşağıda verilen Eşitlik 3.1 ile tanımlanan jelleşme verimi hesabına uygun olarak kriyojellerin jelleşme verimi hesaplanmıştır [112].

$$\text{Jelleşme verimi (\%)} = (m_{\text{kuru jel}} / m_t) \times 100 \quad \text{Eşitlik (3.1)}$$

Bu denkleme göre m_t ; polimer şurubunda bulunan monomerlerin toplam kütlesini ifade eder.

ii) Şişme derecesi hesabı

Hazırlanan kriyojellerin şişme dereceleri (S) aşağıda verildiği şekilde ölçülmüştür: Kriyojellerin ıslak ağırlığını ölçmek için kriyojeller deiyonize su içerisinde şişene kadar bekletilmiştir. Daha sonra kriyojellerin yüzeyinde kalan fazla su uzaklaştırılıp, kriyojelin ağırlığı ($m_{\text{ıslak jel}}$) tartılmıştır. Kriyojellerin kuru ağırlığını ölçmek için kriyojeller inkübatörde 40°C sıcaklıkta kurutulmuş ve kuru kriyojelin ağırlığı ($m_{\text{kuru jel}}$) tartılmıştır. Şişme derecesi aşağıda verilen Eşitlik. 3.2 ile hesaplanmıştır [111].

$$\text{Şişme derecesi (S)} = (m_{\text{ıslak jel}} - m_{\text{kuru jel}}) / m_{\text{kuru jel}} \quad \text{Eşitlik (3.2)}$$

iii) Şişme oranı

Şişme oranı hesabı için kriyojellerin şişmiş ve kuru ağırlıkları tartılmıştır. Kriyojellerin şişmiş ağırlığını ölçmek için kriyojeller su içerisinde tamamen şişmesi sağlandıktan sonra ($m_{\text{şişmiş jel}}$) tartılmıştır. Daha sonra kriyojellerin kuru ağırlığını ölçmek için kriyojeller inkübatörde 40°C sıcaklıkta kurutulmuştur ve kuru kriyojelin ağırlığı ($m_{\text{kuru jel}}$) tartılmıştır. Şişme oranı aşağıdaki verilen Eşitlik. 3.3 ile hesaplanmıştır [112].

$$\text{Şişme oranı (\%)} = (m_{\text{şişmiş jel}} - m_{\text{kuru jel}}) / m_{\text{şişmiş jel}} \times 100 \quad \text{Eşitlik (3.3)}$$

iv) Makrogözenek miktarı

Makrogözenek miktarını hesaplayabilmek için şişmiş ve sıkılmış jel ağırlıkları tartılmıştır. Şişmiş jel ağırlığı için kriyojeller su içerisinde bekletilip şişmesi sağlandıktan sonra ($m_{\text{şişmiş jel}}$) tartılmıştır. Sıkılmış kriyojel ağırlığını bulmak için ise şişmiş halde bulunan kriyojelin yapısındaki su sıkılarak uzaklaştırılmış ve ($m_{\text{sıkılmış jel}}$) tartılmıştır.

Kriyojellerin makrogözenek toplam hacmi aşağıda verilen Eşitlik.3.4 ile hesaplanmıştır [112].

$$\text{Makrogözenek miktarı (\%)}: (m_{\text{şişmiş jel}} - m_{\text{sıkılmış jel}}) / m_{\text{şişmiş jel}} \times 100 \quad \text{Eşitlik (3.4)}$$

3.3.2. Fourier transform infrared (FTIR) Spektrometresi ile yapı analizi

MAH ve jelatin ile fonksiyon kazandırılmak istenen PHEMA temelli kriyojellerin

yapısına MAH ve jelatinin katılıp katılmadığını araştırmak amacı ile PHEMA, PHEMA/GEL, PHEMAH ve PHEMAH/GEL kriyojellerin yapısı FTIR Spektrometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet İs50, Waltham, MA, ABD) ile incelenmiş ve elde edilen sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Analiz öncesi örnekler etüvde 40°C’de kurutulmuştur ve örneklerin 650-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında spektrumu alınmıştır.

3.4. Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-CT)

Gözenek boyutu ve dağılımını görmek amacıyla sentezlenen kriyojeller arasından MAH komonomeri ve jelatini birlikte bulunduran PHEMAH/0.2GEL için mikro-ct taraması (SkySkan1272, Bruker, ABD) yapılmıştır. Işınlamalar 53 KVP (kilovolt pik), 70 mA(miliamper) gücünde yapılmıştır. Tarama 0.2° dönüş açısı ve 360° ile yapılmıştır. Mikro-CT’nin rotasyon basamağı 0.4°’ye ayarlanmıştır ve 820 adet iki boyutlu aksiyel görüntü elde edilmiştir. Düzgünleştirme (smoothing) yapılmamış, rekonstriksiyon esnasında ışık sertleşme oranı (Beam Hardening Correction) % 65’e ve halka artifact redüksiyonu (Ring Artifact Correction) 21’e ayarlanmıştır.

3.5. *In vitro* hücre kültürü deneyleri

3.5.1. Sterilizasyon

Farklı özelliklerde hazırlanmış olan kriyojel gruplarını sterilize etmek için kriyojeller 100 rpm’de 60 dakika %70’lik alkol (v/v) içerisinde çalkalayıcı üzerinde üç kez yıkandıktan sonra, yine 100 rpm’de üç kez steril ultra saf su ile yıkanmıştır. 48 kuyucuklu steril hücre kültür kaplarının tabanı hücre tutunmasını engellemek için parafilm ile kaplanmıştır. Daha sonra kriyojeller bu parafilm kaplı kuyucuklara yerleştirilip her yüzü 45 dakika olacak şekilde mor ötesi (UV) ışınına maruz bırakılmıştır. Bu sayede kriyojeller sterilize edilmiş ve hücre kültür çalışmalarında kullanıma uygun hale getirilmiştir.

3.5.2. Hücrelerin çoğaltılması

Çalışmada kullanılan L929 fare fibroblast hücreleri DMEM besi ortamı içerisine %10 FBS ve 1% penisilin/streptomisin eklenmesiyle oluşturulan ortamda kültüve edilmiştir. Hücre kültür çalışmaları %5 CO₂'li ve 37°C sıcaklıkta çalışan inkübatörde (SANYO, MCO-18AC, Japonya) gerçekleştirilmiştir.

3.5.3 Hücrelerin kriyojel doku iskelelerine ekimi

L929 fare fibroblast hücreleri çok hızlı çoğalabilme özelliği gösteren hücrelerdir. Farklı özelliklerde hazırlanmış olan kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanılabilirliği bu hücrelerle incelenmiştir. Farklı özellikte 8 mm çapında ve 3 mm yükseklikte olacak şekilde hazırlanan ve steril edilen kriyojellere hücrelerin ekimi yapılmadan önce kriyojeller %10'luk FBS ve %1'lik penisilin ve streptomisin içeren DMEM besi ortamı içinde bir gece bekletilmiştir.

Fibroblast hücreleri hücre peleti halinde iki aşamada kriyojellere ekilmiştir. İlk aşamada gece boyunca besi ortamı içerisinde bekletilen kriyojellerden besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Sekiz farklı kriyojel grubuna ek bir kuyucuk hücrelerin üreme özelliklerini değerlendirebilmek için ayrılmıştır. Her bir kriyojel başına 5×10^5 hücre gelecek biçimde 20 µL'lik hücre peleti/süspansiyonu kriyojellerin üzerine ekilmiştir. Kontrol grubu için de aynı miktarda hücre boş kuyucuğa eklenmiştir, bu kuyucuk parafilm ile kaplı değildir. Bu aşamada yalnızca kontrol grubunun üzerine 600 µL %10'luk FBS ve %1'lik penisilin ve streptomisin içeren DMEM besi ortamı eklenip 2 saat boyunca %5 CO₂ nem koşullarında ve 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Fibroblast hücrelerinin ekiminin ikinci aşamasında, kontrol grubu ve kriyojel başına 5×10^5 hücre gelecek biçimde yine 20 µL'lik hücre peleti/süspansiyonu kriyojeller üzerine ekilmiş ve üzerine kontrol grubu hariç (İlk aşamada eklenmiştir.) 600 µL %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besi yeri eklenip 24 ve 48 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren nem koşullarında inkübasyona bırakılmıştır.

3.5.4. MTT Hücre Canlılık Testi

MTT testi hücrelerin canlılığını ve çoğalmasını ölçen kantitatif ve hassas kolorimetrik bir yöntemdir. Bu test canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan mitokondrial dehidrogenaz enziminin mor renkli formazan kristalleri oluşturma prensibine dayanmaktadır. Canlı hücreler mitokondriyel aktivite göstereceğinden formazan kristallerinin miktarının hücre sayısı ile doğru orantı göstermesi beklenmektedir [113]. Bu test ile sentezlenen farklı özellikteki kriyojellerin hücre canlılığına olan etkisine ve bu kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanılabilirliklerine bakılmıştır.

MTT testini uygulamak amacı ile yukarıdaki protokolle hazırlanmış kriyojeller için; 24 ve 48 saat olmak üzere iki grup oluşturulmuştur. İki grup için aynı protokol uygulanmıştır. Kriyojellerin içinde bulunduğu besiyeri uzaklaştırılmış ve kriyojeller 1 mL PBS ile bir kez yıkanmıştır. PBS içinde 2,5 mg/mL olacak şekilde çözülerek hazırlanan MTT çözeltisi ve serum-antibiyotik içermeyen DMEM besi ortamı 13:100 oranında olacak şekilde karanlık ortamda kuyucuklara eklenmiştir. 37°C’de karanlık ortamda 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Devamında kuyucuklarda bulunan DMEM ve MTT uzaklaştırılıp kriyojellerin üzerine 1:20 oranında amonyak ve DMSO’dan oluşan çözeltiden 600 µl eklenmiştir. Mor renk alan bu çözeltiden 100 µl çekilerek 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına aktarılmış ve 550 nm’de mikropalak okuyucuda (BIOTEK, µQuant) spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonucu elde edilen OD (optik dansite) değerleri kullanılarak kriyojellere ekilen hücrelerin % canlılığı aşağıdaki eşitlik 3.5’e göre hesaplanmıştır ve MTT analizi sonuçları elde edilmiştir.

$$\% \text{ Hücre Canlılık} = \frac{\text{OD değeri}}{\text{Kontrol grubu OD değeri}} \times 100 \quad \text{Eşitlik (3.5)}$$

3.5.5. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) Analizi

L929 fibroblast hücrelerinin, jelatin oranına göre farklı özellikte hazırlanan PHEMA, PHEMA/GEL, PHEMAH ve PHEMAH/GEL kriyojeller ile olan etkileşimlerini incelemek amacıyla hücre ekimi yapıldıktan 48 saat sonra örnekler alınıp hücrelerin kriyojellerin yüzeyine tutunup tutunmadığına ve buna bağlı olarak hazırlanan kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Kıyaslama yapabilmek ve sentezlenen kriyojellerin yüzey ve yığın yapılarını değerlendirebilmek için hücre ekilmemiş kriyojellerin de SEM görüntülerine bakılmıştır. SEM örnekleri aşağıda verilen protokol ile hazırlanmıştır.

Kriyojeller önce gluteraldehit çözeltisinde fikse edilip daha sonra alkol ve HMDS kullanılarak dehidrate edilmiştir. Fiksasyon için kriyojellerin üzerinde bulunan besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra kriyojeller PBS ile yıkanmış, her bir kriyojelin üzerine %2,5'lük (v/v) gluteraldehit çözeltisinden 1ml eklenerek kriyojeller karanlık ortamda 4°C sıcaklıkta 30 dakika bekletilmiştir. Fiksasyon işleminin sonrasında SEM örnekleri 1mL PBS ile yıkanmıştır. Dehidrasyon işlemi için kriyojeller sırayla %30'lük, %50'lik, %70'lik ve %100'lük (v/v) etanol çözeltilerinde 5 dakika boyunca; heksametildisilazan (HMDS) içerisinde de 10 dakika boyunca bekletilmiştir. Sonrasında kriyojeller oda sıcaklığında kurutulup altın-paladyum ile kaplanarak SEM görüntüleri alınmaya hazır hale getirilmiştir.

3.6. İstatistiksel Analiz

Tez çalışması kapsamında 3 tekrarlı olarak yapılan MTT analizi sonuçlarının değerlendirilmesi için Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 23 yazılımı kullanılmıştır.

Çalışmada kapsamında hazırlanan PHEMA temelli kriyojellerin deney sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılacak istatistiksel analiz yöntemini belirlemek amacıyla parametrik testlerin varsayımlarına bakılmış ve varsayımlar sağlanmadığından sonuçlar için parametrik olmayan hipotez testi olan Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırmalar

yapılmıştır. Yanılma düzeyi olarak %5 belirlendiğinden, p değeri 0,05'ten küçük olduğu durumlarda farklılık anlamlı olarak kabul edilmiştir. Anlamlı çıkan gruplar için çoklu karşılaştırmalar (post-hoc), Bonferroni düzeltmesi kullanılarak Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır.

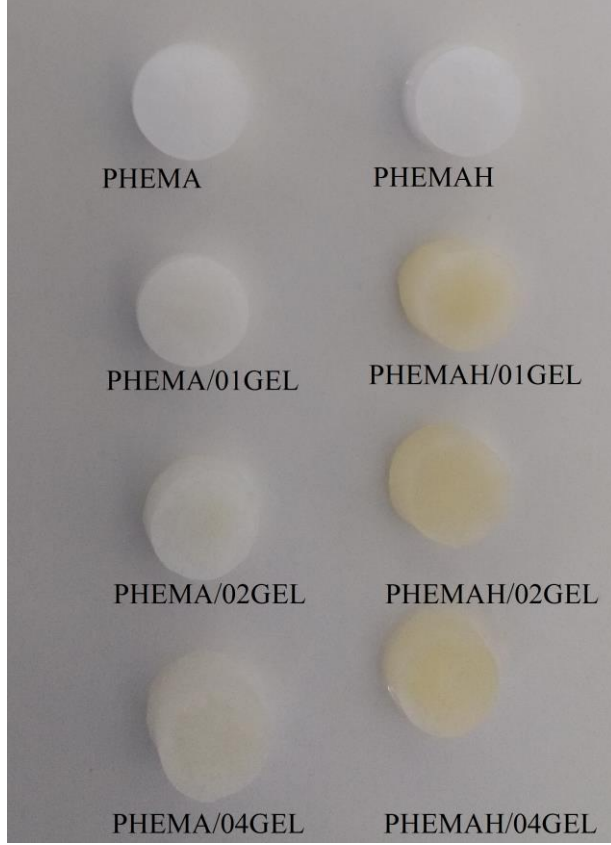
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 PHEMA temelli jelatin ve amino asit içeren süpermakrogözenekli kriyojellerin karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında sentezlenen PHEMA temelli kriyojellerin polimerizasyonu -18°C’de gerçekleştirilmiştir. 24 saat boyunca bu sıcaklıkta inkübe edilen kriyojeller bu sürenin sonunda oda ısısına çıkarılmıştır. Oda ısısında kriyojellerin yapısında polimerizasyon esnasında meydana gelen buz kristallerinin erimesi sonucunda birbirleriyle bağlantılı makrogözenekli bir yapı oluşmaktadır.

