

**MİKRODALGA DESTEĞİ İLE METAKRİLATLANMIŞ *KAPPA*  
CARRAGEENAN HİDROJELLERİN 3B BASKILANMASI VE  
KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIMININ  
ARAŞTIRILMASI**

**3D BIOPRINTING OF MICROWAVE ASSISTED  
METHACRYLATED *KAPPA* CARRAGEENAN HYDROGELS  
AND INVESTIGATION OF THEIR USAGE IN CARTILAGE  
TISSUE ENGINEERING**

**GÜLNİHAL TOK İLHAN**

**PROF.DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak hazırlanmıştır.

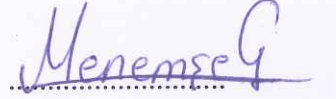
2019

**Gülnihal TOK İLHAN**'ın hazırladığı “**Mikrodalga Desteği İle Metakrilatlanmış Kappa Carrageenan Hidrojellerin 3B Baskılanması ve Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Kullanımının Araştırılması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Özer Aylin Gürpınar  
Başkan



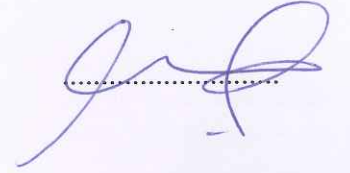
Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu  
Danışman



Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz  
Üye



Doç. Dr. Ayşe Karakeçili  
Üye



Doç. Dr. Eda Ayşe Aksoy  
Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## 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 atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim

27/06/2019

  
Gülnihal TOK İLHAN

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarda kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesi'ne 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 haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitüs / 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.

27/06/2019

  
Gülnihal TOK İLHAN

## ÖZET

# MİKRODALGA DESTEĞİ İLE METAKRİLATLANMIŞ *KAPPA* CARRAGEENAN HİDROJELLERİN 3B BASKILANMASI VE KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

**Gülnihal TOK İLHAN**

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**

**Haziran 2019, 96 sayfa**

Bu çalışma “Mikrodalga Desteği ile Metakrilatlanmış *Kappa* Carrageenan Hidrojellerin Kıkırdak Doku Rejenerasyonu için 3 Boyutlu Baskılanması” başlıklı 118M734 numaralı 1002 Hızlı Destek Projesi kapsamında Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir.

Sunulan tez çalışmasının amacı mikrodalga desteği ile metakrilatlanmış *kappa* carrageenan ( $\kappa$ -CA) polimerinin 3 boyutlu (3B) biyobaskılanması için uygun özelliklere sahip biyoçözelti olarak sunulması ve kıkırdak öncül hücreleri (ATDC5) ile birlikte baskılanan hidrojellerin kıkırdak doku mühendisliğinde kullanımının araştırılmasıdır.

Çalışma kapsamında, ilk olarak *kappa* carrageenan ( $\kappa$ -CA) polimeri farklı metakrilik anhidrit (MA) oranlarında (hacimce %4 ve %12), hem geleneksel hem de mikrodalga yöntemleri ile metakrilatlanmışlardır.  $\kappa$ -CA polimeri mikrodalga yöntemiyle başarılı bir şekilde metakrilatlanarak düşük MA oranında (%4 v/v) yüksek metakrilatlanma derecesi (%85  $\pm$  9) elde edilmiştir. Ardından elde edilen  $\kappa$ -CA polimerlerinin PBS (pH=7.4) içerisinde %8'lik (w/v) çözeltileri hazırlanarak, bu çözeltilere IRGACURE-2959® (%1 w/v) varlığında 40 s UV uygulanmış ve foto-çapraz bağlama prosesi ile hidrojel yapıları elde edilmiştir. Sonrasında, hidrojel karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların ışığında, mikrodalga prosesi ile metakrilatlanan  $\kappa$ -CA (%12 v/v MA) polimeri başarılı biçimde 3B baskılanarak bir biyoçözelti olarak sunulmuştur.

Çalışmanın devamında *in vitro*'da çoğaltılan ATDC5 hücreleri ( $2 \times 10^7$  hücre/mL) ile  $\kappa$ -CA polimer çözeltileri 3B baskılanarak 21 gün farklılaşma ortamında kültüre edilmişlerdir. Her iki grupta da hücreler kıkırdak dokuya farklılaşmışlardır. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri ile hücrelerin kıkırdak dokuya özgü küresel morfoloji sergiledikleri görülmüştür. Glikozaminoglikan (GAG) içeriği spektrofotometrik yöntem ile tayin edilmiş, Safranin O / Fast Green boyamaları ile de hidrojellerde GAG varlığını ortaya koyan görüntüler elde edilmiştir. İmmünohistokimyasal analizlerle de agregan ve kollajen II varlığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak, 3B baskılanan ve ATDC5 hücrelerini içeren metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA hidrojellerinde *in vitro* koşullarda kıkırdak dokuya farklılaşma gerçekleşmiştir. Böylece, mikrodalga yöntemi ile fonksiyonlandırılan  $\kappa$ -CA polimerinin kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları ve mikroekstrüzyon tabanlı biyoyazıcılar için uygun bir biyoçözelti olabileceği önerilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Kappa* carrageenan, Hidrojel, Biyoçözelti, Kıkırdak doku.

## ABSTRACT

### **3D BIOPRINTING OF MICROWAVE ASSISTED METHACRYLATED KAPPA CARRAGEENAN HYDROGELS AND INVESTIGATION OF THEIR USAGE IN CARTILAGE TISSUE ENGINEERING**

**Gülnihal TOK İLHAN**

**Master of Science, Department of Bioengineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**

**June 2019, 96 pages**

This “3D Bioprinting of Microwave Assisted Methacrylated *Kappa* Carrageenan Hydrogels and Investigation of Their Usage in Cartilage Tissue Engineering” entitled study was supported by the The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK), 1002 program with project number 118M734.

The aim of the presented study is development of microwave assisted methacrylated *kappa* carrageenan ( $\kappa$ -CA) polymer as a bioink with suitable properties for the 3 dimensional (3D) bioprinting, and investigation of the printed hydrogels with cartilage precursor cells (ATDC5) in cartilage tissue engineering.

Within the scope of the study, the *kappa* carrageenan ( $\kappa$ -CA) precursor was methacrylated with different methacrylic anhydride (MA) ratios (4% and 12% by volume), following conventional

and microwave methods.  $\kappa$ -CA was successfully methacrylated at low MA concentrations (4% (v/v) by microwave method to obtain a high yields of methacrylation ( $85 \pm 9\%$ ). Then, 8% (w/v) solutions of  $\kappa$ -CA polymers in PBS (pH=7.4) were prepared. These solutions were treated with UV for 40 s in the presence of IRGACURE-2959<sup>®</sup> affording hydrogel structures in photo-crosslinking process, and the obtained hydrogels were fully characterized. According to the characterization results the methacrylated  $\kappa$ -CA polymer (12% v/v MA) by microwave process was chosen and successfully used as a bioink in 3D printing process.

In the following studies, the ATDC5 cells ( $2 \times 10^7$  cells/mL) were mixed with the  $\kappa$ -CA solutions that were methacrylated with microwave and traditional method, and the result solution, in other words bioink, was 3D printed. The printed structure was cultured for 21 days in the differentiation medium. In both groups, the cells differentiated into a cartilage tissue. Scanning electron microscopy (SEM) images showed that cells exhibit spherical morphology specific to cartilage tissue. Glycosaminoglycan (GAG) content was determined by the spectrophotometric method and the presence of GAG in hydrogels was demonstrated by Safranin O / Fast Green staining. The presence of aggrecan and collagen II was also demonstrated by immunocytochemical analyzes.

Consequently, the 3D printed methacrylated  $\kappa$ -CA hydrogels including ATDC5 cells differentiated into cartilage tissue *in-vitro*. Thus, it is proposed that the microwave-functionalized  $\kappa$ -CA polymer may be considered as a suitable bioink for cartilage tissue engineering studies and microextrusion based bioprinters.

**Key Words:** *Kappa* carrageenan, Hydrogel, Bioink, Cartilage tissue.



## TEŞEKKÜR

Derin bilgi ve tecrübeleriyle, bir bilim insanı ve bir birey olarak hayatım boyunca örnek alacağım, bana ve bütün öğrencilerine yol gösteren, bizleri her konuda destekleyen, bizlere hem bilimsel hem de hayatla ilgili çok kıymetli bilgiler öğreten, öğrencisi olduğum için çok şanslı hissettiğim değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu**'na en içten teşekkürlerimi, sevgilerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisansım ve tezim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, her konuda desteğini gördüğüm, benim için hem çok iyi bir öğretmen hem çok iyi bir abla olan sevgili **Dr. Gülseren Irmak**'a,

118M734 numaralı 1002 Hızlı Destek Projesi kapsamında çalışmama maddi destek sağlayan **Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu**'na,

Akşamları laboratuvarıda beni yalnız bırakmayan, her konuda desteğini gördüğüm, canım arkadaşım **Arş. Gör. Sena Koç**'a, zor zamanlarımda hep yanımda olan canım arkadaşım **Arş. Gör. Demet Çakır**'a, iyi kalpli ve yardımsever, canım arkadaşım **Arş. Gör. Tülay Selin Ertekin**'e benden hiçbir desteğini esirgemeyen, dostum ve canım ablam **Şeyma Bektaş Tercan**'a, desteğini hep hissettiğim, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, hatalarımı hoş gören sevgili hocam **Dr. Arş. Gör. Damla Çetin Altındal**'a, adı gibi kendisi de tatlı **Hala Jarrar**'a, her konuda desteğini gördüğüm ablam **Dr. Gökçe Kaynak Bayrak**'a, sorunlara sakin ve çözüm odaklı yaklaşımına hayran olduğum **Özge Ekin Akdere**'ye, çok iyi bir hoca ve çok iyi bir insan olan desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen sevgili hocam **Dr. Öğr. Üyesi Işıl Gerçek Beşkardeş**'e bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, çok fazla şey paylaştığım arkadaşım **Arş. Gör. Elvan Konuk**'a, laboratuvara geldiğim günden itibaren sıcak ve içten tavırlarıyla beni hemen kabullenen **Arş. Gör. Tuğçe Gültan**'a, çılgın ve güzel arkadaşım **Zeynep Altınışık**'a, yıldız takımı üyelerinden **Fayit Purkat**'a, cevizli sucukları ve çiğ köfteleriyle laboratuvarı besleyen sevgili arkadaşımız **Arş. Gör. Caner Karaaslan**'a, sakin tavırları ve abla sıcaklığıyla hemen samimi olduğum sevgili arkadaşım **Ayfer Koyuncu**'ya ve ismini burada saymadığım, çalışmalarım boyunca desteklerini gördüğüm tüm **Hacettepe Üniversitesi Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu** üyelerine,

Liseden beri hep yanımda olan, beni her koşulda destekleyen, canım dostlarım **Emine Yıldırım**, **Samed Onur** ve **Hilmi Kılıçkaya**'ya,

Bugünlere gelmemi sağlayan, bana başından beri inanan melek annem, birtanem **Döne Tok**'a, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım babam **Emin Tok**'a, her şeyimi paylaştığım, kelebeğim, birtanecik kardeşim **Nur Sima Tok**'a, maddi-manevi desteğini hep hissettiğim, kendimi kötü hissettiğimde hep kendinisine sığındığım, her konuda bana yardımcı olan, yol arkadaşım, canım eşim **İhsan İlhan**'a ve son olarak tüm gerginliğimi çekip alan, kalbimi varlığıyla ısıtan minik dostum **Muhtar Minnoş İlhan**'a,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Gülnihal Tok İlhan

Haziran 2019, Ankara.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	x
ŞEKİLLER.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kıkırdak Dokunun Yapısı ve Özellikleri.....	3
2.2. Kıkırdak Doku Hasarlarına Yönelik Klinik Çalışmalar.....	6
2.3. Kıkırdak Doku Mühendisliği.....	8
2.4. 3B Biyobaskılama (Bioprinting).....	12
2.5. Biyoyazıcı Çeşitleri.....	13
2.5.1. Püskürtmeli (ink-jet) Biyoyazıcılar.....	14
2.5.2 Ekstrüzyon Biyoyazıcılar.....	14
2.5.3. Lazer Destekli Biyoyazıcılar.....	16
2.6. Biyoçözelti (Bioink).....	17
2.7. Hidrojeller.....	20

2.8. Carrageenan (CA) Polimeri Çeşitleri ve Özellikleri.....	25
2.8.1. <i>Kappa</i> Carrageenan ( $\kappa$ -CA).....	27
2.9. Mikrodalga Teknolojisi.....	28
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	30
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler.....	30
3.2. Birinci Bölüm Deneysel Çalışmalar.....	33
3.2.1. Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Üretimi.....	33
3.2.1.1. Geleneksel Yöntemle Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Üretimi.....	33
3.2.1.2. Mikrodalga Yöntemiyle Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Üretimi.....	33
3.2.2. Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Polimerinin Karakterizasyonu.....	34
3.2.2.1. $^1\text{H}$ NMR (Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi) Analizi.....	34
3.2.2.2. Viskozite Tayini.....	35
3.2.3. Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Hidrojellerinin Üretimi.....	35
3.2.4. Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Hidrojellerinin Karakterizasyonu.....	36
3.2.4.1. Morfolojik Analiz (SEM).....	36
3.2.4.2. Biyobozunurluk Tayini.....	37
3.2.4.3. Şişme Analizi.....	37
3.2.4.4. Reolojik Analizler.....	37
3.3. İkinci Bölüm Deneysel Çalışmalar.....	38
3.3.1. Kültür Ortamında Hücrelerin Çoğaltılması.....	38
3.3.2. 3B Biyoyazıcı (Fab@Home) Sisteminin Çalışma Prensibi.....	38

3.3.3. 3B Hücre Kültürü Çalışmaları.....	39
3.3.3.1. Morfolojik Analiz (SEM).....	40
3.3.3.2. Hücre Canlılık (Canlı-Ölü) Analizi.....	41
3.3.3.3 Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyama.....	42
3.3.3.4. Safranin O / Fast Green Boyama.....	43
3.3.3.5. Glikozaminoglikan (GAG) İçeriğinin Belirlenmesi.....	43
3.3.3.6. İmmünohistokimyasal Analizler.....	44
3.4. İstatistiksel Analizler.....	45
4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	46
4.1. Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Üretimi ve Karakterizasyon Çalışmaları.....	47
4.1.1. <sup>1</sup> H-NMR Analizi (Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi).....	50
4.1.2. Viskozite Tayini.....	56
4.2. Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Hidrojel Üretimi ve Karakterizasyon Çalışmaları.....	60
4.2.1. Morfolojik Analiz (SEM) Sonuçları.....	62
4.2.2. Biyobozunurluk Deneyi Sonuçları.....	63
4.2.3. Şişme Analizi Sonuçları.....	66
4.2.4. Reolojik Analizler.....	67
4.2.4.1. Frekans Taraması Sonuçları.....	68
4.2.4.2 Gerinim Taraması Sonuçları.....	71
4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	73
4.3.1. ATDC5 Hücre Hattı.....	73

4.3.2. Morfolojik Analiz (SEM).....	74
4.3.3. Canlı-Ölü Analizi Sonuçları.....	76
4.3.4. Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyama.....	79
4.3.5. Safranin O / Fast Green Boyama.....	79
4.3.6. Glikozaminoglikan (GAG) İçeriğinin Belirlenmesi.....	83
4.3.7. İmmünohistokimyasal Analizler.....	85
5. GENEL SONUÇLAR.....	86
6. KAYNAKLAR.....	90
7. EKLER.....	94
8. ÖZGEÇMİŞ.....	95

## ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Biyoyazıcı çeşitlerinin karşılaştırmalı özellikleri.....	13
Çizelge 2.2.	CA polimerlerinin bazı özellikleri.....	27
Çizelge 2.3.	Geleneksel ısıtma prosesi ile mikrodalga enerjisi ile ısıtma prosesinin karşılaştırılması.....	29
Çizelge 3.1.	Tez kapsamında kullanılan kimyasal ve biyolojik malzeme listesi.....	30
Çizelge 3.2.	$\kappa$ -CA Hidrojel Üretim Koşulları.....	35
Çizelge 3.3.	Safranin O / Fast Green boyamasında kullanılan çözeltilerin içerikleri.....	43
Çizelge 4.1.	Farklı yöntem ve farklı metakrilik anhidrit oranları ile sentezlenen metakrilatlanmış $\kappa$ -CA polimerlerinin metakrilatlanma dereceleri.....	55
Çizelge 4.2.	Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA (Hacimce %12 MA ve mikrodalga yöntemiyle üretilen) hidrojelleri oluşturmak için çalışılan proses değişkenlerinin değerleri.....	60
Çizelge 4.3.	Hücre içeren $\kappa$ -CA hidrojellerde hücre canlılık (%) oranları.....	78

## ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Kıkırdak doku çeşitlerinin ve doku organizasyonunun şematik gösterimi.....6
Şekil 2.2.	Eklem kıkırdağı hasarına yönelik klinikte uygulanan yöntemler: <b>a)</b> kıkırdak lezyonu şematik gösterimi; <b>b)</b> debriman yöntemi ile iyileştirme; <b>c)</b> mikrofraktür yöntemi ile kemikteki mezenkimal kök hücrelerin hasarlı bölgeye göç etmesini sağlama; <b>d)</b> ACI implantasyonu; <b>e)</b> matriks ile desteklenmiş otolog kondrosit hücre transplantasyonu.....7
Şekil 2.3.	Kıkırdak dokuya yönelik doku mühendisliği uygulamalarının şematik gösterimi.....9
Şekil 2.4.	Üç boyutlu biyobaskılamanın şematik gösterimi.....12
Şekil 2.5.	Püskürtmeli biyoyazıcıların işleyişinin şematik gösterimi; <b>a)</b> piezoelektrik <b>b)</b> termal.....14
Şekil 2.6.	Ekstrüzyon biyoyazıcının işleyişinin şematik gösterimi.....15
Şekil 2.7.	Lazer destekli biyoyazıcının işleyişinin şematik gösterimi.....16
Şekil 2.8.	Biyoçözelti seçiminde dikkat edilmesi gereken özellikler.....17
Şekil 2.9.	Hidrojinin çapraz bağlanmasının şematik gösterimi.....21
Şekil 2.10.	Hidrojinin sınıflandırılması.....22
Şekil 2.11.	Çapraz bağlamada en sık kullanılan yöntemler; <b>a)</b> Sıcaklığın etkisi ile polimer zincirlerinde meydana gelen çapraz bağlanma <b>b)</b> İyonik etkileşimlerle çapraz bağlanma (mavi renk iyonları temsil etmekte); <b>c)</b> UV etkisi ile foto-çapraz bağlayıcı (yeşil renk foto-çapraz bağlayıcıyı temsil etmekte) varlığında çapraz bağlanma.....23
Şekil 2.12	Hidrojinin dokuya spesifik olarak doku mühendisliği uygulamalarında kullanımının şematik gösterimi.....24

Şekil 2.13.	CA çeşitlerinin yapısal olarak gösterimi; $\kappa$ ( <i>kappa</i> ) $\iota$ ( <i>iota</i> ) ve $\lambda$ ( <i>lambda</i> ).....26
Şekil 3.1.	Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA'nın mikrodalga yöntemi ile üretiminin şematik gösterimi.....34
Şekil 3.2.	Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA polimerinden hidrojel üretiminin şematik gösterimi.....36
Şekil 3.3.	Fab@home 3B biyoyazıcı sistemi ve “STL” uzantılı dosyada belirtilen şekle uygun olarak, biyobaskılanacak şeklin oluşturulması.....39
Şekil 3.4.	Tez kapsamında yürütülen 3B kültür çalışmalarının şematik gösterimi.....40
Şekil 4.1.	$\kappa$ -CA'nın MA ile fonksiyonlandırılma tepkimesinin şematik gösterimi.....47
Şekil 4.2.	Yığın halinde elde edilen metakrilatlanmış $\kappa$ -CA polimerinin görüntüleri; <b>a</b> ) %12 (v/v) oranında MA içeren, mikrodalga ile üretilen polimer, <b>b</b> ) %12 (v/v) oranında MA içeren, geleneksel yöntemle üretilen polimer, <b>c</b> ) %4 (v/v) oranında MA içeren, mikrodalga ile üretilen polimer <b>d</b> ) metakrilatlanmış $\kappa$ -CA polimerlerine ait genel görünüm.....50
Şekil 4.3.	Farklı MA oranları ve farklı yöntemlerle üretilen $\kappa$ -CA polimerlerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumları; <b>a</b> ) $\kappa$ -CA polimeri, <b>b</b> ) geleneksel yöntemle üretilen %4 (v/v) MA oranına sahip $\kappa$ -CA polimeri, <b>c</b> ) mikrodalga yöntemiyle üretilen %4 (v/v) MA oranına sahip $\kappa$ -CA polimeri, <b>d</b> ) geleneksel yöntemle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip $\kappa$ -CA polimeri, <b>e</b> ) mikrodalga yöntemle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip $\kappa$ -CA polimeri.....52
Şekil 4.4.	Hacimce %4 ile %12 MA ve mikrodalga yöntemiyle metakrilatlanmış $\kappa$ -CA polimerlerinin artan sıcaklığa bağlı olarak viskozitelerinin değişimi.....57
Şekil 4.5.	$\kappa$ -CA polimerinin artan sıcaklığa bağlı olarak viskozite değişimi.....57
Şekil 4.6.	<b>a</b> ) Ekstrüzyon biyoyazıcı (Fab@home) ile %12 (v/v) oranında MA içeren ve mikrodalga yöntemi ile üretilen $\kappa$ -CA'nın 3B baskılanması; <b>b</b> ) şırınganın



- ucundan ipliksi formda baskılanan  $\kappa$ -CA'nın uygun viskozitede biyoçözelti olarak sunulması; **c**) UV sonrası 3B baskılanmış hidrojel görüntüsü.....59
- Şekil 4.7. Hidrojel görüntüleri (%12 (v/v) MA, mikrodalga); **a**) 4 gözlü hücre kültürü Petri'sinde (35 mm çap) 1 göze 100  $\mu$ L hidrojel çözeltisi baskılanarak çapraz bağlanan hidrojellerin görüntüsü, **b**) PBS'te 1 gün bekletilerek yapısına su alan hidrojel görüntüsü (çap), **c**) PBS'te 1 gün bekletilerek yapısına su alan hidrojel yan görünümü (kalınlık).....62
- Şekil 4.8. Mikrodalga ve geleneksel yöntemlerle metakrilatlanan farklı MA oranlarına sahip hidrojellerin yüzey morfoloji görüntüleri; **a**) mikrodalga yöntemiyle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hidrojel (500X büyütme) **b**) geleneksel yöntemle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hidrojel (500X büyütme) **c**) mikrodalga yöntemiyle üretilen %4 (v/v) MA oranına sahip hidrojel (500X büyütme) **d**) geleneksel yöntemle üretilen %4 (v/v) MA oranına sahip hidrojel (500X büyütme).....63
- Şekil 4.9. Çalışma kapsamında üretilen hidrojellerin 30 gün süresince hidrolitik bozunması.....64
- Şekil 4.10. Hidrojellerin biyobozunurluk görüntüleri; **a**) mikrodalga yöntemiyle üretilen %12 (v/v) MA içeren grup **b**) mikrodalga yöntemiyle üretilen %4 (v/v) MA içeren grup **c**) geleneksel yöntemle üretilen %12 (v/v) MA içeren grup **d**) geleneksel yöntemle üretilen %4 (v/v) MA içeren grup.....64
- Şekil 4.11. Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle üretilen farklı MA oranlarına (%12 (v/v) ve %4 (v/v)) sahip hidrojellerin kuru temelde hesaplanan % şişme değerleri.....66
- Şekil 4.12. Mikrodalga ve geleneksel yöntemlerle üretilen %12 (v/v) ve %4 (v/v) MA oranlarına sahip hidrojellerin elastik modüllerini ifade eden grafik; %12 (v/v) MA oranına sahip geleneksel yöntemle üretilmiş hidrojel **kırmızı**; %4 (v/v) MA oranına sahip geleneksel yöntemle üretilmiş hidrojel **yeşil**; %12 (v/v) MA

oranına sahip mikrodalga yöntemle üretilmiş hidrojel **mor**; %4 (v/v) MA oranına sahip mikrodalga yöntemle üretilmiş hidrojel **mavi** renkte gösterilmiştir.....68

Şekil 4.13. Mikrodalga ve geleneksel yöntemlerle üretilen %12 (v/v) ve %4 (v/v) MA oranlarına sahip hidrojellerin viskoz modüllerini ifade eden grafik; %12 (v/v) MA oranına sahip geleneksel yöntemle üretilmiş hidrojel **kırmızı**; %4 (v/v) MA oranına sahip geleneksel yöntemle üretilmiş hidrojel **turuncu**; %12 (v/v) MA oranına sahip mikrodalga yöntemle üretilmiş hidrojel **sarı**; %4 (v/v) MA oranına sahip mikrodalga yöntemle üretilmiş hidrojel **yeşil** renkte gösterilmiştir.....69

Şekil 4.14. Mikrodalga ve geleneksel yöntemlerle üretilen %12 (v/v) ve %4 (v/v) MA oranlarına sahip hidrojellerin gerinim-elastik modülünü ifade eden grafik; %12 (v/v) MA oranına sahip geleneksel yöntemle üretilmiş hidrojel **sarı**; %4 (v/v) MA oranına sahip geleneksel yöntemle üretilmiş hidrojel **gri**; %12 (v/v) MA oranına sahip mikrodalga yöntemle üretilmiş hidrojel **turuncu**; %4 (v/v) MA oranına sahip mikrodalga yöntemle üretilmiş hidrojel **mavi** renkte gösterilmiştir.....71

Şekil 4.15. ATDC5 hücre hattının immünofloresan boyama görüntüsü. Yeşil renk aktin filamentlerini, kırmızı renk hücre çekirdeklerini göstermektedir.....73

Şekil 4.16. Hacimce %12 MA ile metakrilatlanmış, hücre içeren ve farklı yöntemlerle üretilen  $\kappa$ -CA hidrojellerin 7. gün SEM görüntüleri.....74

Şekil 4.17. Hacimce %12 MA ile metakrilatlanmış, hücre içeren ve farklı yöntemlerle üretilen  $\kappa$ -CA hidrojellerin 21. gün SEM görüntüleri.....75

Şekil 4.18. Geleneksel ve mikrodalga yöntemiyle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hücreli hidrojellerin 1. gün 10X büyütme görüntüleri (üstteki görüntüler), geleneksel ve mikrodalga yöntemiyle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hücreli hidrojellerin 21. gün 10X büyütme görüntüleri (alttaki görüntüler), yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ise ölü hücreleri göstermektedir.....76