PHEMA kriyojeller geniş gözenekli, biyouyumlu, iyi şişme özelliği gösterebilen ve karalı yapıda kriyojellerdir [100]. Jelatinin yapısında hücre tutunmasını ve yayılmasını uyaran RGD sekansı bulunur bu sekans jelatinin ECM görevini daha etkin olarak yansıtabilmesini sağlar [114]. MAH komonomeri histidin gibi çok önemli bir amino asitten sentezlenen bir monomerdur [109]. Bizim çalışmamızın amacı yukarıda kısaca özellikleri verilen bu üç malzemeyi bir araya getirerek, farklı bir doku iskelesi yapmaktır.

MAH ve farklı oranlarda jelatinle fonksiyon kazandırılan dört farklı özellikte sekiz gruptan oluşan PHEMA temelli kriyojellerin jelatin ve MAH komonomerinin yapıya katılmasıyla değişen özellikleri incelenmiştir. Morfolojik olarak yapılan incelemeler sonucunda sentezlenen PHEMA temelli kriyojellerin oldukça esnek, sünger benzeri yapıda oldukları gözlenmiştir. Jelatin bulunan PHEMA/GEL kriyojellerde jelatin miktarının artmasıyla doğru orantılı olarak kriyojellerin esnekliğinde azalma görülmüş ancak esnekliğin az olması kırılğan bir yapının oluşmasına yol açmamıştır. PHEMAH kriyojelin PHEMA kriyojel gibi süngerimsi ve oldukça elastik yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca MAH komonomeri ve jelatini birlikte bulunduran PHEMAH/GEL kriyojellerin jelatin miktarına bağlı olarak MAH komonomeri bulunmayanlara oranla fark edilir şekilde daha koyu renkte oldukları gözlenmiştir. Çalışma kapsamında sentezlenen tüm kriyojellerin optik fotoğrafları Şekil 4.1’de verilmiştir.



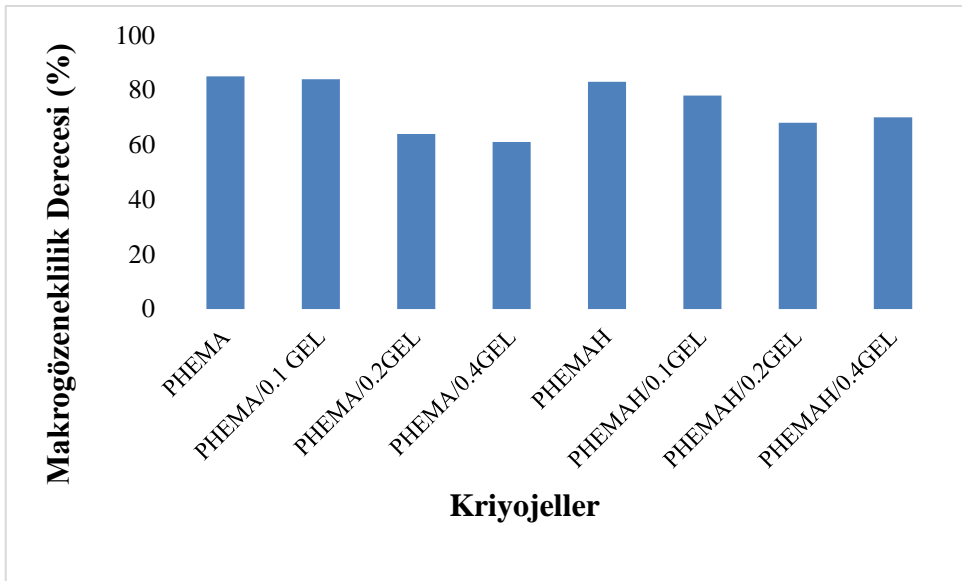
Şekil 4.1. Sentezlenen PHEMA temelli kriyojellerin optik fotoğrafları. PHEMA temelli kriyojeller serbest radikal polimerizasyonu ile -18°C 'de sentezlenmiştir.

4.1.1 PHEMA temelli kriyojellerin şişme özellikleri

Hazırlanan kriyojellerin şişme özellikleri doku iskelesi olarak kullanılabilirlikleri bakımından çok önemlidir. PHEMA temelli kriyojeller sahip oldukları hidrofilik yapıları sayesinde yüksek miktarda su tutabilme özelliğine sahiptirler [15]. PHEMA kriyojeller PEGDA ile çapraz bağlı olarak hazırlanmış olmaları sayesinde ağ şeklinde gözenekli bir yapıya sahiptirler. PHEMA temelli kriyojeller bu ağsı yapı içinde yüksek miktarda su tutabilme özelliği gösterirler. Çalışmanın bu aşamasında MAH ve farklı oranlarda jelatinle fonksiyon kazandırılarak hazırlanan PHEMA temelli kriyojellerin jelatin ve MAH komonomerinin yapıya katılmasıyla değişen şişme özellikleri incelenmiştir.

PHEMA temelli kriyojeller literatür bilgileriyle uyumlu olarak yüksek miktarda su tutabilme özelliği göstermişlerdir [50]. PHEMA temelli kriyojellerin bu özelliği yukarıda da bahsedildiği gibi sahip olduğu hidrofilik yapısından, geniş ve birbirleriyle bağlantılı gözeneklerin varlığından kaynaklanmaktadır. Besinlerin, gazların ve atık maddelerin taşınması açısından gözenek şekli, boyutu ve gözeneklerin bağlantılı olması çok

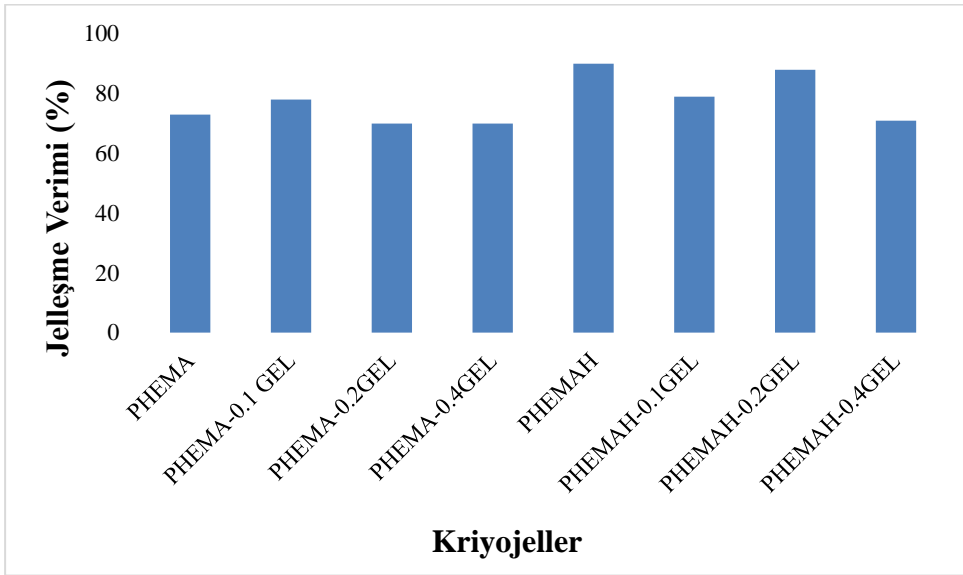
önemlidir. Gözenek boyutu ekilen hücrelerin doku iskelesine tutunmasını ve çoğalmasını doğrudan etkiler [115]. Bu yüzden makrogözeneklilik derecesi hazırlanan kriyojelin doku iskelesi olarak kullanılabilirliği için fikir verebilecek uygulaması kolay ve hızlı sonuç alınan bir yöntemdir. Şekil 4.2’ de verilen makrogözeneklilik derecesi grafiğine bakıldığında makrogözenekliliğin jelatin içermeyen veya az miktarda jelatin içeren gruplarda daha yüksek olduğu görülmektedir. Yüksek miktarda jelatin bulunan kriyojellerde makrogözeneklilik derecesinin düştüğünü görmekteyiz. Bu durumun sebebi glutraldehitin monomer çözeltisinde bulunan serbest amin gruplarını bağlamasından kaynaklanmaktadır. Monomer çözeltisinde serbest amin grubu sadece jelatinde değil, HEMA monomerinin yapısında da bulunduğu için HEMA’nın da boşta kalan aminleri de bağlanır [99]. Bu bağlama prensibi dolayısıyla makrogözeneklilik derecesinde küçük düşüşler meydana gelmiştir.



Şekil 4.2. Sentezlenen PHEMA temelli kriyojellerin makrogözeneklilik dereceleri.

Jelleşme verimi sentezlenen polimerlerin çapraz bağlanma kalitesinin ve dolayısıyla monomerlerin etkin bir şekilde polimerlere dönüşüp dönüşmediğinin bir göstergesidir. Hazırlanan kriyojellerin jelleşme verimleri Şekil 4.3’de sunulan grafikte karşılaştırmalı olarak verilmiştir. MAH içeren kriyojellerin MAH içermeyen kriyojellere göre biraz daha yüksek jelleşme verimlerinin olduğu görülmektedir. Jelatin oranının yüksek olduğu kriyojellerde jelleşme veriminin biraz düşük olduğunu görmekteyiz. Jelatin içeren kriyojellerin sentezi esnasında jelatin oranı artırılırken, çapraz bağlayıcısı olan

gluteralehit miktarı jelatin içeren tüm kriyojeller için sabit tutulmuştur. Yüksek miktarda jelatin içeren gruplarda jelleşme veriminin daha düşük olması çapraz bağlanma etkinliğinin azalmasından kaynaklanmaktadır. Literatürde yer alan bir çalışma kapsamında PHEMA ve PEGDA ile hazırlanmış kriyojellerin jelleşme verimleri incelendiği zaman bizim çalışma sonuçlarımızla benzer olarak jelleşme veriminin %70'e yakın olduğu bulunmuştur [105]. Şekil 4.3'de verilen jelleşme verimi grafiği incelendiğinde en yüksek jelleşme veriminin %90 ile PHEMAH kriyojele, en düşük jelleşme veriminin ise %70 ile PHEMA/0.4GEL' ait olduğu bulunmuştur. Ayrıca diğer sentezlenen kriyojellerin bu iki değer arasında jelleşme verimine sahip oldukları görülmektedir.

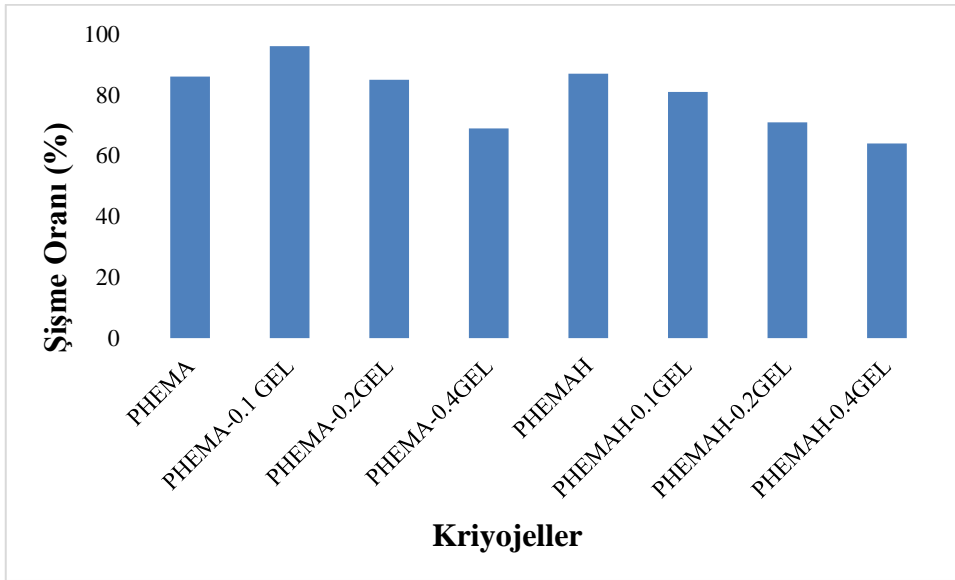


Şekil 4.3. PHEMA temelli kriyojellerin jelleşme verimi.

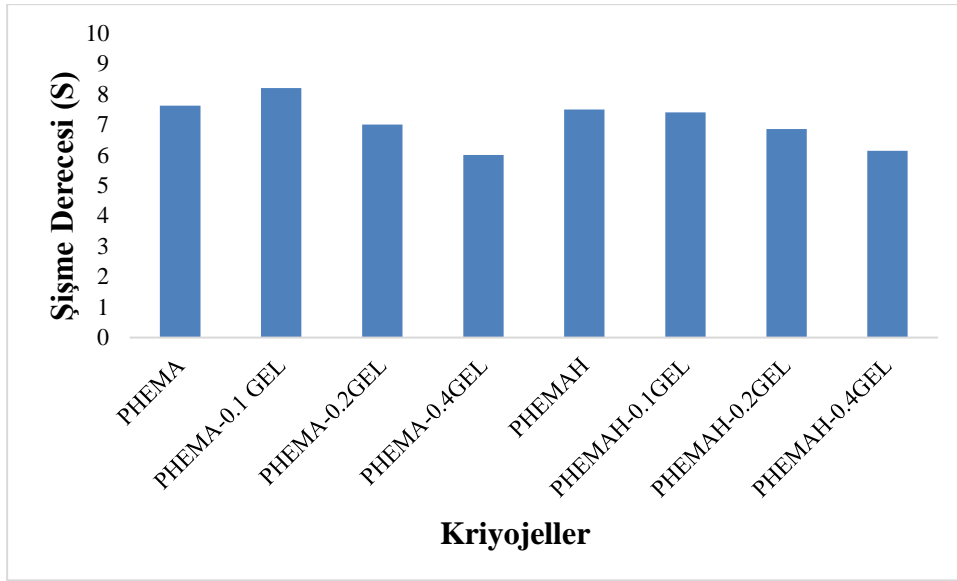
Kriyojellerin karşılaştırmalı olarak yüzde cinsinden şişme oranlarını veren grafik Şekil 4.4'de verilmiştir. Bu grafiği incelediğimiz zaman, PHEMA ve PHEMAH kriyojellerin şişme davranışlarının benzer olduğu bulunmuştur. Makrogözenekli derecesinde olduğu gibi yüksek miktarda jelatin içeren grupların şişme özelliklerinde jelatin miktarına bağlı olarak azalma gözlenmiştir. MAH ve jelatinin birlikte bulunduğu PHEMAH/GEL kriyojel ilk kez hazırlanan, literatürde daha önce çalışılmamış bir kriyojeldir. Jelatin ve PHEMA ile hazırlanmış kriyojeller için literatür çalışmalarına bakıldığında, jelatin içeren PHEMA kriyojeller için şişme oranının %90'lara vardığı görülmektedir [116]. Bu sonuç bizim elde ettiğimiz sonuçlarla uyumludur. Şişme oranı; PHEMA kriyojel için %88

PHEMA/0.1GEL için %96, PHEMAH için %87 ve PHEMAH/0.1GEL için %81 olarak bulunmuştur. Şekil 4.5’de verilmiş olan şişme dereceleri incelendiği zaman şişme oranlarıyla bağlantılı sonuçların ortaya çıktığı gözlenmektedir. MAH içeren kriyojellerin genel olarak içermeyenlere oranla daha yüksek şişme özelliklerine sahip olduğunu görmekteyiz. Genel olarak jelatin artışının şişme oranı ve şişme derecesi üzerinde azalmaya sebep olduğu sonucuna varılmıştır.

Kriyojellerin şişme özellikleri, yapının hidrofilik olmasından ve sahip oldukları bağlantılı makrogözeneklerin yoğunluğundan etkilenir. Jelatin hidrokolloid bir maddedir ve yüksek miktarda su tutma kapasitesine sahiptir [96]. Bu özellik sayesinde jelatin içeren kriyojellerde gözenek boyutunda azalma görülmesine rağmen şişme oranlarında ve şişme derecelerindeki azalma beklenene göre oldukça düşüktür.

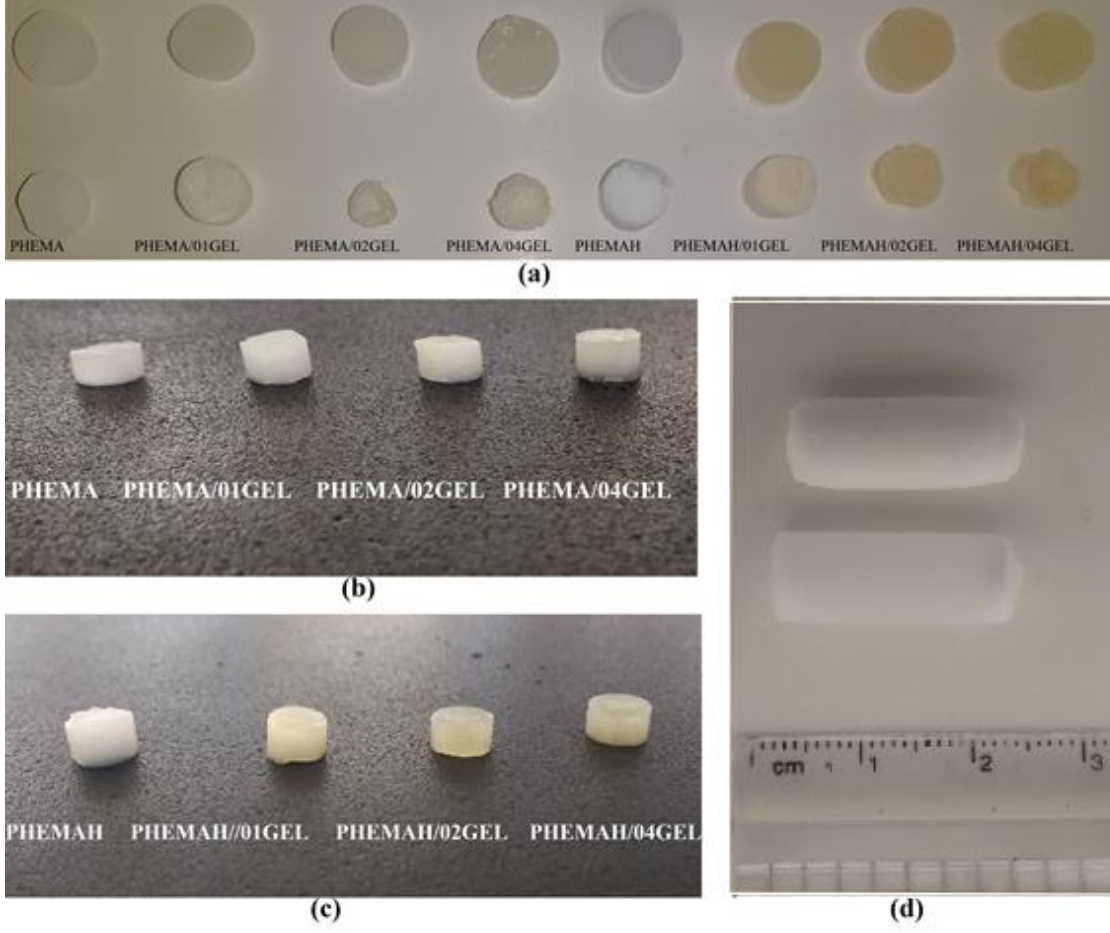


Şekil 4.4. Sentezlenen PHEMA temelli kriyojellerin şişme oranı



Şekil 4.5. Sentezlenen PHEMA temelli kriyojellerin şişme derecesi.

Kriyojellerin su alarak şişmiş ve kurutulmuş halleri arasında gözle görülebilir önemli bir farklılık bulunur. Bu fark kriyojellerin makrogözeneklilik derecesinden etkilenir. Jelatin miktarının yüksek olduğu kriyojellerde makrogözenekliliğin daha düşük olduğu Şekil 4.2’de verilen grafikte gösterilmiştir. Şekil 4.6’da olduğu gibi kurutulmuş kriyojellerin jelatin miktarıyla orantılı olarak daha fazla büzüştüğü görülmektedir. Literatürde verilen çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak hazırlanan PHEMA temelli kriyojellerin tümünün kuru ağırlığının %90 fazlası kadar su tutuma kapasitelerinin olduğu bulunmuştur [116].

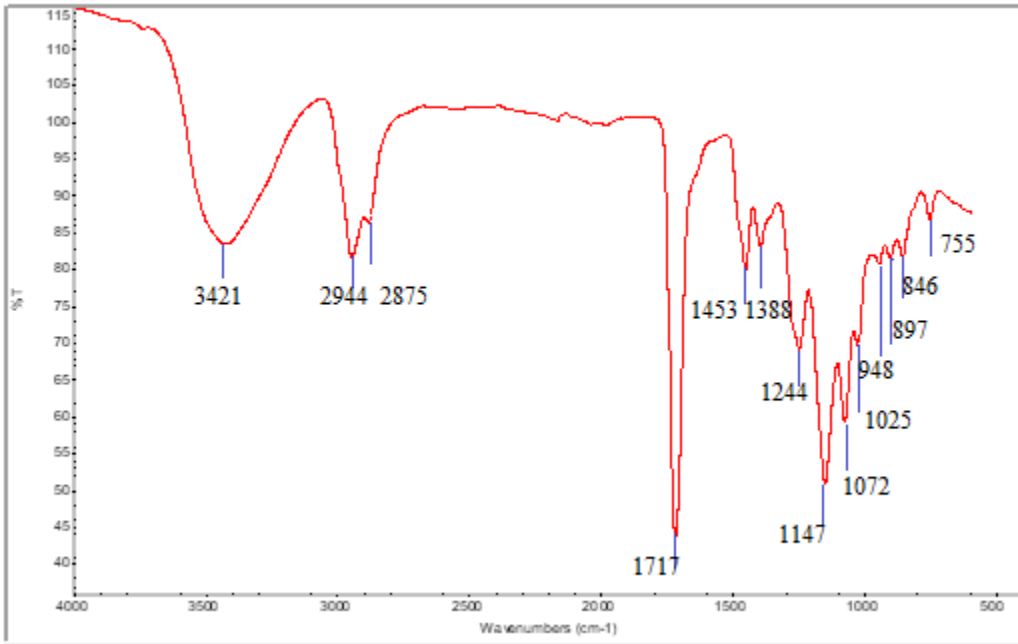


Şekil 4.6. Çalışma kapsamında sentezlenen PHEMA temelli kriyojellerin optik fotoğrafları. (a) Kriyojellerin şişmiş ve kuru görüntüleri (b) PHEMA ve PHEMA/GEL kriyojellerin ıslak görüntüleri ve (c) PHEMAH ve PHEMAH/GEL kriyojellerin ıslak görüntüleri (d) Aynı boyutlarda hazırlanan PHEMA kriyojellerin şişmiş ve sıkılmış görüntüleri.

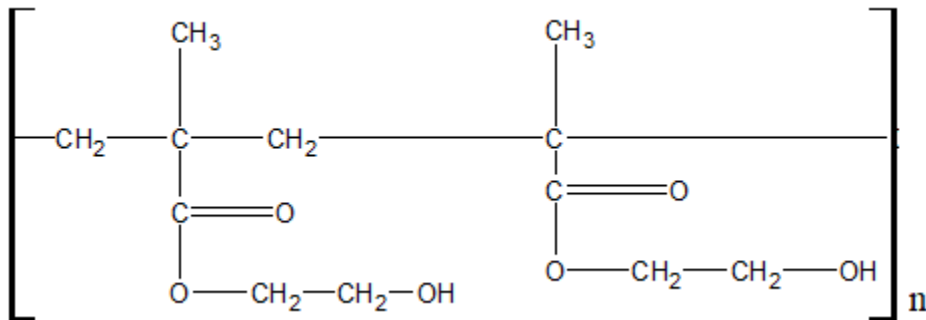
4.1.2. FTIR Analizi

MAH komonomeri ve jelatin ile fonksiyon kazandırılması hedeflenen PHEMA temelli kriyojellerin yapısına MAH ve jelatinin katılıp katılmadığını göstermek için PHEMA, PHEMA/GEL, PHEMAH ve PHEMAH/GEL kriyojellerin infrared spektrumları alınmıştır. Bu spektrumlara otomatik zemin düzeltme ve spektrum düzgünleştirme işlemleri uygulanmış ve bu spektrumlar sırasıyla Şekil 4.7, Şekil 4.9, Şekil 4.11 ve Şekil 4.13'de gösterilmiştir.

Şekil 4.7’da verilen PHEMA kriyojelin infrared spektrumu incelendiğinde PHEMA için karakteristik olan bantlar 3421 cm^{-1} ’de (O-H gerilme), 1717 cm^{-1} ’de (C=O gerilme), $1244 - 846\text{ cm}^{-1}$ (C-O ve C-O-C gerilme frekansları) aralığında görülmektedir. Literatür bilgilerine göre çapraz bağlayıcı olarak kullanılan PEGDA’dan kaynaklı bantlardan C=O ve C-H gerilme frekansları sırasıyla 1717 cm^{-1} ’de ve 2875 cm^{-1} ’de görülmektedir [117]. PHEMA kriyojelin kimyasal yapısı Şekil 4.8’de verilmiştir.



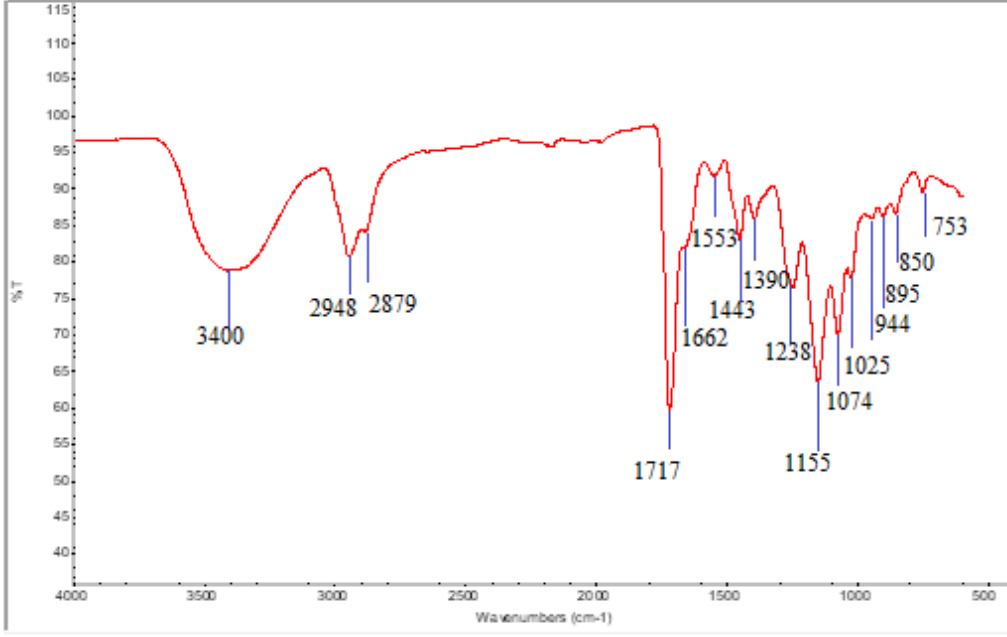
Şekil 4.7. PHEMA kriyojelin FTIR spektrumu



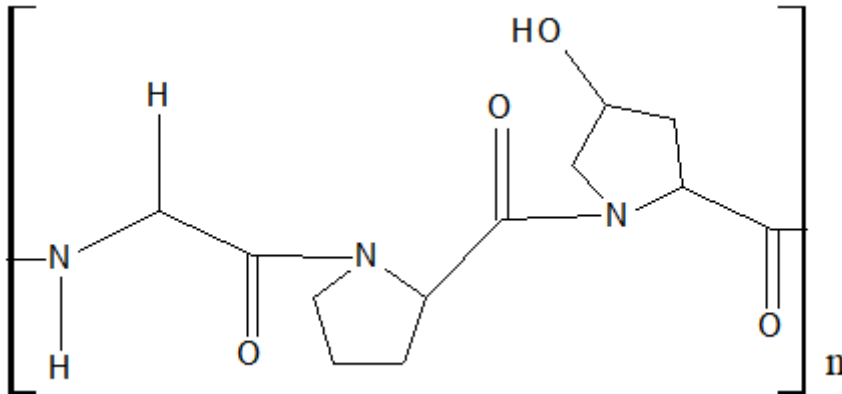
Şekil 4.8. PHEMA kriyojelin yapısı

Şekil 4.9’da verilen PHEMA/GEL kriyojelin infrared spektrumunu incelediğimiz zaman PHEMA kriyojelden farklı olarak jelatine özgü amid I bandı 1662 cm^{-1} ’de (C=O gerilme),

amid II bantları 1533 cm^{-1} 'de (C-N gerilme ile çift eğilme) ve (CH_2 eğilme frekansı) 1443 cm^{-1} 'de görülmektedir. Bu verilen bantların literatürde yer alan çalışmalarla uyumlu olduğu bulunmuştur [118]. Jelatin ve PHEMA'dan kaynaklı amid III bantları 1244 cm^{-1} 'de ve 1074 cm^{-1} 'de (N-H eğilme ve C-O gerilme) görülmektedir. Amid I, II ve III bantlarının varlığı, jelatinin başarılı bir şekilde PHEMA/GEL kriyojelin yapısına katıldığını göstermektedir. Jelatinin kimyasal yapısı ise Şekil 4.10'de verilmiştir.