- Şekil 4.19. Geleneksel ve mikrodalga yöntemiyle üretilen %4 ve %12 (v/v) MA oranlarına sahip hücreli hidrojellerin 1. gün 40X büyütme görüntüleri (üstteki görüntüler), geleneksel ve mikrodalga yöntemiyle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hücreli hidrojellerin 21. gün 40X büyütme görüntüleri (alttaki görüntüler), yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ise ölü hücreleri göstermektedir.....77
- Şekil 4.20. Mikrodalga yöntemiyle üretilen %12 (v/v) ve %4 (v/v) MA içeren hücreli grupların, geleneksel yöntemle üretilen %12 (v/v) MA içeren hücreli grubun 1. gün yüzde canlılık oranlarının bar grafiği ile ifade edilmesi; mikrodalga ve geleneksel yöntemlerle üretilen %12 (v/v) MA içeren hücreli grupların, 21. gün yüzde canlılık oranlarının bar grafiği ile ifade edilmesi (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu %4 (v/v) MA mikrodalga 1. gün ve %12 (v/v) MA mikrodalga 1. gün grupları iken %12 (v/v) MA geleneksel grup \*\* p<0.01; kontrol grubu %12 (v/v) MA mikrodalga grubu iken \*\* p<0.01).....78
- Şekil 4.21. Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle üretilen  $\kappa$ -CA hidrojellerinin hücre kültürünün 7. günündeki H&E boyama görüntüleri. Soldaki görüntüler geleneksel, sağdaki görüntüler mikrodalga grubudur. Üstteki görüntüler 10 X, alttaki görüntüler 40 X büyütmedir.....80
- Şekil 4.22. Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle üretilen  $\kappa$ -CA hidrojellerinin hücre kültürünün 21. günündeki H&E boyama görüntüleri. Soldaki görüntüler geleneksel, sağdaki görüntüler mikrodalga grubudur. Üstteki görüntüler 10 X, alttaki görüntüler 40 X büyütmedir.....81
- Şekil 4.23. Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hidrojellerinin hücre kültürünün 7. günündeki Safranin O / Fast Green boyama görüntüleri. Soldaki görüntüler geleneksel, sağdaki görüntüler mikrodalga grubudur. Üstteki görüntüler 20X, alttaki görüntüler 40X büyütmedir.....82
- Şekil 4.24. Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hidrojellerinin hücre kültürünün 21. günündeki Safranin O / Fast Green boyama

görüntüleri. Soldaki görüntüler geleneksel, sağdaki görüntüler mikrodalga grubudur. Üstteki görüntüler 20X, alttaki görüntüler 40X büyütmedir.....83

Şekil 4.25. Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle üretilen %12 (v/v) MA içeren hücreli hidrojel gruplarının 7. ve 21. günlerdeki GAG içeriğini belirten bar grafiği; \*, \*\* istatistiksel olarak anlamlı farklılık (n=3, kontrol grubu %12 (v/v) MA mikrodalga 7. gün iken %12 (v/v) MA mikrodalga 21. gün \*\* p<0.01; kontrol grubu %12 (v/v) MA geleneksel 7. gün iken %12 (v/v) MA geleneksel 21. gün \* p<0.05.....84

Şekil 4.26. Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hidrojellerin hücre kültürünün 21. günündeki kollajen II ve agregan boyama görüntüleri, 10 X büyütme. Kırmızı renk hücre çekirdeklerini, yeşil renk agregan ve kollajen II moleküllerini göstermektedir.....85

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\alpha$	<i>Alfa</i>
$\beta$	<i>Beta</i>
$\iota$	<i>Iota</i>
$\kappa$	<i>Kappa</i>
$\lambda$	<i>Lambda</i>
Ca	Kalsiyum
CO <sub>2</sub>	Karbon dioksit
dk	Dakika
H <sup>1</sup>	Proton
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum klorür
G'	Depo modülü
G''	Kayıp modül
KCl	Potasyum klorür
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
OH <sup>-</sup>	Hidroksil
Rad	Radyan
s	Saniye
sa	Saat
v/v	Hacim/hacim oranı
w/v	Ağırlık/hacim oranı

## Kısaltmalar

3B	Üç boyutlu
$\kappa$ -CA	<i>Kappa</i> carrageenan
ACI	Otolog kondrosit implantasyonu
BMP	Kemik morfojenetik proteini
CA	Carrageenan
CLSM	Lazer taramalı elektron mikroskobu
DMSO	Dimetil sülfoksit
DMEM	Dulbecco modifiye eagle ortamı
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPBS	Dulbecco fosfat tampon çözeltisi
ECM	Ekstraselüler matris
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FBS	Fetal sığır serumu
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GAG	Glikoaminoglikan
LAB	Lazer destekli biyoyazıcı
$^1\text{H-NMR}$	Proton nükleer manyetik rezonans
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-1- $\beta$	İnterlekün-1-beta
IRGACURE-2959 <sup>®</sup>	2-hidroksi-1-(4-(hidroksietoksi)fenil)-2-metil 1propanon
Jel-MA	Metakrilatlanmış Jelatin
MA	Metakrilik anhidrit
MA- $\kappa$ -CA	Metakrilatlanmış <i>kappa</i> carrageenan

OA	Osteoartrit
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü
PEG	Poli (etilen glikol)
RNA	Ribo nükleik asit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
UV	Mor ötesi
TGF- $\beta$	Transforme büyüme faktörü
TNF- $\alpha$	Tümör nekrozis faktör





# 1.GİRİŞ

Kıkırdak doku, fazla miktarda hücre dışı matris (ECM) ve az sayıda kondrositten oluşan; damar, sinir ve lenf içermeyen güçlü ve esnek yapıda bir bağ dokudur (Chung ve Burdick, 2008; Mori ve ark., 2018). Kıkırdak doku, damar içermediği için yenilenme (rejenerasyon) yeteneği sınırlıdır. Bu nedenle de bilim insanları uzun zamandır kıkırdak doku hasarlarının iyileştirilmesine yönelik çalışmaktadırlar (Doral ve ark., 2007). Özellikle osteoartrit (OA) ve osteoporoz gibi durumlardaki lezyonların tedavisi zordur. Klinikte uygulanan zorluklar nedeniyle kıkırdak doku hasarlarına yönelik doku mühendisliği yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Doku mühendisliği alanında malzeme, hücre ve biyosinyal molekülleri karışımlarının kontrollü olarak katman katman biriktirilmesi ile 3B yapıların oluşturulması **3B biyobaskılama** olarak adlandırılır (Demirtaş, Irmak ve Gümüşderelioğlu, 2017). Bu yöntem doku mühendisliği alanında giderek yaygınlaşarak, geleneksel doku mühendisliği uygulamalarının sınırlarını ortadan kaldırmıştır. Kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında da hasarlı bölgeye yönelik, biyolojik yapının yerini doldurmak üzere hücrelerin tutunmasına ve çoğalmasına izin verebilecek, doğal dokuyu taklit eden, geçici 3 boyutlu (3B) çok bileşenli yapıları geliştirmek amaçlanmaktadır. Bu 3B yapıların geliştirilmesi için 3B biyoyazıcılardan faydalanılmaktadır (Murphy ve Atala, 2014).

Tez kapsamında hücrelerle birlikte bu 3B yapıyı taklit etmek amacıyla doğal kaynaklı bir polimer olan *kappa* carrageenan ( $\kappa$ -CA) tercih edilmiştir.  $\kappa$ -CA'nın yapısı, glikozaminoglikan (GAG) yapıları ile büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. GAG'lar kıkırdak dokunun yapısında fazla miktarda bulunan moleküllerdir (Chung ve Burdick, 2008). Bu nedenle kıkırdak dokuya yönelik yeni bir biyoçözelti sunmak amacıyla  $\kappa$ -CA polimeri ile çalışılmıştır. Biyoçözeltilerin de 3B baskılanabilmesi için sahip olması gereken bir takım özellikleri vardır. Bunların başında uygun viskozite gelmektedir. Ardından, çapraz bağlama yöntemiyle mekanik dayanımı yeterli hidrojel elde edilmesi ve bu hidrojellerin hücreler farklılaşp kendi ECM'lerini salgılayana kadar bozunmaması beklenmektedir.  $\kappa$ -CA'nın özellikleri tek başına biyoçözelti olarak kullanılması için yeterli değildir. Bu nedenle, tez çalışması kapsamında öncelikle  $\kappa$ -CA'nın viskozitesinin ve  $\kappa$ -CA hidrojellerinin viskoelastik özelliklerinin iyileştirilmesi için çalışmalar yapılmıştır. Bunun için  $\kappa$ -CA literatürden

(Mihaila ve ark., 2013) farklı bir biçimde, yüksek güçte (1,000 W) ve kısa sürede (5 dk) uygulanan mikrodalga enerjisi yardımıyla metakrilik anhidrit (MA) ile fonksiyonlandırılmıştır.  $\kappa$ -CA'nın MA ile fonksiyonlandırma işlemi hacimce 2 farklı oranda (%4 ve %12) MA ile hem geleneksel hem de mikrodalga yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Metakrilatlanan  $\kappa$ -CA polimerlerinin M.D'leri hesaplanmış ve viskozite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ardından, foto-çapraz bağlama için polimerler IRGACURE-2959® yardımıyla UV varlığında çapraz bağlanmış ve hidrojel elde edilmiştir. Elde edilen hidrojellerin viskoelastik özelliklerinin belirlenmesi için reolojik analizler, 30 günlük biyobozunurluk ve su tutma kapasitesi (şişme) ölçümü gerçekleştirilmiştir. Ardından, metakrilatlanan  $\kappa$ -CA polimerleri, uygun koşullarda ATDC5 hücreleri ile karıştırılarak biyoçözelti oluşturulmuş ve 3B baskılama işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında biyoçözelti, UV maruziyeti ile çapraz bağlanarak hücre içeren hidrojeller elde edilmiştir. Elde edilen hücre yüklü hidrojeller *in vitro* farklılaşma ortamında 21 gün boyunca kültüre edilmişlerdir. Kültürün belirli günlerinde alınan örneklerle de SEM görüntülemesi, canlı-ölü analizi, Safranin O boyaması ve diğer immünohistokimyasal ile immünositokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, kıkırdak doku oluşumu açısından değerlendirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, sunulan tezin temel aldığı konularla ilgili literatür bilgisi verilmiştir. Öncelikle, kıkırdak dokunun özellikleri, kıkırdak doku mühendisliği, kıkırdak doku hasarlarına yönelik klinikte uygulanmakta olan çalışmalarla ilgili bilgiler verilmiştir. Sonrasında, 3 boyutlu (3B) biyobaskımanın temeli, biyoyazıcı çeşitleri ve biyoçözültide olması gereken özellikler açıklanmıştır. Ardından hidrojel ile ilgili detaylı bilgi sunulmuştur. Son olarak, *kappa* carrageenan ( $\kappa$ -CA) polimeri ve mikrodalga teknolojisi ile ilgili literatür bilgileri verilerek genel bilgiler sonlandırılmıştır.

### 2.1. Kıkırdak Dokunun Yapısı ve Özellikleri

Kıkırdak doku temel olarak burun, kulak, trake, eklem ve intervertebral disk dahil olmak üzere vücudun çeşitli bölgelerinde yaygın olarak bulunur. Bağ doku yapısında olup, kemiğe yapışık olarak bulunur. Kalınlığı eklem yerine göre farklılık göstermekle birlikte 1-6 mm arasında değişir. Kıkırdak doku, vücut şeklinin korunmasında önemli bir rol oynar. Özellikle eklem kıkırdağı, temas eden kuvvetleri desteklemek ve sürtünmeyi azaltmak için özelleşmiş olan anizotropik bir dokudur (Doral ve ark., 2007; Almeida ve ark., 2017; Hoshi ve ark., 2018).

Kıkırdak doku fazla miktarda hücre dışı matris (ECM) ile az sayıda kondrosit hücrelerinden meydana gelir. Kondrositler, kollajen, glikoproteinler, proteoglikanlar ve hiyalüronan gibi büyük hacimli ECM bileşenlerini sentezleyen, metabolik olarak aktif hücrelerdir. Kondrositlerin metabolik aktiviteleri pek çok etkene bağlı olmakla birlikte sitokinlerden ve büyüme faktörlerinden daha fazla etkilenirler. Bu faktörler ECM'deki makromoleküllerin yapım ve yıkımını etkiler. Tüm kıkırdak tiplerinde yer alan temel moleküller; kollajen (tip II, tip IV, tip IX, tip XI) hiyalüronik asit, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlardır (GAG). Kondrositler, kıkırdağın devamlılığını sağlamak ve kıkırdağı korumak için ECM salgılar ve ECM'i çoğaltırlar (Akkiraju ve Nohe, 2015).

Kıkırdak doku ECM'i büyük miktarda proteoglikan, tip II kollajen ve su içerir. Bu içerik kıkırdak doku çeşidine bağlı olarak değişir. Fakat temel olarak bu bileşenler, kıkırdak dokuda diğer bileşenlere göre daha fazla bulunur. Yüksek hidrasyon derecesi ve matris içindeki suyun hareketi, kıkırdak matrisinin değişken basınç yüklerine cevap vermesini sağlar ve

kıkırdağın yük taşıma kapasitesine katkıda bulunur. ECM yapısı doku işlevselliği açısından önemlidir. Çünkü ECM, gömülü kondrositler için bir sinyal dönüştürücü görevi görür. Böylelikle, kıkırdakta sinoviyal eklemlere uygulanan basınç, kondrositlerin aktivitesini yönlendirmeye yardımcı olan mekanik, elektriksel ve kimyasal sinyaller oluşturur (Mardones, Jofre ve Minguell, 2015).

**Kollajenler**, ECM'nin en bol bulunan makromolekülleridir. Kıkırdak kuru ağırlığının %60'ını oluşturur ve kayma gerilimine dayanım sağlar. Ayrıca kollajenler, matrisin kararlı kalmasını da sağlar. **Kollajen tip II**, ECM'deki kollajenin %90-95'ini oluşturur ve proteoglikan benzeri agreganlarla dokunmuş fiberler ve lifler oluşturur. Kollajen tip II, yüksek miktarda bağlı karbonhidrat grubu içerdiği için su ile etkileşime diğer türlere göre daha fazla izin verir. **Kollajen tip IX ve XI** ise özellikle eklem kıkırdağında yer alır. Kollajen fibriller arası ağsı yapılara ve çapraz bağlanmaya destek olur. Ayrıca, gerilme mukavemeti de sağlar. Kıkırdak dokunun derin bölgesinde ise kondrositler biraz daha farklılaşarak aktif olarak **kollajen tip X** sentezler. Bu nedenle kalsifiye olmaya yakın, arayüzey bölgelerde kollajen tip X'e daha fazla rastlanır.

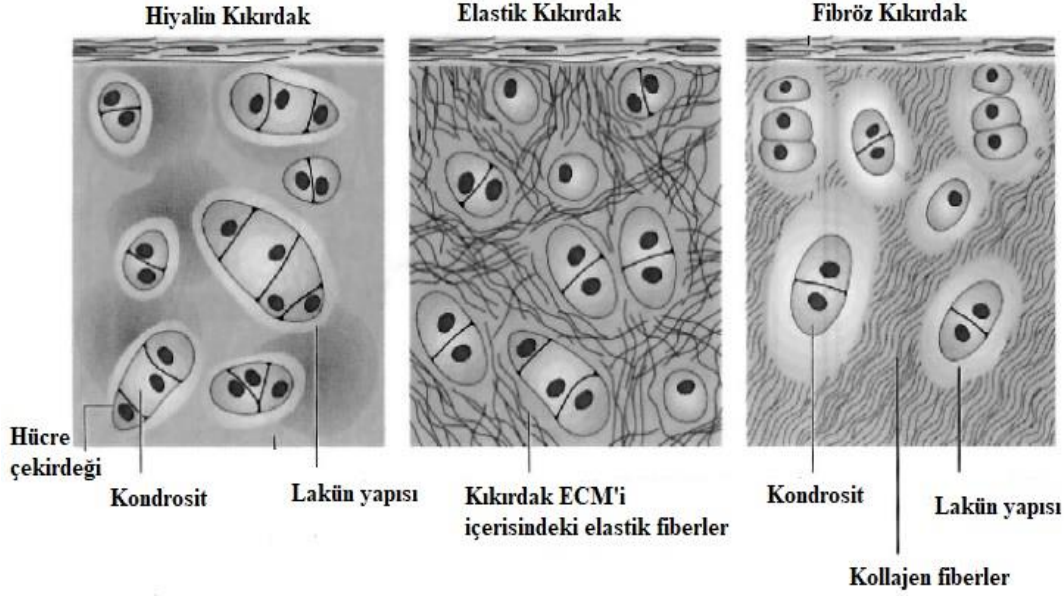
**Proteoglikanlar** ise kıkırdak matriksi içerisindeki en yüksek miktardaki ikinci makromolekül grubunu temsil eder. Yüzde doksan beş (%95) polisakkaritlerden ve %5 proteinlerden oluşurlar. Suyu çektiği için özellikle eklem kıkırdağında yük dayanımı açısından önemlidir. Bu proteoglikanlar: **GAG'lar, dekorin, agregan ve biglikandır. Hyalüronik asit, kondrotin sülfat, keratan sülfat, dermatan sülfat ve heparan sülfat** ise genel olarak kıkırdak dokuda bulunan GAG'lardandır.

ECM'de **kollajen olmayan proteinler** de bulunur. Bunlar **glikoproteinlerdir**. ECM'i kararlı kılmaya ve kondrosit-matriks etkileşimine yardımcı olurlar. Ayrıca, ECM'de su haricinde **doku sıvısı** da mevcuttur. Bu sıvı, çeşitli gazlar, metabolitler ve çok miktarda da katyonları içerir. GAG'lar eksi yüklü oldukları için bu katyonlar, GAG'ları dengeler. Doku sıvısı sayesinde doku, sıkıştırmaya direnç gösterir ve deformasyondan sonra normal şekline döner (Temenoff ve Mikos, 2000).

Büyüme faktörleri, mezenkimal kök hücrelerin kıkırdak dokuya farklılaşması ve ECM sentezini indüklemesi açısından önemlidir. Ayrıca kondrositlerin kollajen tip X

ekspresyonundaki değişim proteolitik enzim üretiminin düzenlenmesini de sağlar. ECM'nin bileşimi, kondrositlerin organizasyonu ve sitokinler gibi dış etkenlere verdikleri cevap, dokunun yaşına bağlıdır. Ancak, kondrosit sayıları değişmeden kalır. ECM'deki su azalışı ise dokuya sertlik kazandırır ve yapının işlevselliğini azaltır. Yaşlanan kıkırdakta görülen bu gibi genel yapısal değişiklikler, osteoartrit (OA) gibi hastalıkların gelişimine neden olur (Akkiraju ve Nohe, 2015).

Anatomik konum, ECM bileşimi ve işlevleri temel alındığında üç tip kıkırdak vardır. **Hiyalin kıkırdak**, solunum yollarında, burunda, uzun ve kısa kemik uçlarında bulunur. Beyaz ve camsı bir görünüme sahiptir. ECM içerisinde su, hiyalüronat, proteoglikanlar ve tip II kollajen yer alır. Hiyalin kıkırdağın temel işlevi minimum sürtünme ile kararlı hareketi sağlamaktır. Hiyalin kıkırdağın viskoelastisitesi oldukça yüksektir. Sıkışmaya karşı dirençlidir. Ayrıca, hareketten kaynaklanan yükü de hafifletmektedir. **Elastik kıkırdak**, ECM içerisindeki elastinin varlığı ile diğer kıkırdak çeşitlerinden ayırt edilir. Elastik kıkırdak, kulakta olduğu gibi daha çok yapısal fonksiyon sağlar. Kulak kepçesinde, işitme kanallarında, östaki borusunda, burun kanatlarında bulunur. **Fibröz kıkırdağın** ECM'inde ise tip I kollajen miktarı daha yüksektir. Fibröz kıkırdak, menisküs ve omurlararası disklerde ve tendonların ve bağların distal bölgesinde bulunur. Çekme ve sıkıştırma mukavemeti sağlar, kayma gerilimine karşı koruyucu görev üstlenir (Faust, Guove ve Elisseeff, 2019). Şekil 2.1'de kıkırdak doku tipleri şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Kıkırdak doku çeşitlerinin ve doku organizasyonunun şematik gösterimi (Kikuchi ve Kanama, 2007).

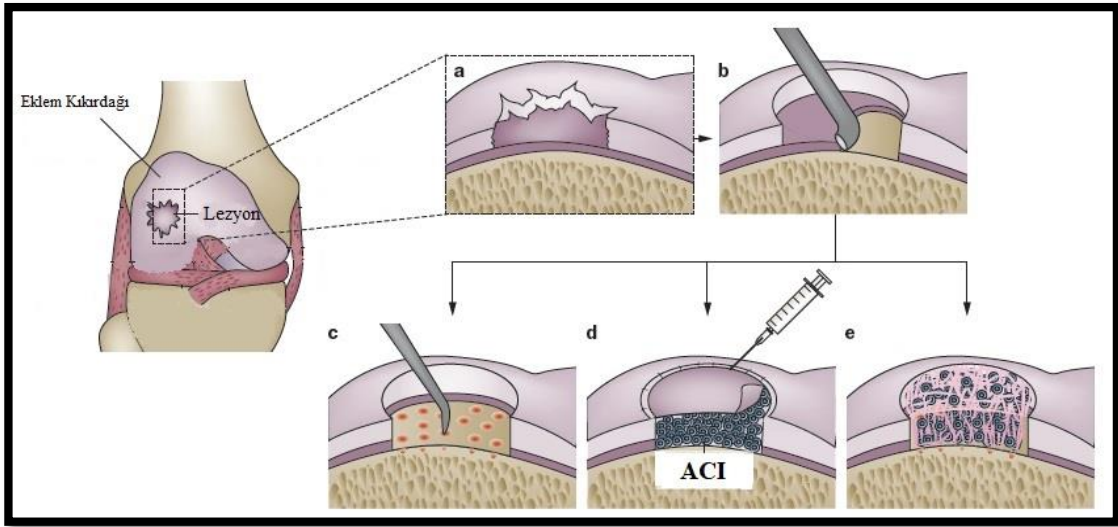
Kıkırdak dokunun yenilenme kapasitesi oldukça düşüktür. Dolaşım, vücuttaki normal iyileşme sürecinin kritik bir parçasını oluşturur. Kıkırdak doku damar içermediği için iyileşme ile ilgili onarım tepkileri vücut tarafından baskılanır. Kondrositler lakünün içinden göç edip hasarlı bölgeye gidemedikleri için onarım süreci başlayamaz. Ayrıca hasarlı kıkırdak dokusunda ECM sentezi de oldukça yavaştır (Akkiraju ve Nohe, 2015). Kıkırdak dokunun yenilenme kapasitesinin düşük olması, kıkırdak dokuya yönelik çalışmaları arttırmıştır. Hem klinikte uygulanan çalışmalar hem de bilimsel araştırmalarda ilerleme kaydedilmiş çalışmalar genel olarak aşağıdaki başlıklarda sunulmuştur.

## 2.2. Kıkırdak Doku Hasarlarına Yönelik Klinik Çalışmalar

Kıkırdak doku hasarlarında; kondral ve osteokondral lezyonlar genellikle ağrı ve şişlik şeklinde ortaya çıkar. Ardından eklem dejenerasyonu ve sonunda OA görülür (Almeida ve ark., 2017). Halen 75 milyon insanın Avrupa, ABD ve Japonya'da osteoporoz yaşadığı, 27 milyonunun ise sadece ABD'de OA'dan etkilendiği tahmin edilmektedir (Mori ve ark., 2018). Kıkırdak dokunun kendini yenileme kapasitesi yeterli olmadığından dolayı, hasarlarda genelde cerrahi işlemlere gerek duyulur (Boushell ve ark., 2016). Bunlar;

lezyonun yumuştırılması ve debridman yoluyla gevşek dokunun çıkarılması, lezyon içindeki yara dokularının temizlenmesi, mikrofraktür tekniği ile mezenkimal kök hücrelerin hasarlı bölgeye göç etmesinin sağlanması, stimülasyon teknikleri ve mozaikplasti gibi işlemlerdir.

Klinikte hücre bazlı tedaviler, otolog kondrosit implantasyonu (ACI), matris ile birlikte kondrosit implantasyonu ve erişkin kök hücrelerin kullanımı da yaygınlaşmaktadır. Rejeneratif tıp alanında kıkırdağa yönelik ACI tüm dünyada da yaygınlaşmıştır. ACI, 1987'den beri hastalarda klinik kullanımdadır ve dünya çapında 12,000'den fazla hasta üzerinde gerçekleştirilmiştir. ACI, hastalarda ağrıyı önemli ölçüde azaltmıştır. Hatta dayanıklı kıkırdak benzeri doku oluşumunun gerçekleştiği raporlarda belirtilmiştir (Mobasheri ve ark., 2014; Makris ve ark., 2015; Hoshi ve ark., 2018). Klinikte uygulanan bu yöntemler Şekil 2.2'de şematik gösterimde özetlenmiştir.



Şekil 2.2. Eklem kıkırdağı hasarına yönelik klinikte uygulanan yöntemler: a) kıkırdak lezyonu şematik gösterimi; b) debridman yöntemi ile iyileştirme; c) mikrofraktür yöntemi ile kemikteki mezenkimal kök hücrelerin hasarlı bölgeye göç etmesini sağlama; d) ACI implantasyonu; e) matris ile desteklenmiş otolog kondrosit hücre transplantasyonu (Makris ve ark., 2015).

Klinikte uygulanan yöntemlerin çoğu hastaları geçici olarak rahatlatır. Klinikte, geleneksel olarak ilaç tedavileri, cerrahi işlemler ve/veya fizik tedavi uygulamaları mevcuttur. Ototogreftler altın standart olmasına rağmen sınırlı donör dokusu, donör bölgenin de

yaralanması, ağrı ve inflamasyon oluşumu gibi olumsuzlukları mevcuttur. Bu nedenle de tedavilerin başarıları sınırlıdır. Klinik uygulamalarındaki başarısızlıklar ve olumsuzluklar kırıkta doku mühendisliği uygulamalarına olan ihtiyacı arttırmıştır. Diğer bölümde, kırıkta doku mühendisliği ile ilgili detaylı bilgiler sunulmuştur.

### **2.3. Kırıkta Doku Mühendisliği**

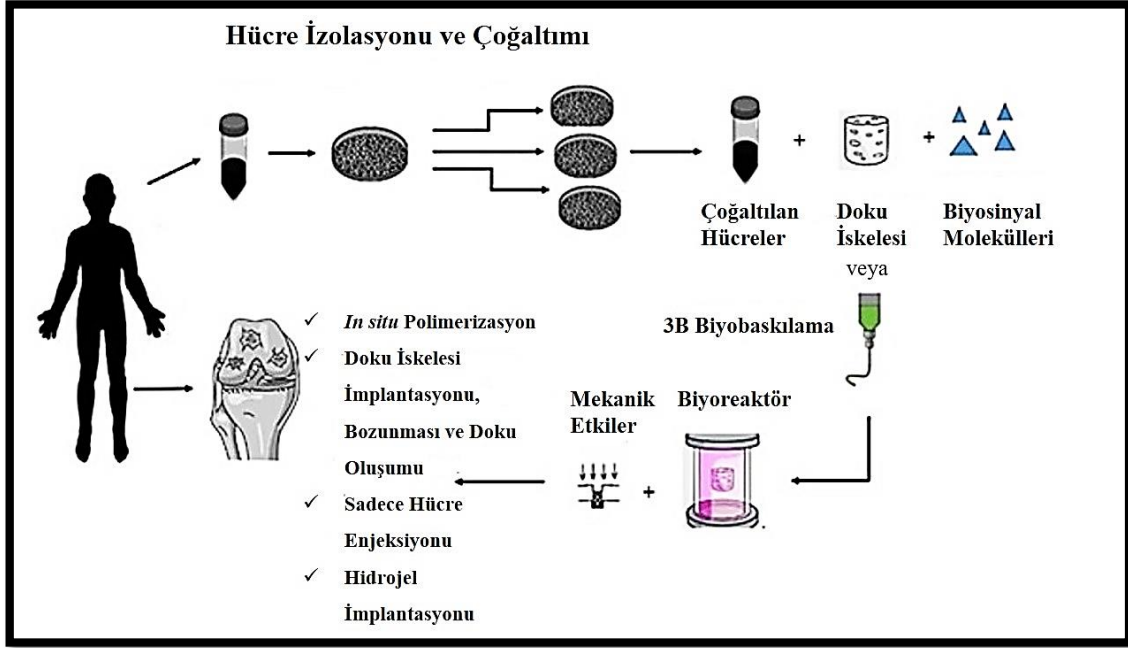
Doku mühendisliği; uygun hücreleri, biyosinyal moleküllerini, doku iskelelerini ve gerekli kültür koşullarını birleştirerek dokuya özgü tedavi yöntemi sunmayı hedefleyen bir yaklaşımdır. Bu amaçla mühendislik bilimlerini, ve yaşam bilimlerini dokuya veya tüm organa yönelik biyolojik ikamelerin geliştirilmesine ve *in vitro* uygulamalar için gerçekçi doku yapılarının üretimine uygulayan çok disiplinli bir alandır. Doku mühendisliği yaklaşımları günümüzde “aşağıdan-yukarı (bottom-up)” ve “yukarıdan-aşağı (top-down)” olmak üzere 2 farklı şekilde uygulanmaktadır. Yukarıdan-aşağı uygulamalar, doku iskelesi temeline dayanır. Aşağıdan-yukarı uygulamalar ise mikro ölçekteki doku bloklarının daha büyük dokuları oluşturmak üzere çeşitli fabrikasyon yöntemleriyle bir araya getirilmesi temeline dayanır. Örnek olarak 3B biyobaskılama aşağıdan-yukarı doku mühendisliği uygulamalarına bir örnektir. (Guillotin ve Guillemot, 2011; Demirtaş, 2016).