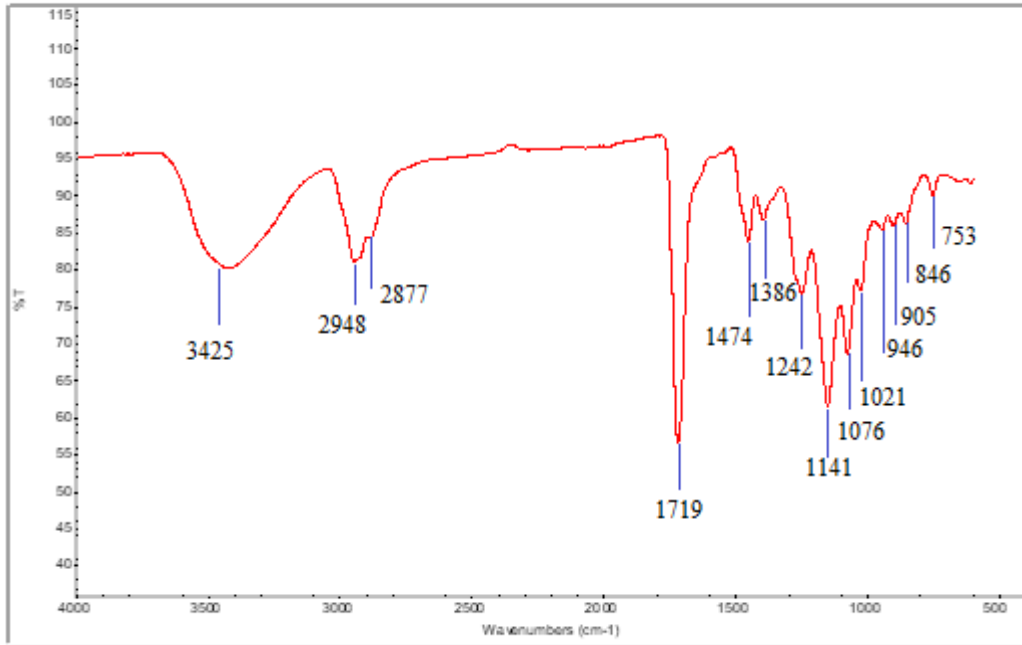


Şekil 4.9. PHEMA/GEL kriyojelin FTIR spektrumu

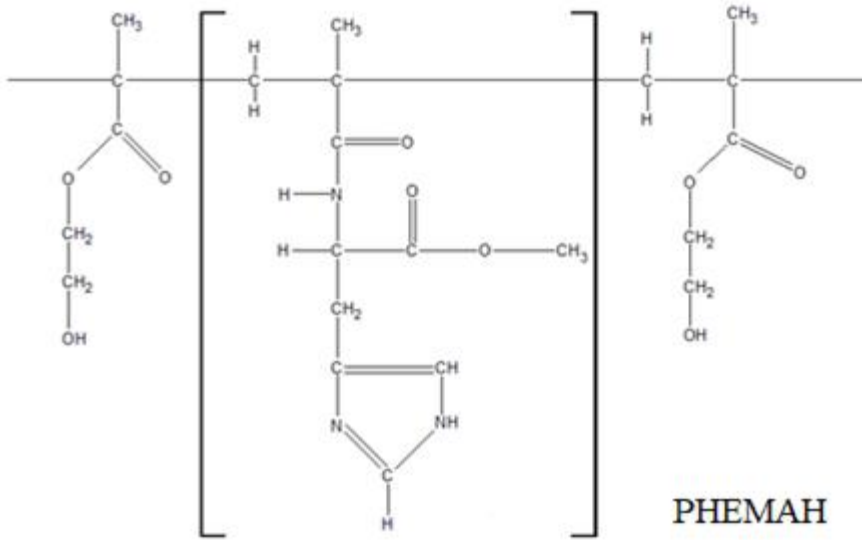


Şekil 4.10. Jelatinin kimyasal yapısı

Şekil 4.11’de verilen PHEMAH kriyojelin infrared spektrumu incelendiğinde literatürde verilen bilgilerle uyumlu olarak MAH monomerinde görülmesi beklenen bantlar 3425 cm^{-1} ’de (O-H gerilme), 1719 cm^{-1} ’de (C=O gerilme) ve 1141 cm^{-1} ’de (halka yapısından kaynaklı C-O gerilme frekansı) görülmektedir [119]. Bu görülen bantlar ayrıca PHEMA kriyojelde görülen bantlardandır. PHEMAH kriyojelin kimyasal yapısı Şekil 4.15’de verilmiştir. Literatürde yer alan çalışmayla uyumlu olarak PHEMAH kriyojelin yukarıdaki bantları vermesi beklenen bir durumdur [120]. Bu uyumlulukla birlikte MAH komonomerinin PHEMAH kriyojel yapısına katıldığı söylenebilir. PHEMAH kriyojelin olası kimyasal yapısı 4.12’de gösterilmiştir.

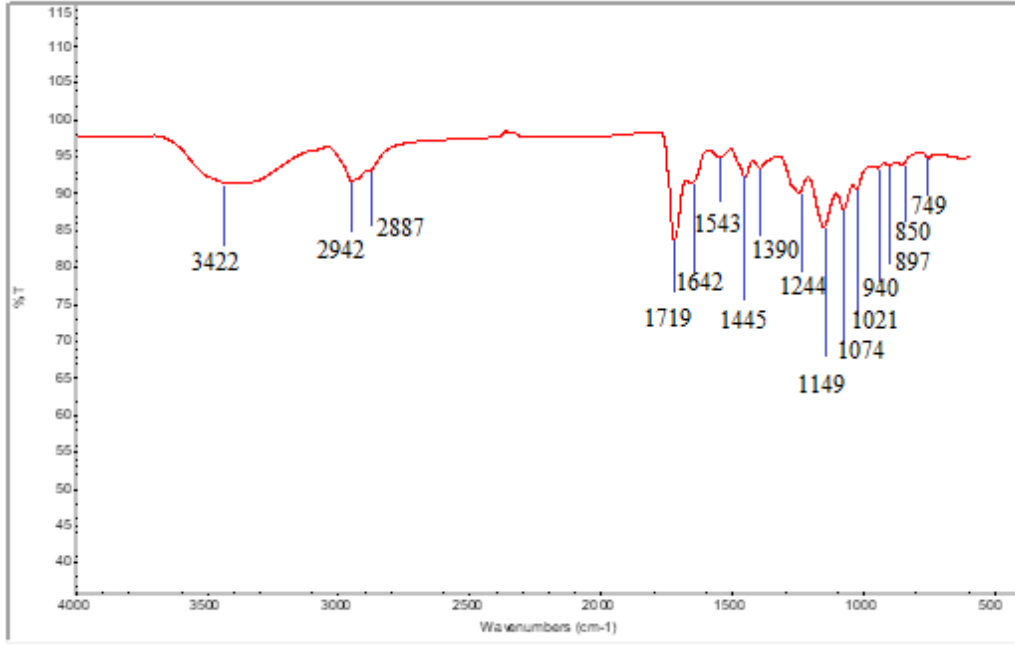


Şekil 4.11. PHEMAH kriyojelin FTIR spektrumu



Şekil 4.12. PHEMAH kriyojelin olası kimyasal yapısı.

Bu tez kapsamında asıl hedef olarak hazırlanan MAH ve jelatinin birlikte bulunduğu PHEMAH/GEL kriyojeller için Şekil 4.13’de verilen infrared spektrumu incelendiği zaman; jelatinden kaynaklı amid I (C=O gerilme) ve amid II bantları 1642 cm^{-1} ’de (C-N gerilme ile çift N-H eğilme) ve 1543 cm^{-1} ’de (CH_2 eğilme) ve amid III bantları 1244 cm^{-1} ’de ve 1074 cm^{-1} ’de (N-H eğilme ve C-O gerilme) görülmektedir (Şekil 4.12). PHEMAH kriyojelin yapısından kaynaklı bantlar olan 3422 cm^{-1} ’de (O-H gerilme), 1719 cm^{-1} ’de (C=O gerilme) ve 1149 cm^{-1} ’de (halka yapısından kaynaklı C-O gerilme frekansı) görülmesiyle birlikte, MAH komonomeri ve jelatin ile polimerizasyon esnasında fonksiyon kazandırılmak istenen PHEMAH/GEL kriyojelin başarıyla sentezlendiği sonucuna varılmıştır.

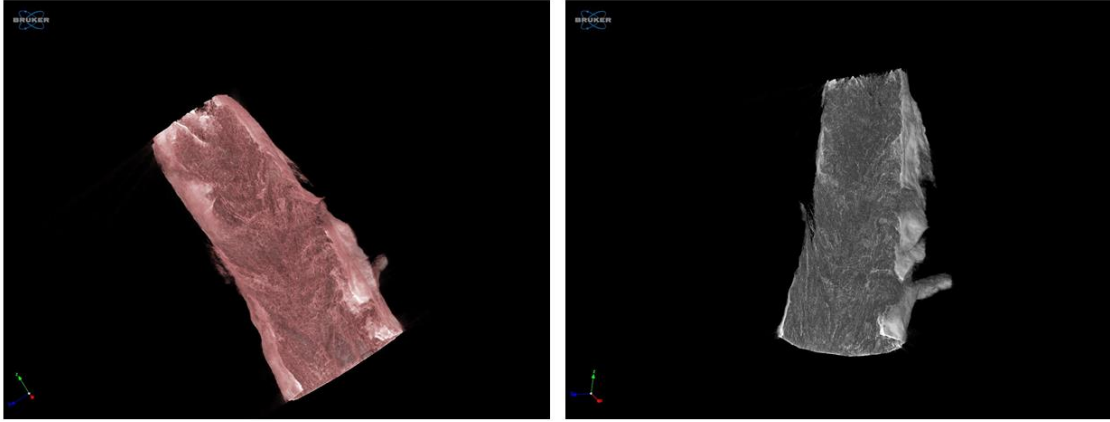


Şekil 4.13. PHEMAH/GEL kriyojelin FTIR spektrumu

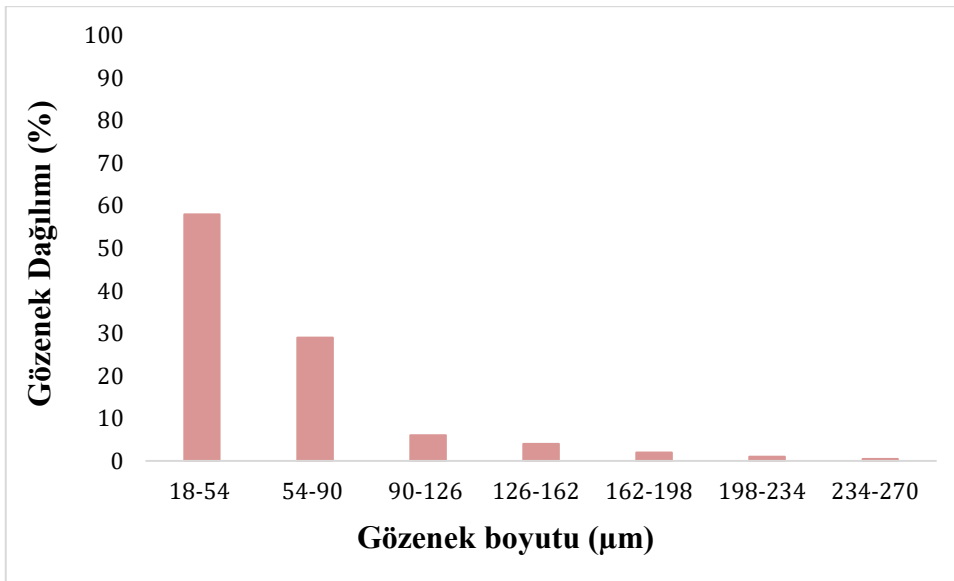
4.1.3. Mikro-CT analizi sonuçları

İdeal doku iskelesinin oluşturulabilmesi için en önemli parametrelerden biri olan gözeneklerin durumu; makrogözeneklilik derecesi ve SEM analizi ile ortaya konulmasına rağmen gözeneklerin dağılımı ve gözeneklerin boyutu Micro-CT analizi sonucunda netlik kazanmıştır. Şekil 4.14’da PHEMAH/0.2GEL kriyojelin mikro-CT görüntüleri verilmiştir. Analiz için hazırlanan kriyojelin uzunluğu 21mm, çapı ise 6mm’dir. Micro-CT analizde örnekten iki boyutlu görüntüler elde edebilmek için X-ray ışınlarını kullanır. Bu iki boyutlu görüntüler 3 boyutlu yapı oluşturabilmek için CT Analyser (SkyScan 1272, Versiyon: 1.18.4.0) yazılımına yüklenmiş, gözenek boyutu ve bu gözeneklerin dağılımı hesaplanmıştır. Analiz sonucunda MAH ve jelatin içeren PHEMAH/0.2GEL kriyojelin gözenek yüzdesinin 80.13 olduğu, toplam nesnenin hacminin ise %20 olduğu bulunmuştur. Şekil 4.15’de kriyojellerin gözenek boyutunun yüzde olarak dağılımı verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere hazırlanan PHEMAH/0.2GEL’in gözenek boyutu 18-270 μm arasında değişmektedir. Ancak bu dağılıma bakıldığında 18-90 μm boyutundaki gözeneklerin yoğun olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar daha önce literatürde jelatin içeren PHEMA kriyojeller için yapılan micro-CT analizi sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir [116]. Bu sonuçlar ışığında MAH’ın yapıya katılmasının

gözenek boyutu ve dağılımı üzerinde değişikliğe sebep olmadığı, gözenek boyutunun korunmasını sağladığı saptanmıştır.



Şekil 4.14. PHEMAH/0.2GEL kriyojelin mikro-CT görüntüleri.