Kırıkta doku mühendisliği, laboratuvar koşullarında kırıkta doku üretimini ifade eder. Günümüzde doku mühendisliği sayesinde kişiye özel tedaviler gündeme gelmiştir. Birinci nesil olarak uygulanan altın standart allojenik hücre kullanımınıdır. İkinci nesil uygulamalarda sadece malzeme önem kazanmıştır. Doku mühendisliğinde hücreler ve biyomalzeme birleştirilmiştir. Bu bağlamda, üçüncü nesil doku mühendisliği uygulamalarında amaç: *in vitro*'da doku yenilenmesini sağlamak, bunun için de hücreler ile birlikte biyomalzeme ve biyosinyal molekülleri de kullanmaktır (Risbud ve Sitter, 2002).

Kırıkta doku mühendisliği çalışmaları kapsamında; yalnız hücreler, yalnız greftler (doku iskeleleri), yalnız biyosinyal molekülleri ve/veya bunların kombinasyonları şeklinde çalışmalar yapılmakta ve yapılan bu çalışmalar geliştirilmektedir. Rejeneratif tıp alanında kırıkta dokuya yönelik olarak etkili çözümler incelendiğinde hücrelerle birlikte biyomalzeme kullanımının daha iyi olacağı savunulmaktadır (Hoshi ve ark., 2018). Son



yıllarda, doku mühendisliğinde kırık dokuya yönelik umut verici çalışmalar mevcuttur. Kırık doku greftleri ve biyoreaktör sistemleri ile desteklenmiş *ex vivo* greftler optimize edilerek çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. Bu çalışmalar genel olarak Şekil 2.3'te şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.3. Kırık dokuya yönelik doku mühendisliği uygulamalarının şematik gösterimi.

Kırık doku için kullanılan hücrelerin morfolojilerinin, çoğalma kapasitelerinin, protein ve gen ekspresyonlarının orjinal dokuya yakın olması istenmektedir. Bu nedenle de kırık doku mühendisliği çalışmalarında en çok kullanılan hücrelerin başında kondrositler ve kök hücreler gelmektedir. Kondrositler, doku mühendisliğinde özellikle eklem kırık dokuya yönelik uygulamalarda kullanılmaktadır. Kök hücreler ise yüksek bölünme ve farklılaşma kapasitesine sahiptirler. Bu nedenle, kök hücreler uygun farklılaşma ortamı ve biyosinyal molekülleri varlığında kırık dokuya yönelik çalışılmaktadır. Kliniğe yönelik çalışmalarda hücrelerin hastadan alınarak çoğaltılması altın standarttır. Bilimsel araştırmalarda ise hücreler, canlılardan alınıp çoğaltılabileceği gibi ticari hücre hatları da kullanılmaktadır. Kırık doku mühendisliği çalışmalarında hedef, hücrelerin farklılaşarak mikro yapıda veya istenen yapıda kırık doku oluşturmasıdır. Bu nedenle, hücrelerin birbirleriyle ve

çevreleriyle etkileşimi önemlidir. Tek tabakalı (monolayer) kültürlerde bu etkileşimi sağlamak kolay olmamaktadır. Bu nedenle doku farklılaşması için hücrelerle birlikte biyosinyal molekülleri de kullanılmaktadır. Biyosinyal molekülleri, çeşitli hücre yolakları aracılığıyla hücreleri uyararak farklılaşmayı tetikler.

Aşağıda Kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan hücreler özetlenmiştir.

- ✓ **Kondrostitler:** Kıkırdak doku çalışmalarında kullanılan en temel hücrelerdir. Vücuttan izole edildikten sonra farklılaşma yeteneklerini yitirmektedirler. Tekrar farklılaşmalarını sağlamak amacıyla TGF- $\beta$  (Transforme Edici Büyüme Faktörü), BMP-2, 7 (Kemik Morfogenetik Protein), IGF (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü) ve FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü) de kullanılmaktadır. Farklılaşmış kondrostitler küresel morfolojide olup GAG ve kollajen II makromoleküllerini sentezlemektedirler.
- ✓ **Embriyonik kök hücreler:** Yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahiptirler. Embriyonik kök hücrelerle yapılan çalışmalarda bu hücrelerin kardiyomyosit, adiposit, kondrosit, osteoblast ve nöronlar gibi çeşitli hücre tiplerine farklılaştığı bildirilmiştir. Embriyonik kök hücrelerde karşılaşılan problemlerin başında etik sorunlar gelmektedir. Ayrıca, embriyonik kök hücrelerin farklılaşmasının hedeflendiği hücrelere seçici olarak tam olarak farklılaşmadığı ve tümör benzeri yapılar oluşturduğu da literatürde yer alan problemlerdendir. Bu da klinik uygulamalarda hasta için immünolojik yanıt riskini arttırmaktadır.
- ✓ **Mezenkimal kök hücreler:** Mezenkimal kök hücreler, mezenkimal doku hücrelerine dönüşebilen hücrelerdir, ve kondrosit, osteoblast, fibroblast ve diğer mezenkim kaynaklı hücrelere dönüşebilmektedirler. Bu hücrelerin canlıdan izole edilmesi kondrosit hücrelerine göre daha kolaydır. Kemik iliği, kas ve adipoz dokulardan elde edilebilirler. Farklılaşma potansiyellerini ancak çok sayıda pasaj ile kaybedebilirler. Fakat sayı olarak az elde edildikleri için *in vitro*'da farklılaşma ortamı içerisinde biyosinyal molekülleriyle desteklenmeleri gerekir. Kıkırdak dokuya yönelik

mezenkimal kök hücre çalışmalarında FGF, TGF- $\beta$ , BMP-2 ve IGF'in kullanılarak kondrogenез ve kollajen II sentezi için olumlu olduğu literatürde rapor edilmiştir.

- ✓ **ATDC5 kondrojenik hücre hattı:** Fare embriyonik karsinoma hücre hattıdır. Kıkırdak öncül hücreleri de denmektedir. Tek tabaka (monolayer) hücre kültüründe çoğaltıldıklarında fibroblastik morfolojidedirler. Farklılaştıklarında ise küresel morfoloji sergilemektedirler. TGF- $\beta$  gibi büyüme faktörleri ve çeşitli biyosinyal molekülleri varlığında yüksek farklılaşma kapasitesine sahiptirler. ATDC5 hücre hattı kıkırdak doku çalışmaları için model olarak kullanılan bir hücre hattıdır.

Kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan biyosinyal molekülleri özetlenmiştir:

- ✓ **Sitokinler** bağışıklık sistemi hücreleri tarafından salgılanmaktadır. TNF- $\alpha$  (Tümör nekroz faktör-alfa) ve IL-1 $\beta$  (İnterlekün-1 beta) kıkırdak doku mühendisliğinde en sık kullanılan sitokinlerdir. Matris dengesi için önemlidir.
- ✓ **Büyüme faktörleri** hücreler tarafından salgılanarak çevre hücreleri etkileyen moleküllerdir. Direkt hücreleri etkileyebileceği gibi dolaylı yoldan da etki mekanizmalarına sahip olabilirler. TGF- $\beta$ 1, IGF-1, BMP-2, FGF, PDGF (trasnsforme edici büyüme faktörü), EGF (epidermal büyüme faktörü) gibi büyüme faktörleri de kıkırdak doku farklılaşma çalışmaları için önemlidir. Farklılaşma, kondrosit çoğalımı, ECM sentezi gibi önemli etkileri vardır. En çok kullanılan ise TGF- $\beta$ 1'dir.

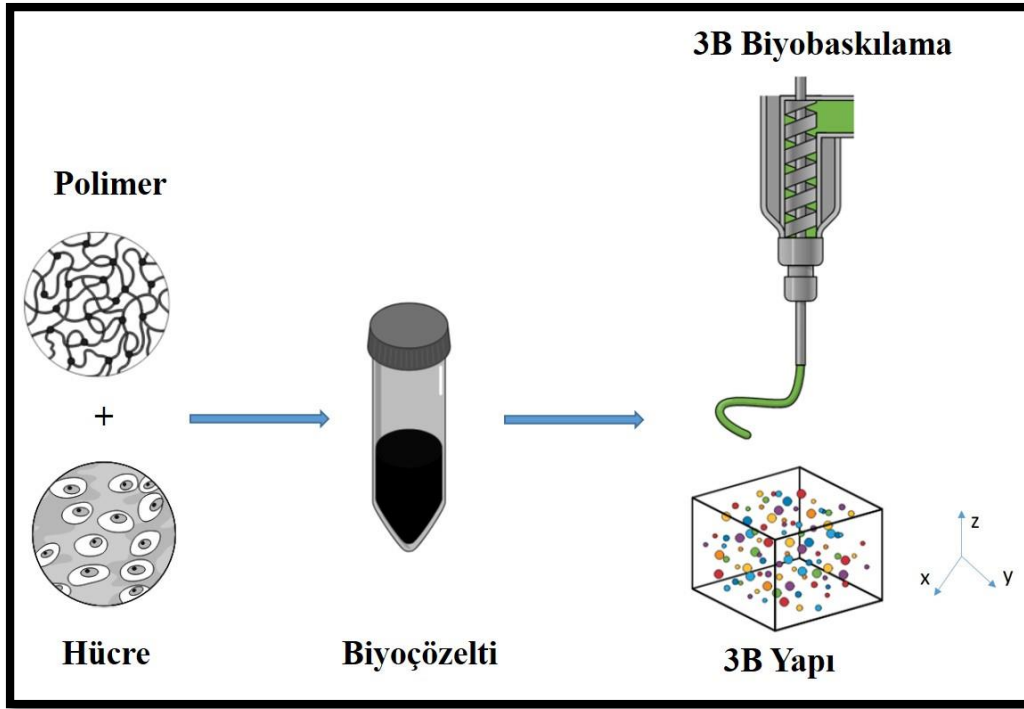
Yukarıda özetlenen biyosinyal molekülleri dışında ise malzeme yapışmasını ve tutunmasını arttırmak amacıyla da kullanılan çeşitli biyosinyal molekülleri mevcuttur. Fibronektin, laminin gibi proteinler ve çeşitli kısa zincirli peptidler bunlara örnektir (Tıǧlı, 2009).

Orijinal doku yapısı hedeflendiği için doku en iyi şekilde taklit edilmelidir. Dokuyu en iyi şekilde taklit edebilmek için 3B yapı önemlidir. Bu nedenle de 3B biyobaskılama teknikleri, hidrojel, doku iskeleleri kıkırdak doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilmektedir. Kıkırdak doku çalışmalarında en çok kullanılan malzeme grubu hidrojel, doku iskeleleridir. Kıkırdak dokuda olduğu gibi hidrojel, doku iskelelerin de su tutma kapasitesi yüksektir. Bu amaçla kullanılan malzemeler ise genelde polisakkaritler (kitosan, aljinat vb.) veya protein bazlı doğal malzemelerdir (jelatin, kollajen gibi). Bu malzemelerin tercih edilmelerinin en önemli

sebepleri biyouyumlu ve biyobozunur olmalarıdır. Sentetik olarak ise polietililen glikol (PEG) tercih edilmektedir (Armiento ve ark., 2018).

#### 2.4. 3B Biyobaskılama (Bioprinting)

Üç boyutlu baskılama ilk olarak 1986’da Charles W. Hull. tarafından tanımlanmış olup, malzemelerin istenilen şekillerde ince tabakalar halinde 3B katı bir yapı oluşturma esasına dayanır. İlerleyen zamanlarda bu uygulama doku mühendisliğine de uyarlanmıştır. Sadece doku iskelesi ile başlayıp canlı hücrelerle de devam eden bu uygulama “biyobaskılama” adını almıştır. Son haliyle 3B biyobaskılama (bioprinting); biyomalzemelerin, canlı hücrelerin ve biyosinyal moleküllerinin katman katman, istenilen şekil, miktar ve fonksiyonda üretilmesidir. Şekil 2.4’te 3B biyobaskılama şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Üç boyutlu biyobaskılamanın şematik gösterimi.

İstenilen dokuyu en doğru biçimde taklit edebilmek için 3B biyobaskılamadan faydalanılır. Bunun haricinde, hücreleri katman katman baskılayarak; doku iskelesiz, doğal ECM’li doku mühendisliği çalışmaları da 3B biyobaskılama ile yapılır. Ayrıca; mini doku ve organ oluşturma, damarlanmanın sağlanması ile doku veya organa fonksiyonellik kazandırma

çalışmaları, “organ-on-chip” çalışmaları için de 3B biyobaskılamadan faydalanılır (Murphy ve Atala, 2014; Demirtaş, 2017).

## 2.5. Biyoyazıcı Çeşitleri

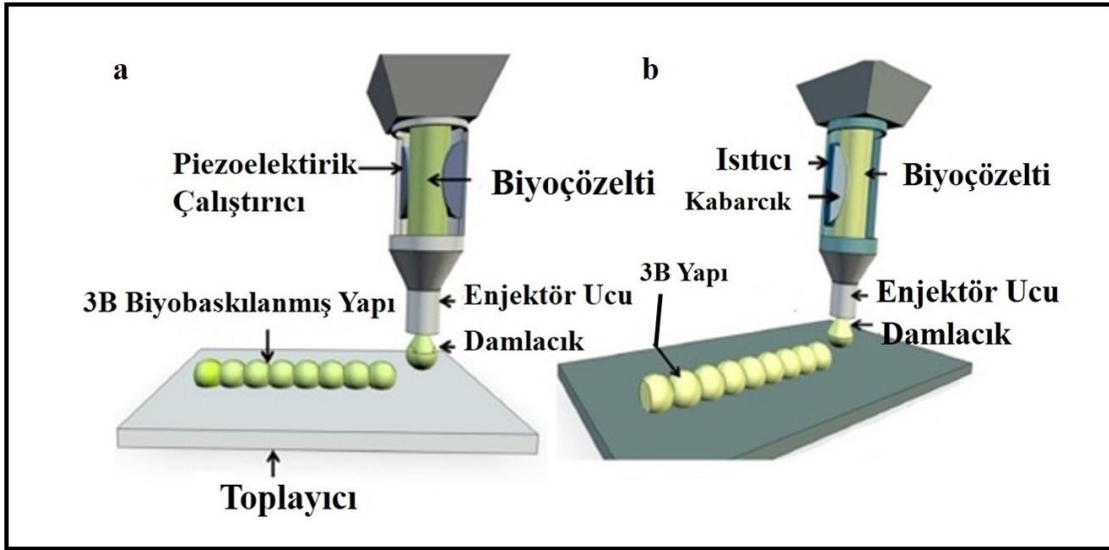
3B biyoyazıcı için kullanılan ana teknolojiler temel olarak; püskürtmeli (inkjet), mikro ekstrüzyon ve lazer desteklidir. Bu teknolojilerin seçimi; yüzey çözünürlüğü, hücre canlılığı ve baskı için kullanılan biyolojik materyaller gibi önemli faktörler ışığında düşünülmelidir. Biyoyazıcı çeşitlerinin karşılaştırmalı özellikleri Çizelge 2.1’de özetlenmiştir (Murphy ve Atala, 2014).

Çizelge 2.1. Biyoyazıcı çeşitlerinin karşılaştırmalı özellikleri.

Özellik	Ekstrüzyon	Lazer Destekli	Püskürtmeli
<b>Maliyet</b>	Ortalama	Yüksek	Düşük
<b>Malzeme Viskozitesi</b>	Yüksek Viskozite ve Geniş Aralık (30-6x10 <sup>7</sup> mPa.s)	Orta-Yüksek (1-300 mPa.s)	Orta (3.5-12 mPa.s)
<b>Baskı Hızı</b>	Sürekli / Yavaş (10–50 µm/s)	Orta / Hızlı (200-1,600 mm/s)	Hızlı (10,000 damla/dk)
<b>Üretim Süresi</b>	Kısa	Uzun	Orta
<b>Hücre Canlılığı</b>	%40 - %95	%95’in üzerinde	%85’in üzerinde
<b>Hücre Yoğunluğu</b>	Yüksek (Hücre sferoidleri şeklinde)	Orta 10 <sup>8</sup> hücre / mL	10 <sup>6</sup> ‘dan (hücre/mL) düşük
<b>3B Oluşturma Yeteneği</b>	Yüksek	Orta	Düşük

### 2.5.1. Püskürtmeli (ink-jet) Biyoyazıcılar

Püskürtmeli biyoyazıcılar hem biyolojik hem de biyolojik olmayan uygulamalar için en çok kullanılan baskılama teknolojisi ve yazıcı türüdür. İstenilen sıvı hacmi önceden yer belirlenmiş lokasyonlarda konumlandırılır. Biyobaskılama uygulamaları için kullanılan ilk püskürtmeli yazıcılar, piyasada satılan 2 boyutlu mürekkep tabanlı yazıcıların değiştirilmiş versiyonları olup, kartuştaki mürekkep yerine biyolojik bir malzeme kullanılmıştır. Z eksenini (x ve y eksenlerine ek olarak üçüncü boyut) kontrolünü sağlamak için elektronik olarak kontrol edilen bir asansör geliştirilmiştir. Son zamanlarda ise inkjet bazlı biyoyazıcılar artan çözünürlük, hassasiyet ve hızda biyolojik materyalleri işlemek ve basmak için özel olarak tasarlanmıştır, termal ve piezoelektrik prensibi ile çalışan çeşitleri mevcuttur (Murphy ve Atala, 2014). Püskürtmeli biyoyazıcı çeşitleri ve çalışma prensipleri Şekil 2.5'te gösterilmiştir.

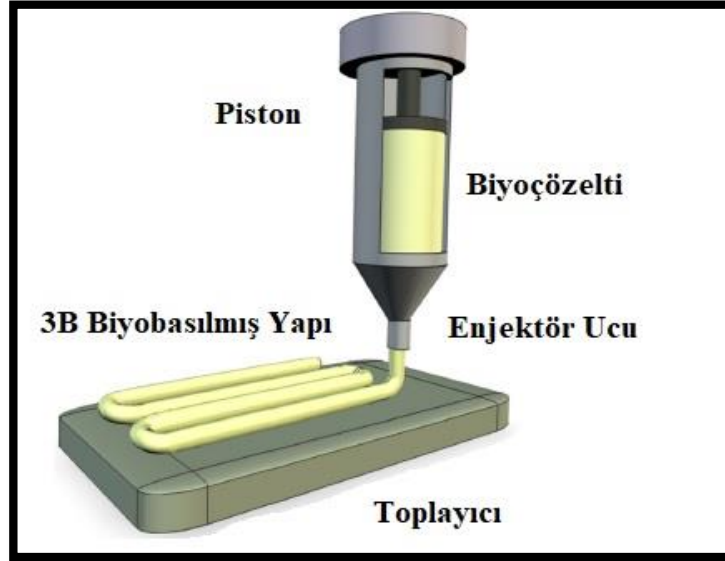


Şekil 2.5. Püskürtmeli biyoyazıcıların işleyişinin şematik gösterimi; a) piezoelektrik b) termal (Irvine ve Venkatraman, 2016).

### 2.5.2. Ekstrüzyon Biyoyazıcılar

Ekstrüzyon biyoyazıcılar doku mühendisliği uygulamaları için klinikte ve laboratuvar çalışmalarında en çok kullanılan biyoyazıcı teknolojisidir. Mikro ekstrüzyon, sıvı

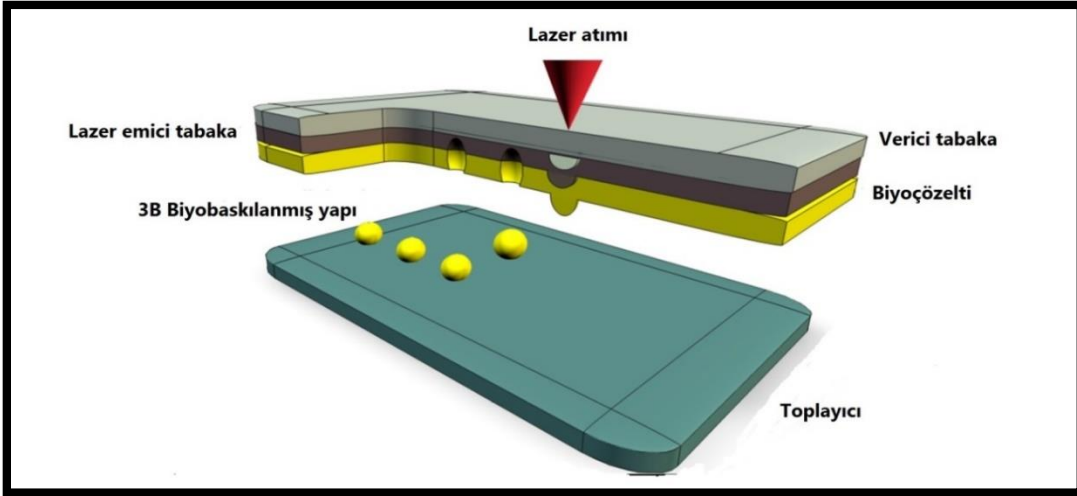
damlacıklardan ziyade sürekli malzeme boncukları verir. Malzemenin küçük boncukları, CAD-CAM yazılımı tarafından yönlendirilerek 2 boyutta biriktirildikten sonra mikro ekstrüzyon başlığı, Z eksenini boyunca hareket eder. Böylece, birikmiş olan tabaka, bir sonraki tabaka için bir temel görevi görür. Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemelerin çoğu, hidrojeller, biyouyumlu kopolimerler ve hücre sferoidleri gibi malzemeler mikro ekstrüzyon yazıcılarla uyumludur. Bu tür yazıcılar, viskozitesi yüksek malzemelerde daha çok tercih edilir. Pnömatik ve mekanik (pistonlu veya vidalı) olmak üzere farklı türleri vardır. Mikro ekstrüzyon biyobaskılama teknolojisinin ana avantajı, çok yüksek hücre yoğunlukları biriktirme kabiliyetine sahip olmasıdır. Doku mühendisliği çalışmalarında fizyolojik hücre yoğunluklarının elde edilmesi önemlidir. Hatta bazı çalışmalarda sadece hücreler kullanılarak 3B baskılama yapılır. Böylece hem istenilen şekil ortaya konur, hem de hücre sferoidlerinin kendiliğinden düzenlenmesi sağlanır. Yapı bloklarının viskoelastik özelliklerine bağlı olarak, hücre agregatları birbiriyle kaynaşarak, uyumlu bir makroskopik yapı oluşturmaktadır. Mikro ekstrüzyon biyoyazıcılar; aort kapakçıkları, dallı vasküler yapılar, *in vitro* farmakokinetik ve aynı zamanda tümör modellerini içeren çok sayıda doku türünü imal etmek için kullanılmıştır (Murphy ve Atala, 2014). Ekstrüzyon biyoyazıcının şematik gösterimi Şekil 2.6'da verilmiştir.



Şekil 2.6. Ekstrüzyon biyoyazıcının işleyişinin şematik gösterimi.

### 2.5.3. Lazer Destekli Biyoyazıcılar

Lazer destekli biyobaskılama (LAB), lazer kaynaklı ileri transfer prensiplerine dayanır. Başlangıçta metallerin taşınması için geliştirilen lazer kaynaklı ileri transfer teknolojisi, peptitler, DNA ve hücreler gibi biyolojik materyallere başarıyla uygulanmaktadır. Püskürtmeli veya mikroekstrüzyon baskılamalara göre daha az yaygın olmasına rağmen, LAB giderek doku ve organ mühendisliği uygulamaları için de kullanılmaktadır. LAB, toplayıcı substratına doğru hücre içeren materyalleri hareket ettiren yüksek basınçlı bir balon oluşturmak için şeridin emici tabakasında odaklanmış lazer darbeleri kullanarak çalışır. Yüksek hücre yoğunluklarını baskılayabildiği için kullanımı rahattır. Fakat, diğer yazıcılara kıyasla hem daha pahalı hem de daha karmaşıktır. Yine diğer biyoyazıcılardaki gibi şırınga ucu mekanizması yoktur. LAB; lazer akısı (birim alan başına verilen enerji), yüzey gerilimi, substratın ıslatılabilirliği, ribon ve substrat arasındaki hava boşluğu, biyolojik katman kalınlığı ve viskozite gibi birçok faktörden etkilenir. Diğer biyobaskı teknolojilerinde var olan hücrelere bir miktar zarar verme veya materyallerle tıkanma sorunu yoktur (Murphy ve Atala, 2014). Lazer destekli biyoyazıcı şematik olarak Şekil 2.7’de gösterilmiştir.



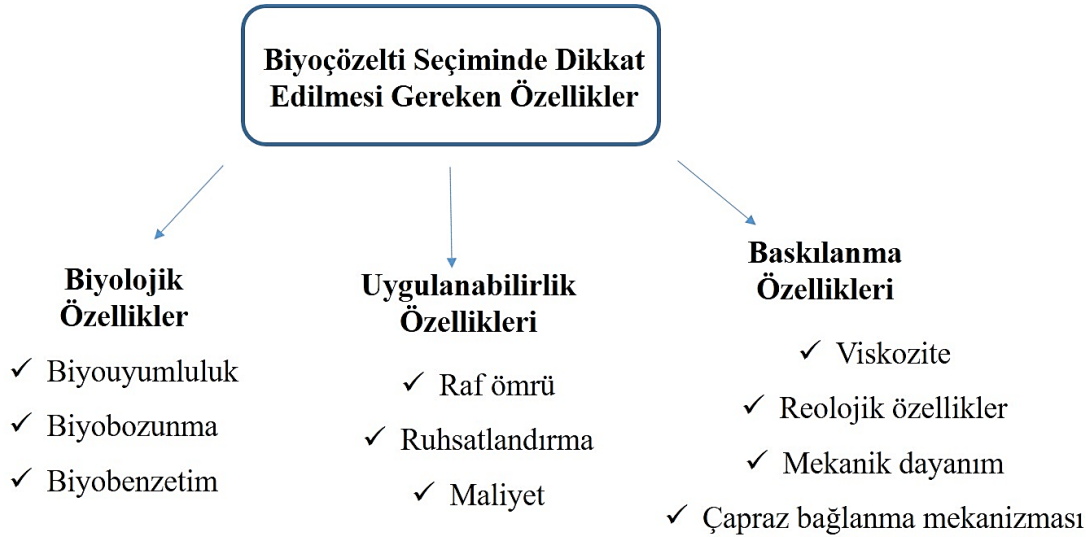
Şekil 2.7. Lazer destekli biyoyazıcının işleyişinin şematik gösterimi (Irvine ve Venkatraman, 2016).