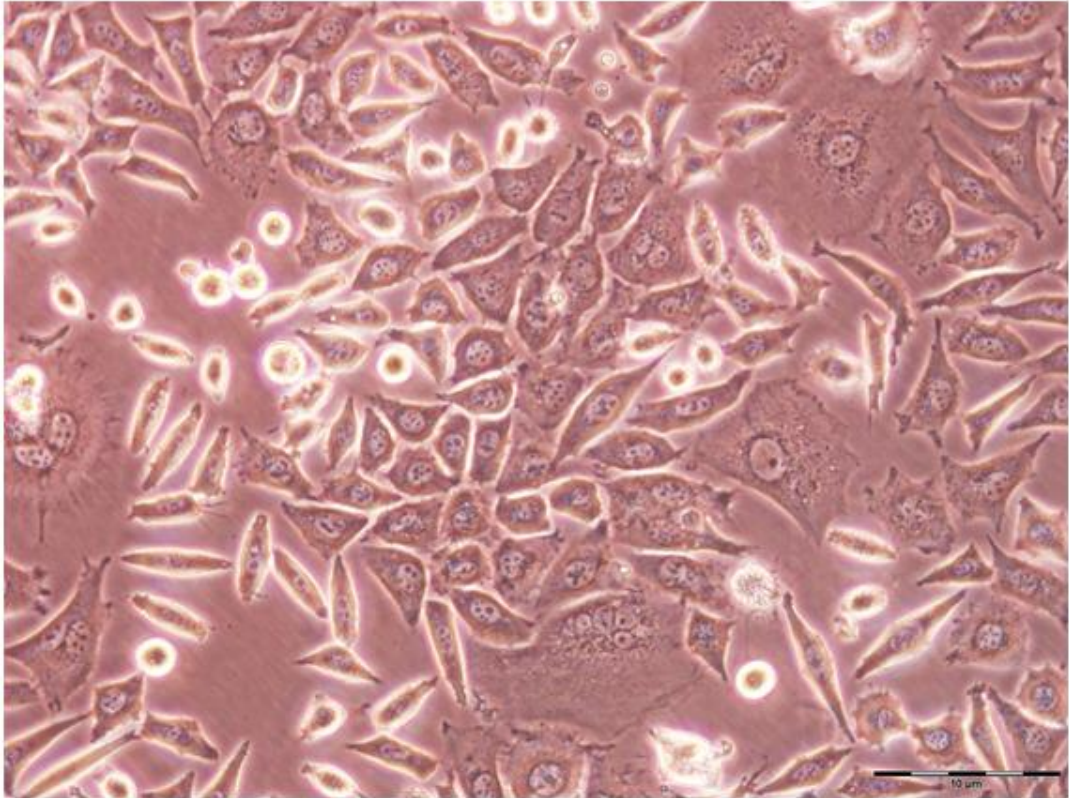
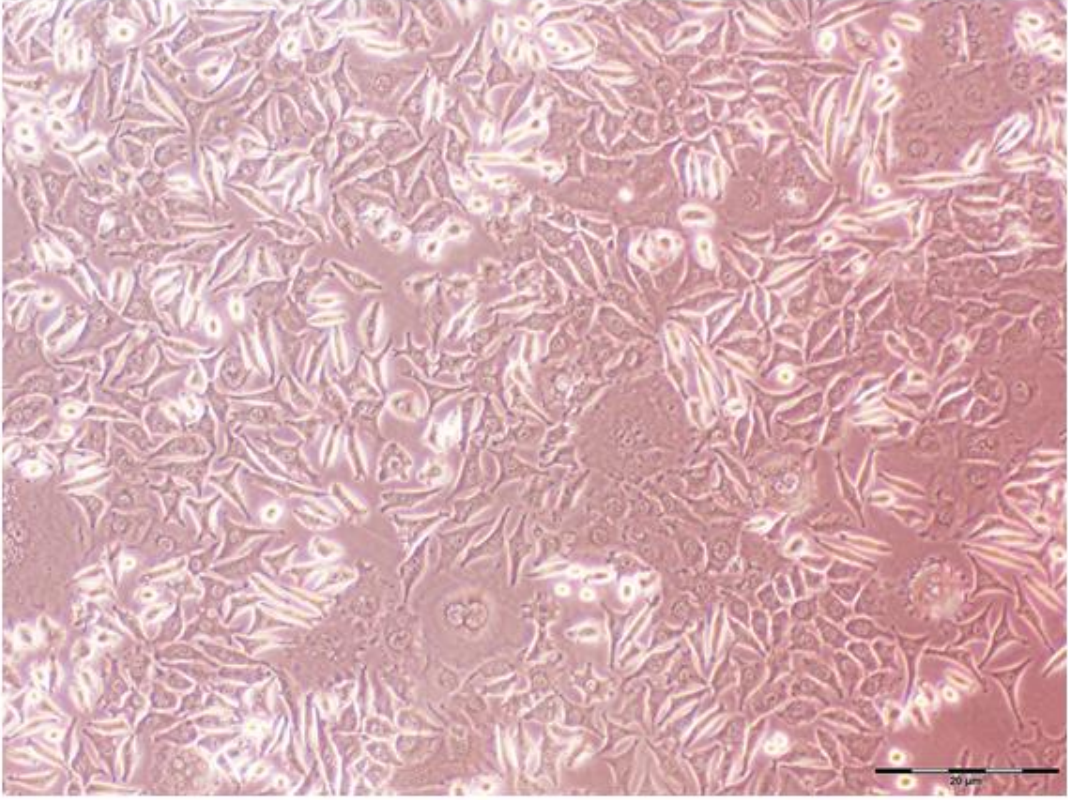


Şekil 4.15. MAH komonomeri ve jelatin içeren PHEMA/0.2GEL kriyojelin gözenek boyutunun yüzde olarak dağılımı grafiği.

4.2. MTT analizi sonuçları

PHEMA kriyojel tek başına doku iskelesi olarak kullanıldığı zaman hücrelerin tutunabilmesi için yeterli tüm yüzey özelliklerine sahip değildir [50]. Ancak birbirleriyle bağlantılı geniş gözenekleri, mekanik olarak dayanıklı ve esnek oluşu, biyoyumlu oluşu, durağan oluşu ve canlı dokulara benzer şekilde yüksek düzeyde su tutabilme özelliği

PHEMA temelli kriyojelin bu çalışmada kullanılmasını avantajlı kılmıştır. Bu çalışmada jelatin ve MAH komonomeri içerecek şekilde PHEMA temelli kriyojeller hazırlanarak, jelatinde bulunan RGD dizisi amino asitlerinin ve MAH'ın yapısında yer alan histidin amino asidinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmada kriyojellere L929 fare fibroblast hücrelerinin ekimi yapılmıştır. L929 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü Şekil 4.16'da yer almaktadır.



Şekil 4.16. Çalışmada kullanılan L929 fibroblast hücrelerinin 10X ve 20X büyütme ışık mikroskobu görüntüleri.

MTT analizinin amacı hücrelerin canlılıklarını, mitokondrilerinde bulunan mitokondrial dehidrogenaz enziminin aktivitesi ile orantılı olarak ölçmektir. Canlı hücrelerde devam eden mitokondrial aktivite sayesinde formazan kristalleri meydana gelir [113]. Bu formazan kristalleri DMSO ve amonyak içinde çözününce hücre canlılığıyla orantılı yoğunlukta mor renk oluşturur. MTT analizi sonuçları mikropalak okuyucuda (BIOTECH, μ Quant) 550 nm’de alınmıştır. Hazırlanmış olan PHEMA, PHEMA/GEL, PHEMAH ve PHEMAH/GEL kriyojeller için 24 ve 48. saatlerde MTT analizi yapılmıştır. Bu analizde kontrol grubu olarak PHEMA kriyojel seçilmiştir. PHEMA kriyojel, jelatin ve MAH ile fonksiyon kazandırılmış PHEMA/GEL, PHEMAH ve PHEMAH/GEL kriyojeller ile karşılaştırılmıştır. Hazırlanan kriyojellerin kontrol grubuna oranla yüzde hücre canlılıkları 24 ve 48 saat için birlikte Şekil 4.17’da gösterilmiştir. Yapılan MTT analizi sonuçlarına göre PHEMA kriyojel ile karşılaştırıldığında 24 ve 48 saat için diğer tüm kriyojellerin hücre canlılık yüzdelerinin PHEMA kriyojelin üzerinde olduğu görülmüştür.

Sadece jelatin içeren PHEMA/GEL kriyojellerin (PHEMA/0.1GEL, PHEMA/0.2GEL ve PHEMA/0.4GEL) 24 saat sonundaki MTT analiz sonuçları incelendiğinde hücre canlılığının jelatin oranına bağlı olarak yükseldiği görülmektedir. Jelatin biyoaktif sekans olarak bilinen RGD sekansını içermektedir. Bu sekansın bulunduğu malzemelerin hücre yayılmasını ve tutunmasını arttırdığı literatürde yer alan çalışmalarda gösterilmiştir [121]. Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen MTT analizi sonuçlarına göre jelatin içeren kriyojellerin RGD sekansını bulundurması sayesinde jelatin miktarıyla orantılı olarak hücre tutunmasının ve çoğalmasının arttığı gözlenmiştir.

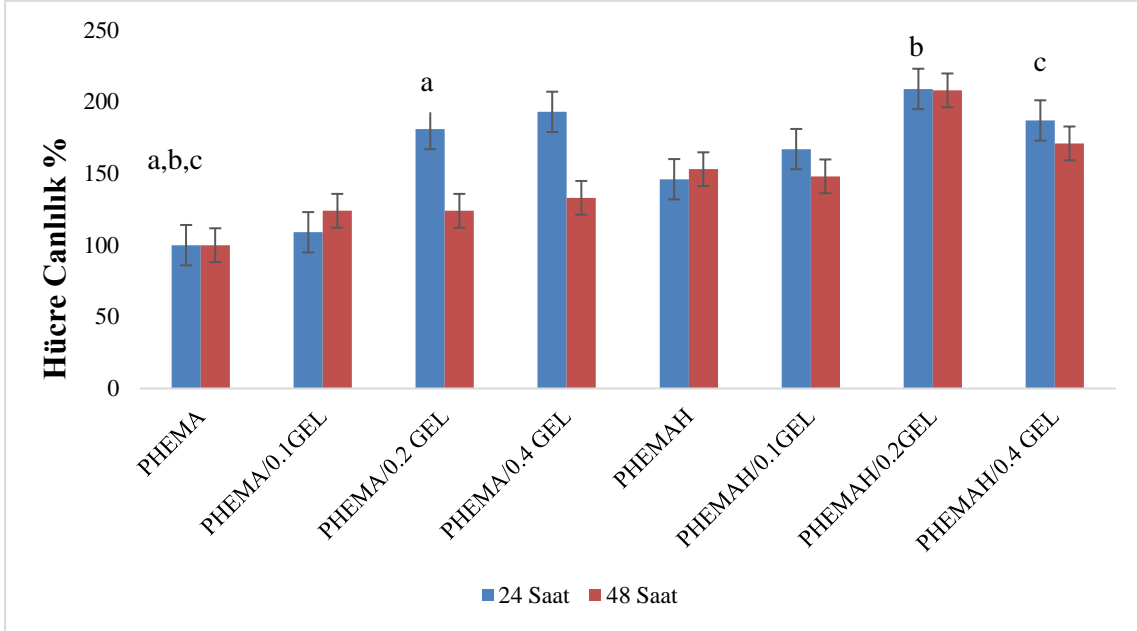
Jelatin ve MAH içeren PHEMAH/GEL kriyojellerin (PHEMAH/0.1GEL, PHEMAH/0.2GEL ve PHEMAH/0.4GEL) MTT analizi sonuçları incelendiğinde sadece jelatin içeren PHEMA/GEL kriyojellerde olduğu gibi hücre canlılığında jelatin miktarıyla orantılı artışa rastlanmamıştır. Sadece jelatin bulunduran PHEMA/GEL kriyojellerde, PHEMA’yı fonksiyonlandırma görevinde tek faktör jelatindir. MAH içeren PHEMAH/GEL kriyojellerde ise iki fonksiyon kazandırıcı birlikte görev yapmaktadır. En uygun oranda MAH ve jelatin içeren kriyojelin hücre çoğalması için en iyi sonucu vermesi beklenmektedir. Elde edilen sonuçlara göre hücre tutunması ve çoğalması için en uygun bileşime sahip kriyojel PHEMAH/0.2GEL olarak bulunmuştur. Genel olarak

MAH içeren PHEMAH kriyojellerin 24 ve 48 saat hücre canlılık yüzdelerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir. Buna göre MAH içerisinde bulunan histidin amino asidinin hücrelerin canlı kalmaları üzerinde olumlu bir etkisinin olduğu sonucuna varılabilir. Daha önce literatürde verilen bilgiler ışığında dokuların büyümesinde önemli rol oynadığı bilinen histidin amino asidinin hücre canlılığı üzerindeki arttırıcı etkisi beklenen bir durumdur [107]. Literatürde PHEMA, MAH ve jelatinin bir araya getirilmesiyle yapılan bir malzeme bulunmamıştır. PHEMA ve MAH kullanılarak yapılan PHEMAH kriyojeller; jelatin ve PHEMA'dan yapılan PHEMA/GEL kriyojeller literatürde yer almaktadır [121,122]. Literatürde yer alan bir çalışmada farklı bir amino asit ve jelatin ile doku iskelesi yapımı gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada amino asit olarak glutamik asit seçilmiştir. Çalışma sonucunda amino asit türevli bu doku iskelesinin bizim hazırladığımız amino asit türevli kriyojel gibi biyoyumlu ve doku iskelesi olarak kullanılabilir olduğu bulunmuştur [105].

Jelatin ve MAH komonomeri içeren PHEMAH/GEL kriyojeller PHEMA/GEL kriyojeller ile karşılaştırıldığında 24 ve 48 saat için hücre canlılıklarının PHEMAH/GEL kriyojellerde daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum histidin amino asidinin yukarıda bahsedildiği gibi hücre canlılığını arttırıcı etkisinden kaynaklanmıştır. PHEMA/0.1GEL ve PHEMAH/0.1GEL kriyojellerin MTT sonuçları değerlendirildiğinde MAH içeren PHEMAH/0.1GEL kriyojelin 24 ve 48 saat için daha yüksek yüzde canlılığa sahip olduğu görülmüştür. PHEMA/0.2GEL ve PHEMAH/0.2GEL kriyojellerin MTT sonuçları incelendiğinde MAH içeren PHEMAH/0.2GEL kriyojel için 24 ve 48 saat yüzde canlılık sonuçları çok daha yüksektir. PHEMA/0.4GEL ve PHEMAH/0.4GEL kriyojellerin MTT sonuçlarını karşılaştırdığımızda 24 saat sonuçlarına göre iki kriyojelin yüzde canlılığı neredeyse eşit olmakla birlikte, 48 saat sonuçlarında PHEMA/0.4GEL kriyojel için hücre canlılığında bir düşüş gözlenmiştir.

Yapılan MTT analizi sonucunda MAH komonomeri ve jelatin eklenmesiyle hazırlanan kriyojellerin (PHEMA/GEL, PHEMAH, PHEMAH/GEL) biyoyumlu oldukları bulunmuştur. En yüksek hücre canlılığı PHEMAH/0.2GEL'de görülmüştür. PHEMAH/0.2GEL kriyojelde 24 ve 48 saat hücre canlılık değerlerinde düşüş

görülmemesi sentezlenen diğer kriyojeller arasından doku iskelesi olarak kullanılabilir en uygun bileşimdeki kriyojel olmasını sağlamıştır.



Şekil 4.17. 24 saat ve 48 saat MTT analizi sonuçları. PHEMA kriyojel kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, istatistiksel olarak anlamlı farklılık $n=6$ ve $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir. Harfler 24 saat için anlamlı farklılığı ifade etmektedir: a, PHEMA ve PHEMA/02GEL; b, PHEMA ve PHEMAH/0.2GEL; c, PHEMA ve PHEMAH/04.GEL

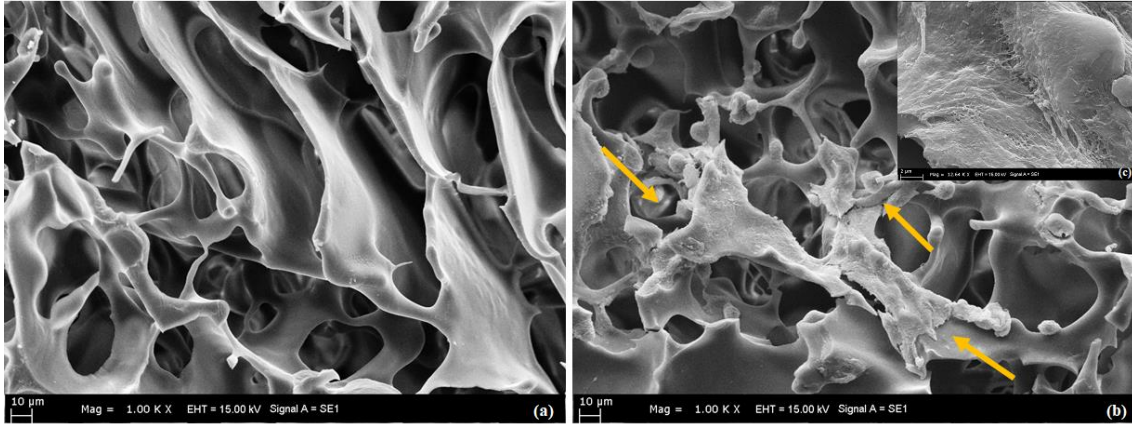
4.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri

Literatür bilgilerine dayanarak fibroblast hücrelerinin boyutlarının 10-100µm arasında değiştiği bilinmektedir [124]. Fibroblast hücrelerinin Şekil 4.16'da verilen ışık mikroskobu görüntülerinde ölçek dikkate alındığında literatür bilgileriyle uyumlu boyutta hücrelerin üretildiği görülmüştür. Kriyojellerin gözenek boyutunun yapılan mikro-ct analizi sonucuna göre 18-270 µm arasında değiştiği ve yoğunluklu olarak 18-90 µm arasında olduğu micro-ct analizi sonucunda bulunmuştur. Hücre boyu ve gözenek boyutu arasındaki uyumun hücre tutunmasını doğrudan etkilediği düşünülmektedir. Fibroblast hücreleri kendi ECM'sini salgılayabilen bir hücre tipidir. Bu çalışmada verilen literatür bilgisi ışığında SEM görüntüleri incelendiğinde kriyojel üzerine ekilmiş hücrelerin 48 saat inkübasyonu sonucunda ECM benzeri uzantılar yaptıkları görülmüştür [125].

Doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmak üzere tasarlanan doku iskelelerinin üzerine hücreler ekildiği zaman hücrelerin doku iskelelerine tutunmaları ve burada çoğalmaları beklenmektedir. Bu işlevleri yerine getirebilmesi için doku iskelelerinin birbirleriyle bağlantılı ve geniş gözenekler içermesi gerekir [126]. Bu tez çalışması kapsamında hazırlanan kriyojellerin SEM analizi öncelikli olarak yüzey ve yığın yapılarının karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirilmiştir. SEM analizi ayrıca hücre çoğalması ve tutunmasının gözlenmesi amacı için de uygulanmıştır. Hücre ekimi yapılmış kriyojeller ile karşılaştırma yapabilmek ve hücreleri daha iyi ayırabilmek için hücre ekimi yapılmamış (hücresiz) kriyojeller bu başlık altında birlikte verilmiştir.

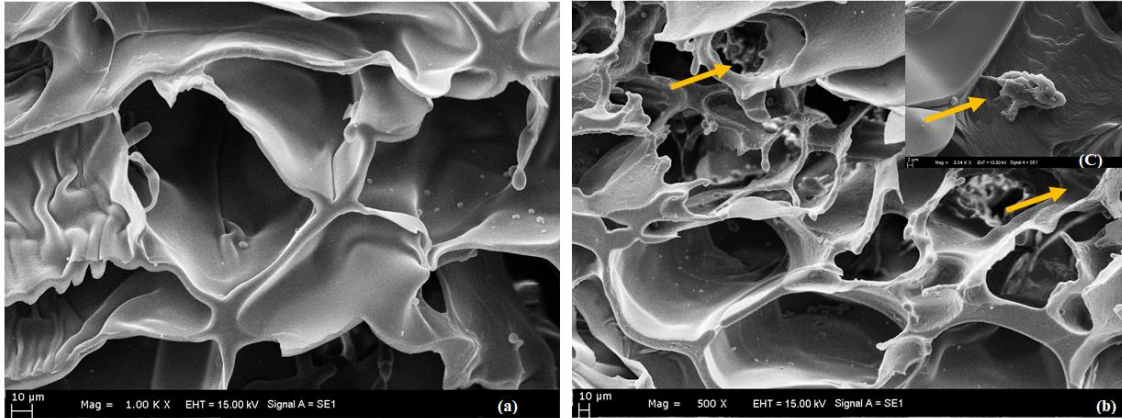
Hazırlanan kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanılabilirliği açısından SEM görüntülerinin değerlendirilmesi önemli bir parametredir. Hazırlanan biyomalzemenin doku iskelesi olarak kullanılabilmesi için üzerinde hücrelerin tutunabileceği uygun yüzey özelliklerine ve yüzey alanına sahip olması, tutunan hücrelerin burada çoğalabilmesi, yayılabilmesi ve burada canlılıklarını sürdürebilmesi ve ilerleyen günlerde ECM bileşenlerini salgılayabilmesi gereklidir [127].

Şekil 4.18’de PHEMA kriyojele ait hücresiz ve hücre ekimi yapılmış kriyojellerin SEM görüntüleri mevcuttur. Bu görüntülerden yola çıkılarak hücresiz kriyojelin yüzey yapısının ve gözenek durumuna bakılarak başarıyla sentezlendiği görülmektedir. Hücreli kriyojele baktığımızda, MTT analizi sonucunda olduğu gibi hücrelerin beklenenin üzerinde PHEMA kriyojelin gözeneklerine başarılı bir şekilde tutunduğu, bazı yerlerde gözenek duvarını tamamen kapladığı ve burada yayılım gösterdiği görülmektedir. Bu başarı PEGDA’nın yüksek biyouyumlu yapısından ve literatür bilgileriyle uyumlu olarak PEGDA ile hazırlanmış PHEMA kriyojellerin daha pürüzlü yüzeye sahip olup hücre tutunmasını kolaylaştırmasından kaynaklanmaktadır [105].



Şekil 4.18. PHEMA kriyojellerin hüresiz (a) ve hücreli 48 saat için (b,c) SEM fotoğrafları: a ve b) 1,000 X, bar 10µm; c) 12,64 X, bar 2µm.

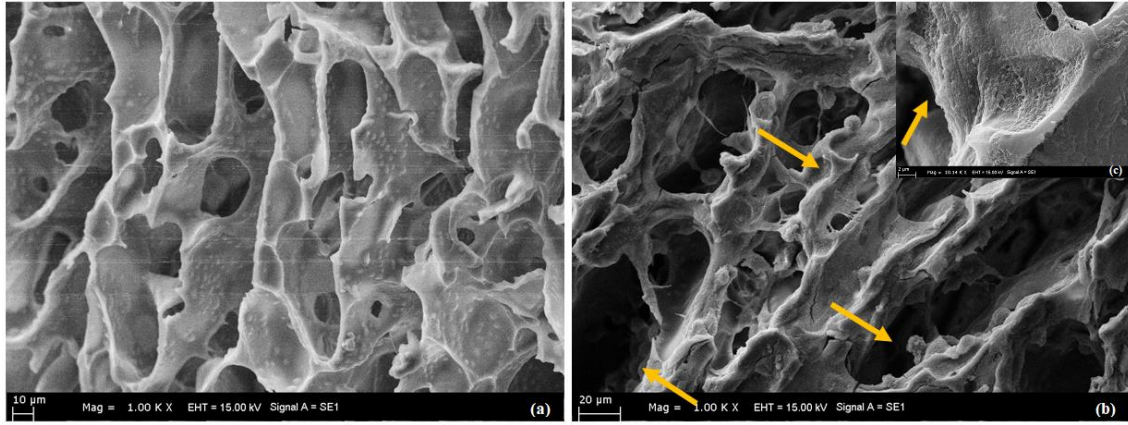
PHEMA/0.4GEL kriyojele ait SEM görüntüleri Şekil 4.19’da verilmiştir. Bu görüntülerden yola çıkarak PHEMA/04GEL için hücre tutunmasının ve dağılımının daha az olduğunu, hücreleri göstermek için eklenen sarı oklar yönüne bakarak hücrelerin gözeneklerin arka taraflarında kaldığı ve çok fazla yayılmadığını söyleyebiliriz. Bu kriyojel grubu için gözlenen az tutunma MTT analizi sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.



Şekil 4.19. PHEMA/0.2GEL kriyojellerin hüresiz (a) ve hücreli 48 saat için (b,c) SEM fotoğrafları: a) 1,000 X, bar 10µ; b) 1,000 X, bar 10µm 10 c) 3,040 X, bar 2µm.

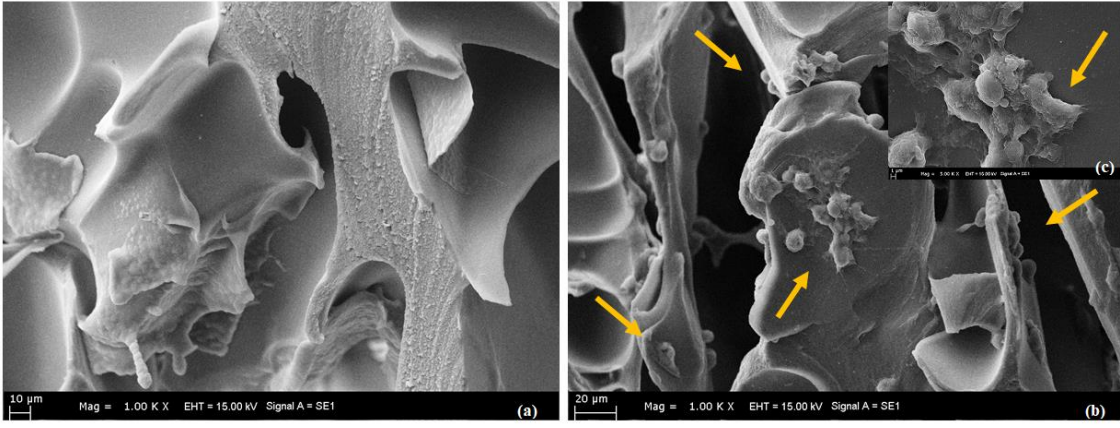
Şekil 4.20’de verilen PHEMAH kriyojel için alınan SEM görüntüleri incelendiğinde hüresiz kriyojelin yapısının ve gözenek bağlantılarının iyi olduğu görülmektedir. Hücreli kriyojeli incelediğimizde, hücrelerin PHEMAH kriyojellerin yüzeyine oldukça yoğun bir

şekilde tutundukları ve burada yayıldıkları görülmektedir. MTT analizi sonuçları PHEMAH için incelendiği zaman 24 saate göre 48. saatte artış gözlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak MAH monomerinde yer alan histidin amino asidinin hücre canlılığı ve tutunması üzerinde artırıcı etkisi olduğuna ve literatür bilgileriyle uyumlu olarak MAH monomerinin oldukça biyoyumlu olması sayesinde [110], PHEMAH kriyojelin doku mühendisliğinde doku iskelesi olarak kullanılabilen biyoyumlulukta bir malzeme olduğu sonucuna varılabilir.



Şekil 4.20. PHEMAH kriyojellerin hücrelessiz (a) ve hücreli 48 saat için (b,c) SEM fotoğrafları: a 1,000 X, bar 10µ; b) 1,000 X, bar 20µm 10 c) 10,14 X, bar 2µm.

ECM'nin daha iyi yansıtılabilmesi amacıyla jelatin eklenerek hazırlanmış PHEMAH/0.2GEL için olan SEM görüntüleri Şekil 4.21'de verilmiştir. MTT analizi sonucunda 24 ve 48. saatler için en yüksek hücre canlılığı veren PHEMAH/0.2GEL'in SEM fotoğrafları incelendiğinde; hücrelerin kriyojel yüzeyine tutundukları ve kriyojel gözenekleri etrafında yayılarak kümeler oluşturduğu görülür. Hücrelerin bir alanda yığın yapmasının yerine gözeneklerin etrafında dağılması besin ve oksijene daha kolay ulaşmalarını sağlar. Temel hedef olarak MAH komonomeri ve jelatin eklenerek hazırlanan PHEMA temelli kriyojelin doku iskelesi olarak kullanılabilirliğinin araştırıldığı bu tez çalışmasında yapılan analizler sonucunda en uygun yüzey özelliklerine ve kimyasal bileşime sahip kriyojel olarak PHEMAH/0.2GEL seçilmiştir.



Şekil 4.21. PHEMAH kriyojellerin hüresiz (a) ve hücreli 48 saat için (b,c) SEM fotoğrafları: a 1,000 X, bar 10µ; b) 1,000 X, bar 20µm 10 c) 5,000 X, bar 1µm.

5. YORUM

- Bu tez çalışması kapsamında hazırlanan PHEMA temelli kriyojeller sınıfının altındaki sıcaklıklarda dondur çöz tekniğiyle sentezlenmişlerdir. Kriyojellerin geniş ve bağlantılı gözenekler içermesi, yapımının hızlı ve kolay olması, yapımında kullanılan gözenek yapıcı ve çözücü maddelerin toksik olmayışı, çapraz bağlayıcı miktarına ve sıcaklığa göre ayarlanabilen gözenek büyüklüğüne sahip olması, biyouyumlu olması ve kontrollü biyobozunur olması gibi avantajları bir arada bulundurması bu çalışmada doku iskelesi olarak kullanılmalarını vazgeçilmez hale getirmiştir.
- PHEMA temelli kriyojeller geniş ve birbirleriyle bağlantılı gözeneklere sahip, biyouyumlu, mekanik olarak dayanıklı, esnek ve kimyasal olarak stabil yapıda polimerlerdir. İnert yapıda olmaları sebebiyle dışarıyla etkileşime girmezler ve bu özellikleri sayesinde immün yanıt oluşturmazlar. PHEMA kriyojel proteinlerle özgül etkileşimlere girmemesi sayesinde kromatografi alanında oldukça kullanışlı olmasına rağmen bu özellik yüzeyine hücre tutunması için uygun ortam sağlamaz. Sunulan tez çalışmasında PHEMA kriyojelin sahip olduğu olumlu özelliklerden yararlanmanın yanı sıra, PHEMA temelli kriyojelleri hücreler için daha uygun yüzeyler haline getirmek için polimerizasyon aşamasında çapraz bağlayıcı olarak PEGDA, MAH komonomeri ve farklı oranlarda jelatin kullanılmıştır. Dört farklı özellikte sekiz kriyojel grubu sentezlenmiştir. Bu kriyojeller PHEMA, PHEMA/GEL, PHEMAH ve PHEMAH/GEL olarak adlandırılmıştır. Jelatin içeren kriyojeller farklı oranlarda jelatin içerecek şekilde hazırlanmış, hücre çoğalması ve tutunması için en uygun bileşime sahip kriyojel doku iskelesinin bulunması amaçlanmıştır.
- Çalışmamızda PHEMA temelli kriyojellere MAH komonomeri ve jelatin ile fonksiyonellik kazandırma işlemi polimerizasyon esnasında gerçekleştirildiği için, ekstra aktivasyon ve ligand bağlama basamaklarına ihtiyaç duyulmamıştır. Böylece bu işlemler için gerekli toksik kimyasallar kullanılmamış ve zamandan tasarruf edilmiştir.
- Sentezlenen kriyojellerin karakterizasyon çalışmaları için şişme deneyleri, FTIR, micro-CT, ve SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. PHEMA temelli kriyojellerin

sentezinde kullanılan monomerlerle birlikte çapraz bağlayıcı olarak kullanılan PEGDA'nın da hidrofilik yapıda olması sayesinde, PHEMA temelli kriyojeller genel olarak yüksek şişme oranı ve şişme derecesi göstermişlerdir. Şişme deneylerinde artan jelatin oranının şişme özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Deneyler sonucunda jelatin oranının arttığı kriyojellerde makrogözeneklilik derecesinde düşüş gözlenmiştir. PHEMA kriyojel için makrogözeneklilik derecesi %85 olarak, en yüksek jelatin oranına sahip PHEMA/0.4GEL için makrogözeneklilik derecesi ise %61 olarak bulunmuştur. MAH komonomeri ile hazırlanmış PHEMAH kriyojelin ise %83, PHEMAH/0.4GEL'in ise %70 makrogözeneklilik derecesine sahip olduğu bulunmuştur. PHEMAH ile ilgili literatürde yer alan bir çalışmada çapraz bağlayıcı olarak metilen bisakrilamid kullanılmış ve makrogözeneklilik derecesi %74.6 olarak bulunmuştur [128]. Bizim çalışmamızda çapraz bağlayıcı olarak PEGDA'nın kullanılması daha yüksek bir sonucun alınmasını sağlamıştır. Ayrıca MAH içeren kriyojellerin makrogözeneklilik derecelerinin genel olarak daha yüksek olduğu görülmektedir. Jelatin hidrokolloidal bir madde olduğu için gözeneklilikte görülen düşüş kriyojellerin şişme özelliklerinde beklenilenin altında bir düşüşe sebep olmuştur.

- Daha önce literatürde yer alan PEGDA ile hazırlanmış PHEMA jelatin kriyojellerin şişme oranlarının %80'e yakın olduğu bulunmuştur [48]. Bizim çalışmamızda PHEMA/GEL kriyojeller için bu sonuç uyumlu olmakla birlikte PHEMAH/GEL kriyojellerin de bu değere yakın olduğu gözlenmiştir. Bu durumda MAH ile hazırlanan PHEMAH/GEL kriyojellerin şişme özelliklerinin PHEMA/GEL kriyojeller ile benzer olduğu söylenebilir.
- MAH ve jelatin ile fonksiyon kazandırılmanın amaçlandığı bu tez çalışmasında sentezlenen PHEMA temelli kriyojellerin yapısına MAH ve jelatinin katıldığını belirlemek amacıyla PHEMA, PHEMA/GEL, PHEMAH ve PHEMAH/GEL için FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. FTIR sonuçlarına bağlı olarak jelatinin PHEMA/GEL yapısına, MAH komonomerinin PHEMAH yapısına, jelatin ve MAH komonomerinin PHEMAH/GEL kriyojellerin yapısına polimerizasyon esnasında başarıyla katıldıkları sonucuna varılmıştır.

- Hazırlanan kriyojellerin yapılarına katılan MAH ve jelatinin PHEMA temelli kriyojellerin yüzey özelliklerini ve gözenek durumunu nasıl etkilediğini görmek amacıyla SEM görüntüleri alınmıştır. SEM görüntüleri PHEMA, PHEMA/0.4GEL, PHEMAH ve PHEMAH/0.2GEL kriyojeller için alınmıştır. Bu görüntülerden çıkarım yapılarak kriyojellerin başarılı bir şekilde sentezlendiği, gözenek boyutu ve dağılımının beklendiği gibi olduğu görülmüştür. PHEMAH/GEL kriyojelin gözenek boyutu ve dağılımını öğrenmek amacıyla micro-CT analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda MAH komonomeri ve jelatin ile hazırlanmış olan kriyojelin gözenekliliğinin %80.13 olduğu ve gözenek boyutunun 18-270 µm arasında değiştiği ancak yoğunluklu olarak 18-90 µm boyutunda gözenekler içerdiği gözlenmiştir.
- Karakterizasyon çalışmaları sonucunda sentezlenen PHEMA temelli kriyojellerin tümünün gözenek boyutu, gözenek dağılımı, şişme özellikleri ve kimyasal yapı gibi özellikleri bakımından hücre kültür çalışmalarında kullanımları uygun bulunmuştur.
- *In vitro* hücre kültür deneylerinde L929 fare fibroblast hücreleri sahip oldukları hızlı çoğalabilme ve tutunarak büyüme özellikleri sayesinde hazırlanan kriyojellerin biyouyumluluklarının ve doku iskelesi olarak kullanılabilirliklerinin değerlendirilmesi amacıyla tercih edilmişlerdir. 8 mm çapında ve 3 mm kalınlıkta disk şeklinde kesilen kriyojeller üzerine iki aşamada olmak üzere toplamda 1×10^6 hücre ekilmiştir. Hücre ekimi yapılmadan önce kriyojellerin bir gece DMEM besi ortamı içerisinde bekletmenin hücre tutunması bakımından daha etkili sonuç verdiği bulunmuştur.
- Üzerine hücre ekilen kriyojeller 24 ve 48 saat olmak üzere iki farklı sürede inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanan sekiz farklı kriyojelin tamamı için MTT analizi uygulanmıştır. 24 ve 48 saat dolana kadar üzerine hücre ekimi yapılan kriyojeller 37°C'de ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir ve deney tamamlanana kadar besi ortamı değiştirilmemiş, kriyojellerin üzerine ilave herhangi bir madde eklenmemiştir. Bu sürelerin sonunda MTT analizi ile hücre

canlılıkları yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Bu analizin sonucuna göre MAH komonomeri ve jelatin ile fonksiyonlandırılan PHEMAH/GEL kriyojellerden PHEMAH/0.2GEL 24 ve 48 saatler için en yüksek hücre canlılığını vermiştir. MAH komonomeri ve jelatin ile fonksiyon kazandırılmamış PHEMA kriyojellerin beklenenin üzerinde hücre canlılığı gösterdiği görülmüştür. Aynı zamanda PHEMA kriyojellerin SEM görüntüleri incelendiğinde hücrelerin PHEMA kriyojelin yüzeyine beklenene göre daha yoğun tutunduğu görülmektedir. Bu durum çapraz bağlayıcı olarak metilen bisakrilamit yerine yüksek biyoyumlu PEGDA'nın kullanılmasının muhtemel katkısıdır. Ayrıca PEGDA ile hazırlanan PHEMA kriyojellerin yüzeyinin hücre tutunmasına daha elverişli olduğu daha önce literatürde de verilmiştir [105]. Literatürde yer alan bir çalışma PEGDA çapraz bağlayıcısı ile hazırlanmış jelatin içeren PHEMA kriyojellere bizim çalışmamızdan farklı bir hücre ekimi yapılmış ve sonuç olarak hazırlanan malzemenin biyoyumlu olduğu, hücre tutunmasını ve çoğalmasını desteklediği bulunmuştur [48]. Çalışmalar doğrultusunda biyoyumlu ve hücre tutunmasını arttırıcı etkide olduğu bilen jelatin içeren PHEMA kriyojellere [34,37] MAH'ın katılmasının hücre tutunmasını, çoğalmasını ve canlı kalmasını daha fazla arttırdığı bu tez deneyleri sonucunda bulunmuştur.

- Hücre ekimi yapılan kriyojellerden PHEMA, PHEMA/0.4GEL, PHEMAH ve PHEMAH/0.2GEL kriyojellerin 48. saat SEM görüntüleri incelendiğinde MAH komonomeri içeren kriyojellerin içermeyenlere göre hücre tutunması bakımından çok daha başarılı olduğu görülmüştür. SEM görüntüleri MTT analizi sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.
- Bu tez çalışmasında ilk defa MAH'ın komonomer olarak kullanıldığı PHEMAH/GEL kriyojellerin hücre kültür ortamında doku iskelesi olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Tez deneyleri sonucunda MAH'ın literatürde mevcut bilgilerde olduğu gibi hücreler ile biyoyumlu olduğu [110], hücre tutunması ve çoğalması üzerinde arttırıcı etkisinin bulunduğu görülmüştür. MAH komonomeri ve jelatin ile birlikte hazırlanan PHEMAH/GEL kriyojellerin yalnızca jelatin ile hazırlanan PHEMA/GEL kriyojellere oranla hücre tutunması ve çoğalması bakımından daha başarılı sonuçlar verdiği görülmektedir. İleri

çalışmalarda bu hazırlanan kriyojel doku iskeleleri üzerine farklı hücre tiplerinin ekilmesi ile PHEMAH/GEL kriyojellerin doku iskelesi olarak kullanım alanları genişletilebilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] P. Öncel, K. Çetin, A.A. Topçu, H. Yavuz, A. Denizli, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 28 (2017) 519-531.
- [2] S. Muslumova, B. Yetiskin, O. Okay, *Gels.* 5(1) (2019).
- [3] X. Zhao, B. Guo, H. Wu, Y. Liang, P.X. Ma, *Nat. Commun.* 9: 2784 (2018).
- [4] P.C.G. Mól, L.A.A. Veríssimo, L.A. Minim, M. Boscolo, E. Gomes, R. da Silva, *Process Biochem.* 82 (2019) 75-83.
- [5] N. Sahiner, S. Sagbas, M. Sahiner, C. Silan, *Mater. Sci. Eng. C. Part 1:* 70 (2017) (317-326).
- [6] T.H. Qazi, D.J. Mooney, M. Pumberger, S. Geißler, G.N. Duda, *Biomaterials.* 53 (2015) 502-521.
- [7] A.A. Chaudhari, K. Vig, D.R. Baganizi, R. Sahu, S. Dixit, V. Dennis, S.R. Singh, S.R. Pillai, *Int. J. Mol. Sci.* 17(12) (2016).
- [8] J. Li, Y. Wang, L. Zhang, Z. Xu, H. Dai, W. Wu, *ACS Sustainable. Chem. Eng.* 7 (2019) 6381–6389.
- [9] D. Akilbekova, M. Shaimerdenova, S. Adilov, D. Berillo, *Int. J. Biol. Macromol.* 114 (2018) 324–333.
- [10] G. Pandey, N. Mittapelly, A. Pant, S. Sharma, P. Singh, V.T. Banala, R. Trivedi, P.K. Shukla, P.R. Mishra, *Eur. J. Pharm. Sci.* 91 (2016) 105-113.
- [11] B.J. Klotz, D. Gawlitta, A.J.W.P. Rosenberg, J. Malda, F.P.W. Melchels, *Trends Biotechnol.* 34(5) (2016) 394-407.
- [12] V. V. Filipović, B. Božić Nedeljković, M. Vukomanović, S.L. Tomić, *Polym. Test.* 68 (2018) 270-278.
- [13] N.C. Cheng, W.J. Lin, T.Y. Ling, T.H. Young, *Acta Biomater.* 51 (2017) 258-267.
- [14] M. Bakhshpour, N. Idil, I. Perçin, A. Denizli, *Appl. Sci.* 9(3) (2019) 553.
- [15] P. Dubruel, H.A. Declercq, M.M. Cornelissen, D.-M. Dragusin, M. Dierick, I.-C. Stancu, S. Van Vlierberghe, L. Van Hoorebeke, *Soft Matter.* 8 (2012) 9589-9602.
- [16] S. Cometa, M. Domingos, E. De Giglio, M. Giangregorio, M. Mattioli-Belmonte, D. Cafagna, *J. Bioact. Compat. Polym.* 26 (2011) 420–434.
- [17] H. Macková, Z. Plichta, H. Hlídková, O. Sedláček, R. Konefal, Z. Sadakbayeva, M. Dušková-Smrčková, D. Horák, Š. Kubinová, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 9(12) (2017) 10544-10553.
- [18] V. Lozinsky, *Gels.* 4(3) (2018) 77.

- [19] Y. Saylan, A. Denizli, *Gels.* 5(2) (2019) 20.
- [20] F.M. Plieva, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, *J. Sep. Sci.* 30(11) (2007) 1657–1671.
- [21] M. Andaç, I.Y. Galaev, A. Denizli, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1021 (2016) 69–80.
- [22] N. Kathuria, A. Tripathi, K.K. Kar, A. Kumar, *Acta Biomater.* 5(1) (2009) 406–418.
- [23] B. Mattiasson, *Polymeric Cryogels*, 263 (2014) 245-281.
- [24] F.M. Plieva, V.I. Lozinsky, H. Jungvid, B. Mattiasson, I.Y. Galaev, I.N. Savina, 21(11) (2003) 445–451.
- [25] A. Memic, T. Colombani, L.J. Eggermont, M. Rezaeeyazdi, J. Steingold, Z.J. Rogers, K.J. Navare, H.S. Mohammed, S.A. Bencherif, *Adv. Ther.* 2(4) (2019).
- [26] S.A. Bencherif, R.W. Sands, D. Bhatta, P. Arany, C.S. Verbeke, D.A. Edwards, D.J. Mooney, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(48) (2012) 19590-19595.
- [27] P. Karacan, O. Okay, *React. Funct. Polym.* 73(3) (2013) 442–450.
- [28] K.R. Hixon, T. Lu, S.A. Sell, *Acta Biomater.* 62 (2017) 29–41.
- [29] H. Zhang, F. Zhang, J. Wu, *React. Funct. Polym.* 73(7) (2013) 923–928.
- [30] Y. Hwang, C. Zhang, S. Varghese, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 345-351.
- [31] T.M.A. Henderson, K. Ladewig, D.N. Haylock, K.M. McLean, A.J. O'Connor, *Cryogels for biomedical applications*, *J. Mater. Chem. B.* (2013).
- [32] J. Van Rie, H. Declercq, J. Van Hoorick, M. Dierick, L. Van Hoorebeke, R. Cornelissen, H. Thienpont, P. Dubruel, S. Van Vlierberghe, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2015) 123.
- [33] H. Kirsebom, D. Topgaard, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, *Langmuir.* 26(20) (2010) 16129-16133.
- [34] D. Singh, V. Nayak, A. Kumar, *Int. J. Biol. Sci.* 6(4) (2010) 371–381.
- [35] F.M. Plieva, I.Y. Galaev, W. Noppe, B. Mattiasson, *Trends Microbiol.* 16(11) (2008) 543–551.
- [36] I.N. Savina, G.C. Ingavle, A.B. Cundy, S. V. Mikhalovsky, *Sci. Rep.* 6 (2016) 21154.
- [37] A.K. Shakya, R. Holmdahl, K.S. Nandakumar, A. Kumar, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 102(10) (2014) 3409–3418.
- [38] S. Hinderer, S.L. Layland, K. Schenke-Layland, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97 (2016) 260–269.
- [39] S. Bhat, A. Kumar, *J. Biosci. Bioeng.* 114(6) (2012) 663–670.
- [40] X. Wang, B. Ding, B. Li, *Mater. Today.* 16(6) (2013) 229–241.