## 2.6. Biyoçözelti (Bioink)

Üç boyutlu biyobaskılama işleminde; uygun malzeme, hücreler ve biyosinyal molekülleri istenen şekilde katman katman bastırılarak 3B yapı meydana getirirler. Bu yapının düzgün olması ve hücrelerin zarar görmemesi için bir çözelti içinde basılmaları gerekmektedir. Bu 3B biyobaskılama işlemine uygun çözeltiliye “biyoçözelti (bioink)” adı verilir. Biyoçözelti hücreleri tutarak, hücrelerin istenen formda aktarımını sağlar.

Doku mühendisliği alanında 3B biyobaskılama işlemlerinde biyoçözelti olarak hidrojeller kullanılmaktadır. Hidrojeller yapılarına su alıp şişebilen polimerlerdir. Bir hidrojinin biyobaskılanabilir olması için sahip olması gereken bir takım özellikler vardır. Bunların başında polimerin molekül ağırlığı, kaynağı (doğal ya da sentetik) ve konsantrasyonu gelmektedir. Diğer özellikler ise Şekil 2.8’de özetlenmiştir.



Şekil 2.8. Biyoçözelti seçiminde dikkat edilmesi gereken özellikler.

**Biyolojik özellikler:** Biyoçözeltilerin sahip olması gereken özelliklerin başında biyoyumluluk gelmektedir. Kullanılacak malzemenin ve bozunma ürünlerinin hücrelere toksik olmaması gerekmektedir. Ayrıca, hidrojel bozduğunda ortaya çıkan yan ürünler pH, elektrolit dengesi ve sıcaklığı değiştirerek hücrelere zarar vermemelidir. Uzun dönem için,

eğer hidrojel dokuya implante edilecekse hidrojinin bozunma sonrası sistematik etkiye yol açıp atmadığı da test edilmelidir. Ayrıca, biyobaskılama teknikleri de hücre canlılığını etkilemektedir. Bu nedenle biyoçözeltiler olarak kullanılacak hidrojinin nasıl baskılanacağı önemlidir. Ekstrüzyon biyoyazıcı için kayma gerilimi yüksek olacağından hidrojinin viskozitesi bunu tolere edebilmelidir. Ek olarak, biyoçözeltiler hücre tutunmasını da desteklemelidir.

Hidrojel bozunurken, enkapsüle halde bulunan hücrelerin ECM sentezlemeleri ve çoğalmaları beklenmektedir. Fakat hidrojel, çalışılan dokunun bozunma hızında bozunmuyorsa (çok yavaş ya da çok hızlı bozunuyorsa) bir takım problemler meydana gelir. Hidrojel gereğinden yavaş bozunursa polimer, doku gelişimini engelleyebilir, hücrelere besin ve oksijen transferi sınırlanır. Bunun sonucunda hücreler ölür. Eğer hidrojel çok hızlı bozunursa hücreler destek ortamını kaybeder. Mekanik dayanım zayıflar ve 3B yapı bozulur. Doku farklılaşması görülemez. Buna göre, hidrojinin bozunma hızının hedeflenen dokuya en yakın olması istenmektedir. Bu nedenle de hidrojinin tek başına bozunma hızının yanı sıra hücrelerle birlikte olan biyobozunurluğu önemlidir. Hücreler, hidrojeli parçalayan enzimler salgılayabilir. Bu durumda hidrojel hemen bozunacaktır. Çözüm olarak polimer konsantrasyonu, hücre sayısı ve bozunurluğu etkileyen diğer parametreler optimize edilmelidir. Hidrojinin özelliklerine göre, çalışmalarda bozunmanın gecikmesini sağlamak için çeşitli inhibitörler kullanılabilir gibi askorbik asit vb. hücrelerin ECM sentezini arttıran moleküller de kullanılmaktadır (Demirtaş, 2016).

**Baskılanma özellikleri:** Baskılanabilirlik özellikleri kullanılan biyoyazıcıya göre değişmektedir. Baskılanabilir özelliklerin başında reoloji gelmektedir. Reoloji, bir kuvvet uygulandığında malzemelerin akışa karşı nasıl tepki verdiğini ifade eder. Biyobaskılamada hidrojel için en önemli özelliklerden biri viskozitedir. Viskozite akmaya karşı olan direnci ifade eder. Püskürtmeli (ink-jet) sistemlerde düşük hacimler damla damla baskılanır. Bu nedenle yüksek viskoziteye ihtiyaç duyulmaz. Fakat ekstrüder sistemlerde basınçla sürekli bir akış söz konusudur. Bundan dolayı ekstrüder bazlı sistemlerde malzeme sızıntısının önlenmesi için yüksek viskoziteye sahip hidrojel kullanılmaktadır. Bu nedenle biyoçözeltilerde yarı-katı veya viskozitesi yüksek sıvı formu istenmektedir. Biyoçözeltinin baskılanırken katılaşması istenmez. Eğer baskılanırken katılaşsa biyoçözeltiyi baskılama

için gereken kayma gerilimi hücre ölümüne ve jel kırılmasına neden olur. Diğer bir özellik ise mekanik dayanımdır. Malzemelerin, istenen dokuya uygun mekanik dayanımda olması yeterli değildir. Üç boyutlu biyobaskılamada malzeme aktıkça birbirinin üzerine binecektir. Malzemenin bu baskıya karşı da dayanıklı olması gerekir. Tüm bunların yanında çapraz bağlanma ve jelleşme mekanizması da baskılamaya uygun olmalıdır. Biyoçözelti çapraz bağlanmamış belli bir viskoziteye sahip hücre ve/veya biyosinyal moleküller içeren yapıdır. Baskılandığı anda katılaşıp hidrojel yapısını alması ve üstüne gelen malzemeyi taşıması beklenir. Bu nedenle jelleşme (katılma) hızı önemlidir. Ayrıca, çapraz bağlanma mekanizmasının toksik olmaması, pH ve sıcaklığı değiştirmemesi gerekir. Örneğin foto-çapraz bağlamada kullanılan UV süresi uzadıkça hücrelerin canlılık oranı düşmektedir. Ek olarak, çapraz bağlanma gerçekleştiikten sonra oluşan hidrojel kararlı yapıya sahip olmalıdır (Demirtaş, Irmak ve Gümüşderelioğlu, 2017).

Tüm bu özelliklerin sabit olmadığı unutulmamalıdır. Örneğin hidrojel bozduğunda mekanik dayanımı da azalmaktadır. Ayrıca mekanik dayanım, viskozite, şişme gibi hidrojele özgü özellikler hidrojel çeşidi, molekül ağırlığı, polimer yapısı, hücre yoğunluğu gibi bir çok parametreye göre de değişmektedir.

Doku mühendisliği alanında biyoçözelti olarak en çok kullanılan hidrojeller arasında aljinat, jelatin, kollajen, hiyalüronik asit ve agaroz sayılabilir. Ayrıca kitosanın biyobaskılanması da son yıllarda çalışılmaktadır (Demirtaş, Irmak ve Gümüşderelioğlu, 2017).

**Jelatin**, hayvan kaynaklı doğal polimerdir. Ekstrüzyon biyoyazıcılarda sıklıkla kullanılmaktadır. Son derece biyoyumlu olan jelatin, çok çeşitli çapraz bağlanma yöntemleriyle (foto-çapraz bağlanma, termal, enzimatik vb.) hidrojel oluşturabildiği için de avantajlıdır. Fakat fizyolojik vücut sıcaklığında kolayca bozduğu için çeşitli modifikasyonlara ihtiyaç duymaktadır. Literatürde (Irmak, Demirtaş ve Gümüşderelioğlu, 2019) jelatini metakrilik anhidrit ile fonksiyonlandırarak kararlı yapısını koruyan hidrojeller elde edildiği raporlanmıştır.

**Aljinat**, alglerden elde edilen doğal bir polimerdir. Literatürde biyoçözelti olarak en çok çalışılan polimerlerden biridir. Püskürtmeli, ekstrüzyon ve lazer destekli biyoyazıcı çeşitlerinin hepsinde baskılanabilmektedir. Aljinat, kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) varlığında iyonik çapraz

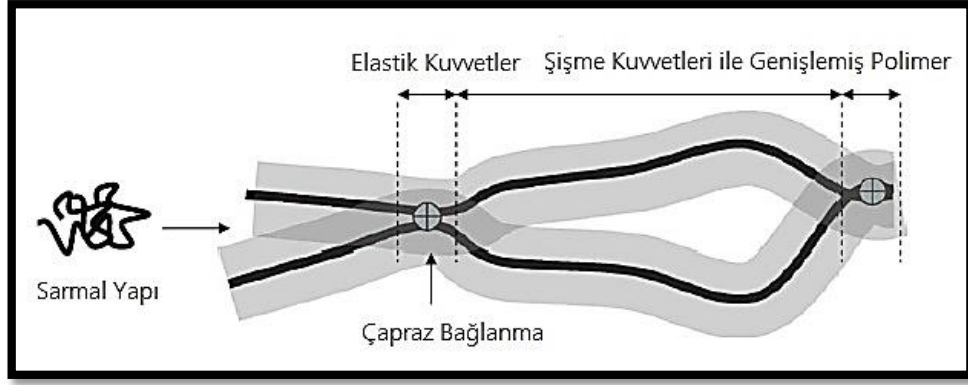
bağlanmaktadır, biyouyumluluğu yüksektir. Manipasyonu kolaydır. Fakat yüksek  $Ca^{+2}$  varlığı hücre bağlanmasını olumsuz etkilemektedir. Ayrıca baskılandıktan sonra ikinci bir küremeye ihtiyaç duyması da aljinatın biyoçözelti olarak olumsuzlukları arasında yer alır (Demirtaş, Irmak ve Gümüşderelioğlu, 2017).

## 2.7. Hidrojeller

Polimer zincirlerinin birbirleriyle yaptıkları çeşitli bağlar ile oluşan yapının içinde sıvı moleküllerini hapsedilmesiyle meydana gelen madde haline “jel” denilmektedir. Polimer zincirleri birbirleriyle bağlanarak bir çeşit ağ oluşturur. Bu ağ yapısının içinde su molekülleri tutulup malzeme şişerek hidrojel oluşturmaktadır. Bu bağlamda; hidrojeller, üç boyutlu suyla şişmiş hidrofilik polimerik ağ yapılarıdır. Tanım olarak bir hidrojel, hidrofilik özelliklere sahip çapraz bağlanmış bir polimer ağıdır. Başlangıçta, kolloidal bir çözelti halinden, kimyasal çapraz bağlarla, zayıf hidrojen bağlarıyla ve/veya elektrostatik etkileşimlerle jel yapısının oluşmasına “sol-jel geçişi” denir. Bazı fiziksel bağlı jellerde bu süreç sıcaklık, pH ve elektriksel alan gibi dış etkiler yardımıyla tersinir olmaktadır (Sop, 2013).

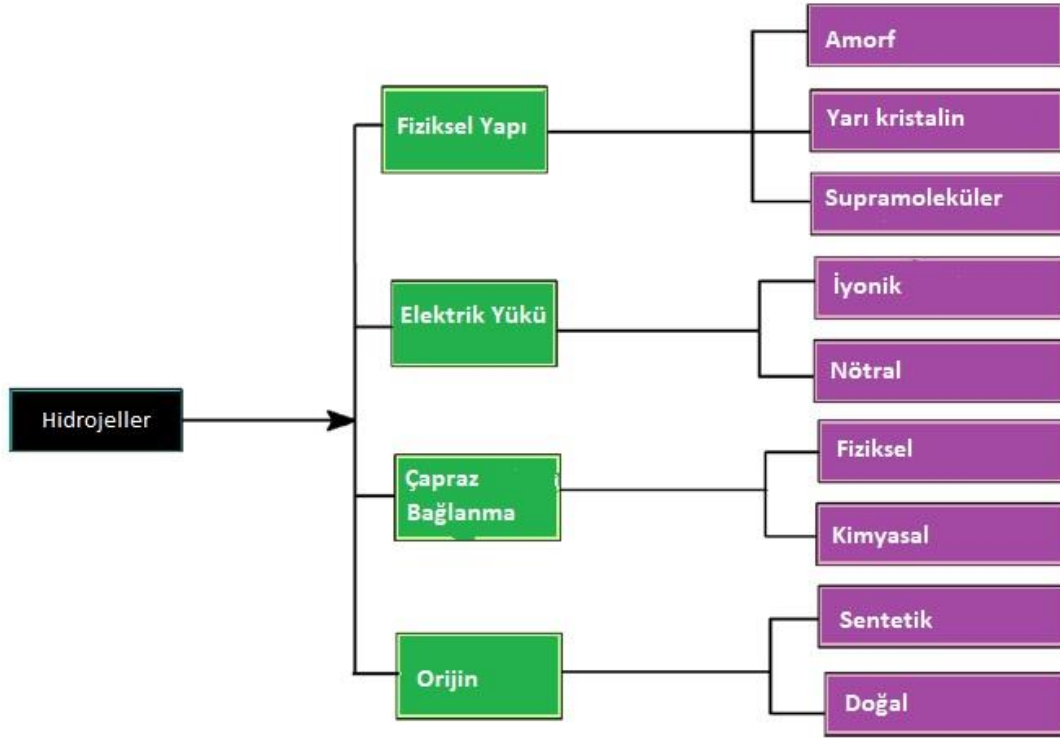
Hidrojeller; fazla miktarda su, tuz ve fizyolojik sıvıları absorbe edebilirler. Bir hidrojin şişme kapasitesi, suyu barındırmak için mevcut olan hidrojel ağının içindeki alanın miktarı ile belirlenebilir. Buna göre, hidrojellerin şişmesini sağlayan temel olay polimer-su etkileşimidir. Bu etkileşimlerin başında polimer yapısı gelir. Polimer ne kadar hidrofilikse su ile etkileşimi de o oranda fazla olacaktır. Bu nedenle hidrojeller genelde, hidroksil (-OH-), amin (-NH<sub>2</sub>-), karboksilat (-CO<sub>2</sub>-) ve sülfat (-OSO<sub>3</sub>-) gibi hidrofilik fonksiyonel grupları taşıyan sentetik ve doğal polimerlerden hazırlanmaktadır. Eğer hidrojin yapısında iyonlar mevcutsa dış çözültideki iyon konsantrasyonuna bağlı olarak ozmotik basınç oluşur. Yani hidrojin şişmesinde temelde üç kuvvet etkilidir. Bunlar: polimer-su etkileşimleri, elektrostatik kuvvetler ve ozmotik basınçtır. Şişmeyi etkileyen önemli faktörlerden bir diğeri ise çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ve çapraz bağlanma yoğunluğudur. Aynı polimer zincirindeki iki çapraz bağlantı arasındaki mesafeyi moleküler ağırlık belirler. Mesafe kıaldıkça, çapraz bağlanma yoğunluğu artar. Bununla birlikte, çapraz bağ yoğunluğunun büyüklüğü hidrojellerin şişme özelliğini belirler. Hidrojeller için şişme tanımı, hidrojellerin sınırlı çözünürlüğüdür. Başka bir deyişle, bir hidrojin çözünürlüğü, ağ çapraz

bağlanmasından kaynaklanan elastik kuvvetlerle önlenir. Bu kuvvetler ve çapraz bağlanma Şekil 2.9’da şematik olarak gösterilmiştir.