- [41] A.J. Salgado, O.P. Coutinho, R.L. Reis, *Macromol. Biosci.* 4 (8) (2004) 743–765.
- [42] S. Bhat, A. Tripathi, A. Kumar, *J. R. Soc. Interface.* 6:8(54) (2011) 540-554.
- [43] N. Bölgen, I. Vargel, P. Korkusuz, E. Güzel, F. Plieva, I. Galaev, B. Matiasson, E. Pişkin, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 91A(1) (2009) 60–68.
- [44] M. Rezaeeyazdi, T. Colombani, A. Memic, S.A. Bencherif, *Materials, Basel.* 11(8) (2018) 1374.
- [45] S.P. Grogan, S.F. Duffy, C. Pauli, M.K. Lotz, D.D. D’Lima, *J. Orthop. Res.* 36(7) (2018).
- [46] C.Y. Kuo, C.H. Chen, C.Y. Hsiao, J.P. Chen, *Carbohydr. Polym.* 117 (2015) 722–730.
- [47] S.A. Bencherif, T.M. Braschler, P. Renaud, *J. Periodontal Implant Sci.*43(6) (2013) 251-261.
- [48] D. Singh, A. Tripathi, V. Nayak, A. Kumar, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 22 (2011) 1733–1751.
- [49] M. Jurga, H. Jungvid, I.N. Savina, A. Sarnowska, M.B. Dainiak, A. Kumar, A. Tripathi, L. Strojek, F.M. Plieva, A. Jablonska, *Biomaterials.* 32(13) (2011) 3423–3434.
- [50] E. Brynda, M. Houska, J. Kysilka, M. Přádný, P. Lesný, P. Jendelová, J. Michálek, E. Syková, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20(4) (2009) 909–915.
- [51] H. Janik, M. Marzec, *Mater. Sci. Eng. C.* 48 (2015) 586–591.
- [52] Z. Karimi, M. Ghorbani, B. Hashemibeni, H. Bahramian, *Adv. Biomed. Res.* 4 (2015) 251.
- [53] L. Qian, H. Zhang, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86(2) (2011).
- [54] W. Chen, J. Ma, L. Zhu, Y. Morsi, H. El-Hamshary, S.S. Al-Deyab, X. Mo, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 142 (2016) 165–172.
- [55] W. Wang, X. Jin, Y. Zhu, C. Zhu, J. Yang, H. Wang, T. Lin, *Carbohydr. Polym.* 140 (2016) 356–361.
- [56] V.I. Lozinsky, V.K. Kulakova, R. V. Ivanov, A.Y. Petrenko, O.Y. Rogulska, Y.A. Petrenko, *E-Polymers.* 18(2) (2018) 175–186.
- [57] R.Y. Tam, S.A. Fisher, A.E.G. Baker, M.S. Shoichet, *Chem. Mater.* 28(11) (2016) 3762-3770.
- [58] K. Heymann, A. Saalbach, L.M. Kutz, W. Knolle, U. Anderegg, S. Reichelt, J. Becher, S. Thönes, S. Oehmichen, M. Schnabelrauch, *Int. J. Biol. Macromol. Part A:* 94 (2016) 611–620.
- [59] S. Kwon, S.S. Lee, A. Sivashanmugam, J. Kwon, S.H.L. Kim, M.Y. Noh, S.K. Kwon, R. Jayakumar, N.S. Hwang, *Polymers, Basel.* 10(8) (2018) 914.
- [60] T. Kutlusoy, B. Oktay, N.K. Apohan, M. Süleymanoğlu, S.E. Kuruca, *Int. J. Biol.*

- Macromol. 103 (2017) 366–378.
- [61] D. Qi, S. Wu, M.A. Kuss, W. Shi, S. Chung, P.T. Deegan, A. Kamenskiy, Y. He, B. Duan, *Acta Biomater.* 74 (2018) 131-142.
- [62] B. Göppert, T. Sollich, P. Abaffy, A. Cecilia, J. Heckmann, A. Neeb, A. Bäcker, T. Baumbach, F.J. Gruhl, A.C.B. Cato, *Small.* 12(29) (2016).
- [63] F.M. Plieva, P. Ekström, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, *Soft Matter.* 4 (2008) 2418–2428.
- [64] K.R. Hixon, M.N. Carletta, S.M. Neal, M. Talovic, A.J. Dunn, K. Garg, S.A. Sell, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* (2018).
- [65] Y. Li, Y. Liu, S. Li, G. Liang, C. Jiang, Q. Hu, *J. Biosci. Bioeng.* 121(1) (2016) 111–116.
- [66] M. Rodríguez-Vázquez, B. Vega-Ruiz, R. Ramos-Zúñiga, D.A. Saldaña-Koppel, L.F. Quiñones-Olvera, *Biomed Res. Int.* 2015 (2015) 15.
- [67] S. Bratskaya, Y. Privar, D. Nesterov, E. Modin, M. Kodess, A. Slobodyuk, D. Marinin, A. Pestov, *Biomacromolecules.* 20 (4) (2019) 1635-1643.
- [68] D. Ciolacu, C. Rudaz, M. Vasilescu, T. Budtova, *Carbohydr. Polym.* 151 (2016) 392–400.
- [69] D. Atila, D. Keskin, A. Tezcaner, *Carbohydr. Polym.* 133 (2015) 251–261.
- [70] F.A. Müller, L. Müller, I. Hofmann, P. Greil, M.M. Wenzel, R. Staudenmaier, *Biomaterials.* 27(21) (2006) 3955-3963.
- [71] İ.A. İsoğlu, N. Bölgen, P. Korkusuz, İ. Vargel, H.H. Çelik, E. Kılıç, E. Güzel, T. Çavuşoğlu, D. Uçkan, E. Pişkin, *Nanomedicine, Biotechnol.* (2019) 1094-1100.
- [72] P.U. Kadakia, E. Jain, K.R. Hixon, C.T. Eberlin, S.A. Sell, *Mater. Res. Express.* 3 (2016).
- [73] S.E. Stabenfeldt, A.J. Garcia, M.C. LaPlaca, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 77A(4) (2006).
- [74] K. Garg, Laminin Enriched Scaffolds for Tissue Engineering Applications, *Adv. Tissue Eng. Regen. Med. Open Access.* 2(3) (2017) 194–200.
- [75] S. Suri, C.E. Schmidt, *Tissue Eng. Part A.* 16(5) (2010).
- [76] F. Zhang, C. He, L. Cao, W. Feng, H. Wang, X. Mo, J. Wang, *Int. J. Biol. Macromol.* 48(3) (2011) 474–481.
- [77] S. Reichelt, J. Becher, J. Weisser, A. Prager, U. Decker, S. Möller, A. Berg, M. Schnabelrauch, *Mater. Sci. Eng. C.* 35 (2014) 164-170.
- [78] S.C. Rodrigues, C.L. Salgado, A. Sahu, M.P. Garcia, M.H. Fernandes, F.J. Monteiro, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 101(4) (2013).
- [79] J. Glowacki, S. Mizuno, Collagen scaffolds for tissue engineering, *Biopolymers.* 89 (2008) 338–344.

- [80] E.A. Kamoun, E.R.S. Kenawy, X. Chen, J. Adv. Res. 8(3) (2017) 217-233.
- [81] A. Tripathi, N. Kathuria, A. Kumar, J. Biomed. Mater. Res. Part A. 90A(3) (2009).
- [82] A. Vats, N.S. Tolley, J.M. Polak, J.E. Gough, Clin. Otolaryngol. Allied Sci. 28(3) (2003) 165–172.
- [83] N. Bölgen, P. Korkusuz, I. Vargel, E. Kiliç, E. Güzel, T. Çavuşoğlu, D. Uçkan, E. Pişkin, Artificial Cells, Nanomedicine Biotechnol. 42(1) (2014).
- [84] S. Bhat, A. Tripathi, A. Kumar, J. R. Soc. Interface. 8 (2011) 540-554.
- [85] Y. Wang, Y. Zhang, J. Cui, S. Li, M. Yuan, T. Wang, Q. Hu, X. Hou, Anal. Chim. Acta. 1022 (2018) 45–52.
- [86] Y. Privar, I. Malakhova, A. Pestov, A. Fedorets, Y. Azarova, S. Schwarz, S. Bratskaya, Chem. Eng. J. 334 (2018) 1392-1398.
- [87] J. Bruns, S. McBride-Gagyi, S.P. Zustiak, Macromol. Mater. Eng. 303 (10) (2018).
- [88] K.H. Son, J.W. Lee, Materials. 9(10) (2016) 854.
- [89] B. Newland, P.B. Welzel, H. Newland, C. Renneberg, P. Kolar, M. Tsurkan, A. Rosser, U. Freudenberg, C. Werner, Small.11(38) (2015).
- [90] S.J. Shirbin, F. Karimi, N.J.A. Chan, D.E. Heath, G.G. Qiao, Biomacromolecules. 17(9) (2016) 2981–2991.
- [91] T. Sedlačík, O.K. Acar, H. Studenovská, I. Kotelnikov, J. Kučka, Z. Konečná, T. Zikmund, J. Kaiser, G.T. Kose, F. Rypáček, Soft Matter. 14 (2018) 228-238.
- [92] Meenakshi, M. Ahuja, Int. J. Biol. Macromol.72 (2015) 931-938.
- [93] S. V. Mikhailovsky, S.L. James, M. Salmon, B. Rowshanravan, I.U. Allan, S.E. James, M. Illsley, I.N. Savina, M. Eeman, R. V. Shevchenko, Acta Biomater. 10(7) (2014) 3156–3166.
- [94] A. Mohammadpour, S. Arjmand, A.S. Lotfi, H. Tavana, M. Kabir-Salmani, Biochem. Biophys. Res. Commun. 507 (1-4) (2018) 15–21.
- [95] S. Afewerki, A. Sheikhi, S. Kannan, S. Ahadian, A. Khademhosseini, Bioeng. Transl. Med.4(1) (2019).
- [96] R.M. Hafidz, C.M. Yaakob, I. Amin, A. Noorfaizan, Int. Food Res. Journal. 18 (2011) 787-791.
- [97] M.C. Gomez-Guillen, B. Gimenez, M.E. Lopez-Caballero, M.P. Montero, Food Hydrocoll.25(8) (2011) 1813-1827.
- [98] P. Aramwit, N. Jaichawa, J. Ratanavaraporn, T. Srichana, Mater. Express.5(3) (2015) 241-248.
- [99] G. Yang, Z. Xiao, H. Long, K. Ma, J. Zhang, X. Ren, J. Zhang, Sci. Rep. 8 (2018) 13.
- [100] H. Esquivel-Solís, H.I. Meléndez-Ortiz, T.A. Camacho-Villegas, P. Gatenholm, E.

- Delgado, G. Toriz, L. García-Uriostegui, *Carbohydr. Polym.* 201 **(2018)** 490–499.
- [101] G. Scionti, L. Rodriguez-Arco, M.T. Lopez-Lopez, A.L. Medina-Castillo, I. Garzón, M. Alaminos, M. Toledano, R. Osorio, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 106 (3) **(2018)** 738–745.
- [102] M.N. Moghadam, D.P. Pioletti, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 104(6)**(2016)** 1161–1169.
- [103] D. Çetin, A.S. Kahraman, M. Gümüşderelioglu, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 22(9) **(2011)** 1157–1178.
- [104] M. Madaghiele, L. Salvatore, C. Demitri, A. Sannino, *Mater. Lett.* 218 **(2018)** 305–308.
- [105] M. Andac, F.M. Plieva, A. Denizli, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, *Macromol. Chem. Phys.* 209(6 **(2008)** 577–584.
- [106] T. Matsui, H. Ichikawa, T. Fujita, S. Takemura, T. Takagi, M. Osada-Oka, Y. Minamiyama, *Eur. J. Pharmacol.* 850 **(2019)** 35-42.
- [107] X. Zhu, T. Zhao, Z. Nie, Z. Miao, Y. Liu, S. Yao, *Nanoscale.*8 **(2016)** 2205-2211.
- [108] U. Rauen, S. Klempt, H. De Groot, *Cell. Mol. Life Sci.* 64(2) **(2007)** 192-205.
- [109] A. Elkak, A. Hamade, N. Bereli, C. Armutcu, A. Denizli, *Anal. Biochem.* 525 **(2017)** 7.
- [110] I. Perçin, N. Idil, A. Denizli, *Process Biochem.*80 **(2019)** 181-189.
- [111] I. Perçin, E. Sağlar, H. Yavuz, E. Aksöz, A. Denizli, *Int. J. Biol. Macromol.* 48(4) **(2011)** 577–582.
- [112] A. Derazshamshir, G. Baydemir, M. Andac, R. Say, I.Y. Galaev, A. Denizli, *Macromol. Chem. Phys.* **(2010)**.
- [113] J.C. Stockert, A. Blázquez-Castro, M. Cañete, R.W. Horobin, Á. Villanueva, *Acta Histochem.* 114(8) **(2012)** 785–796.
- [114] J. Kumari, A. Kumar, *Sci. Rep.* 41551 **(2017)**.
- [115] I.N. Savina, V. Cnudde, S. D'Hollander, L. Van Hoorebeke, B. Mattiasson, I.Y. Galaev, F. Du Prez, *Soft Matter.* **(2007)**.
- [116] D. Singh, S.M. Zo, A. Kumar, S.S. Han, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 24(11) **(2013)**.
- [117] Y. Xiao, L. He, J. Che, *J. Mater. Chem.* 22 **(2012)** 8076-8082.
- [118] K.H. Chang, H.T. Liao, J.P. Chen, *Acta Biomater.* 9(11) **(2013)** 9012-9026.
- [119] M. Jalilzadeh, S. Şenel, *J. Water Process Eng.*13 **(2016)** 143-152.
- [120] M. Odabaşı, G. Baydemir, M. Karataş, A. Derazshamshir, *J. Appl. Polym. Sci.* 116(3) **(2010)**.
- [121] J. Svobodová, V. Proks, Ö. Karabiyik, A.C. Çalikoğlu Koyuncu, G. Torun Köse,

- F. Rypáček, H. Studenovská, J. Tissue Eng. Regen. Med. 11(3) (2017).
- [122] M. Bakhshpour, H. Yavuz, A. Denizli, Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol. 46(1) (2018).
- [123] D. Singh, S.M. Zo, D. Singh, S.S. Han, Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater. 68(10) (2019).
- [124] H.W. Wu, T. Kuhn, V.T. Moy, Scanning. 20(5) (1998).
- [125] S. Hiromoto, K. Noda, T. Hanawa, Electrochim. Acta. 48(4) (2002) 387-396.
- [126] P.X. Ma, Scaffolds for tissue fabrication, Mater. Today. 7(5) (2004) 30–40.
- [127] J.E. Pomeroy, A. Helfer, N. Bursac, Biotechnol. Adv. (2019).
- [128] K. Çetin, A. Denizli, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 126 (2015) (401-406).



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 09/07/19

TEZ BAŞLIĞI / KONUSU: POLİ (2-HİDROKSİETİL-METAKRİLAT) TEMELLİ JELATİN VE AMİNO ASİT İÇEREN SÜPERMAKROGÖZENEKLİ KRİYOJEL DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 61 sayfalık kısmına ilişkin, 09/07/19 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Gülşen BAYRAK
Öğrenci No: N17137433
Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Moleküler Biyoloji
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

09/07/19
G.Beyrak

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

İşık Perçin Demірçelik
Doç. Dr. İşık PERÇİN DEMİRÇELİK

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gülşen Bayrak
Doğum yeri : Güzelyurt, KKTC
Doğum tarihi : 08/05/1995
Medeni hali : Bekar
Yazışma adresi : Çankaya, Ankara
Elektronik posta adresi : gulsenbayrak1@gmail.com
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisan : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü 2013-2017
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji
Anabilim Dalı 2017-2019
İş Tecrübesi : Yok