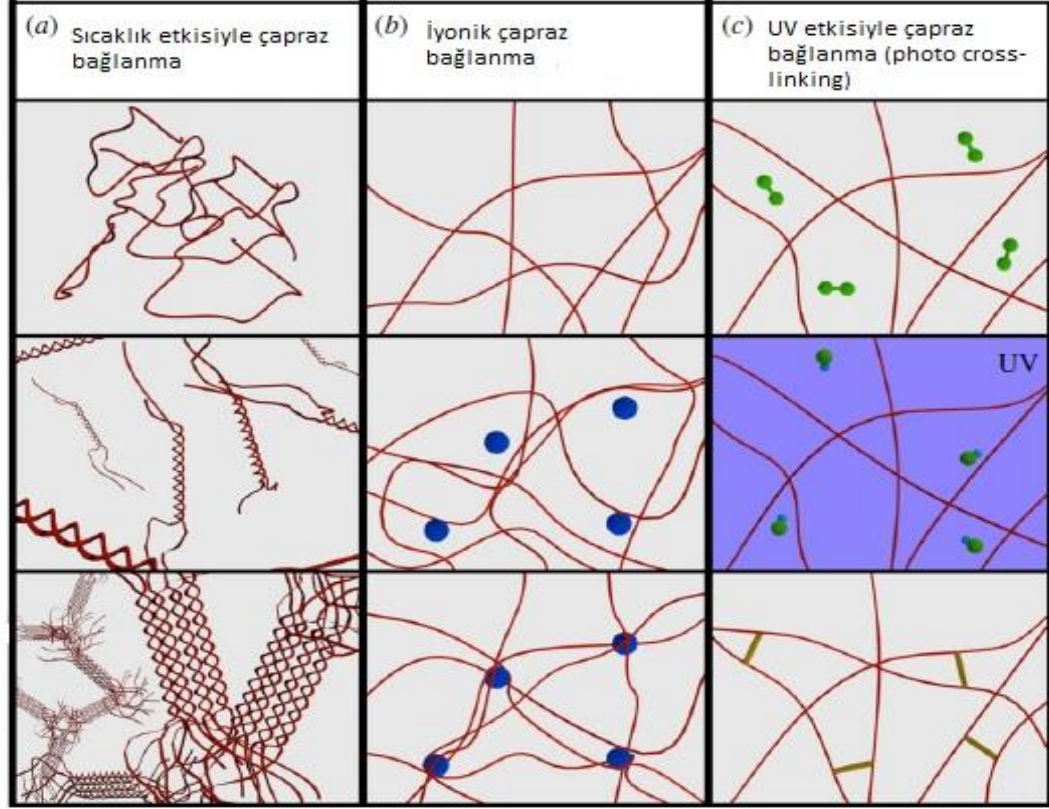
Şekil 2.9. Hidrojelin çapraz bağlanmasının şematik gösterimi (Ottenbrite, 2010).

Hidrojeller; tarım ve sağlık endüstrisinde geniş kullanım alanına sahiptir. İlaç taşınımı, moleküler tanı sistemleri ve biyosensörler gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda da kullanılmaktadırlar. Biyouyumlu ve esnek olmalarından dolayı doku mühendisliğinde de sıklıkla tercih edilmektedirler. Hidrojeller sentetik veya doğal polimerlerden üretilir. Hidrojel oluşturabilen polimerler, kökenlerine, bileşimlerine, elektrostatik doğasına ve jel oluşturma mekanizmasına göre sınıflandırılır. Doku mühendisliğinde spesifik olarak polimer ve üretim yöntemi seçilirken bu özelliklere dikkat edilmektedir (Ottenbrite, 2010; Distantina ve arkadaşları, 2013). Hidrojellerin sınıflandırılması Şekil 2.10’da gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Hidrojellerin sınıflandırılması.

Hidrojeller, polimerik yapıların çapraz bağlayıcı ajan ya da ajanlar yardımıyla çapraz bağlanması ile oluşturulur. Çapraz bağlanma, polimerin özelliklerine ve yapısına göre değişir. Çapraz bağlanma fiziksel, kimyasal ya da ikisinin birlikte uygulanması ile olabilmektedir. Fiziksel çapraz bağlanmada; iyonik etkileşimler ve ikincil kuvvetler etkilidir. Kimyasal çapraz bağlamada ise polimerik yapı değişir. Bir fotobaşlatıcı varlığında UV etkisiyle çapraz bağlama, en sık kullanılan kimyasal çapraz bağlama yöntemlerinden biridir. Bunun yanında kendiliğinden düzenlenen protein yapıya sahip çeşitli hidrojeller de vardır. Şekil 2.11’de hidrojellerde en çok kullanılan çapraz bağlama yöntemleri özetlenmiştir.

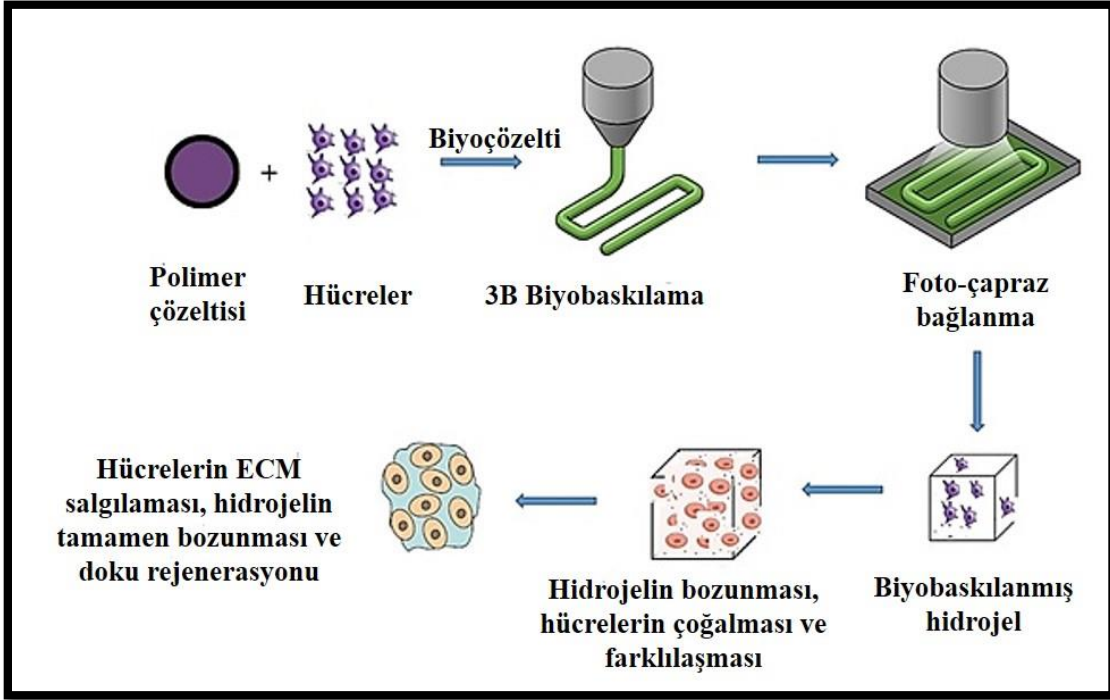


Şekil 2.11. Çapraz bağlamada en sık kullanılan yöntemler; **a)** Sıcaklığın etkisi ile polimer zincirlerinde meydana gelen çapraz bağlanma **b)** İyonik etkileşimlerle çapraz bağlanma (mavi renk iyonları temsil etmekte); **c)** UV etkisi ile foto-çapraz bağlayıcı (yeşil renk foto-çapraz bağlayıcıyı temsil etmekte) varlığında çapraz bağlanma (Gasperini ve ark., 2014).

Hidrojel, içerdikleri fazla su oranı nedeniyle, doku mühendisliğinde; enjekte edilebilir iskeleler olarak da ideal malzemelerdir. Ayrıca; biyoaktif moleküller için taşıyıcı araçlar olarak kullanılabilirler. Minimal invaziv cerrahi yöntemlerine izin verirler. Hücreleri düzenleyerek istenen dokunun oluşumuna yönlendirmek için uyarınları sunan üç boyutlu yapılar olarak kullanılırlar. Boşluk doldurma maddeleri olarak, düzensiz şekilli kusurları doldurmak için de kullanılabilirler. Boşluk doldurma maddeleri en basit şekliyle, doku iskelesi grubudur ve hacim oluşturma, yapışma önleme veya biyolojik yapıştırıcı gibi çeşitli uygulamalarda kullanılır. Biyoaktif molekülleri taşımak amacıyla ise anjiyogenezin teşvik

edilmesi veya salgı hücrelerinin kapsüllemesi gibi çeşitli uygulamalarda hidrojel iskeleler kullanılır. Ayrıca; vücuda transplante edilmek üzere üç boyutlu yapıda, istenilen dokuya yönelik hücre ve çeşitli büyüme faktörleri içeren doku iskeleleri olarak da hazırlanabilmektedirler. Kıkırdak doku, kemik doku ve düz kas dahil olmak üzere hemen hemen vücudun çoğu yeri için doku mühendisliğinde hidrojeller ile çalışmalar yapılmaktadır (Drury ve Mooney, 2003; Cheung ve ark., 2007).

Kıkırdak doku mühendisliğinde hidrojeller, bir polimer ağındaki hücreleri ve biyosinyal moleküllerini kapsüllemek için kullanılır. Hücrelerin immobilize olmasını sağlayarak kondrositlerde farklılaşmaya olanak verip onları küresel bir biçimde tutmaya zorlamaktadırlar. Kıkırdak doku mühendisliğinde ekstrüder tabanlı biyoyazıcı ve foto-çapraz bağlanma işlemi ile doku rejenerasyonunun sağlanmasına yönelik aşamalar Şekil 2.12’de özetlenmiştir.



Şekil 2.12. Hidrojellerin dokuya spesifik olarak doku mühendisliği uygulamalarında kullanımının şematik gösterimi.

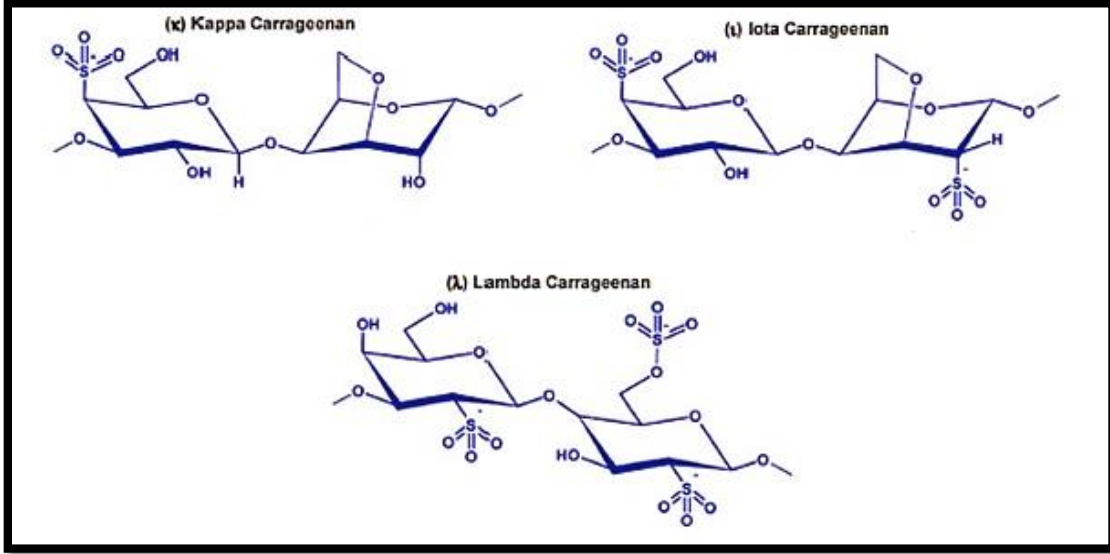


Hidrojeller hem hücreler için son derece iyi bir destek malzemesi olmalarından dolayı hem de modifikasyon kolaylığı sağladıkları için doku mühendisliğinde oldukça fazla çalışılmaktadır. Yukardaki kısımlarda da bahsedildiği gibi hidrojeller; jelatin, kollajen, hiyalüronik asit ve aljinat gibi doğal polimerlerden; polietilen glikol (PEG) gibi sentetik polimerlerden oluşturulmaktadır. Gıda katkısı olarak da kullanılan carrageenanın hidrojel çalışmaları son yıllarda gündeme gelmiştir. Bu bağlamda aşağıda carrageenan (CA) polimeri ve spesifik olarak  $\kappa$ -CA ile ilgili bilgiler sunulmuştur.

## 2.8. Carrageenan (CA) Polimeri Çeşitleri ve Özellikleri

CA'lar, kırmızı deniz yosunlarından elde edilirler. CA'lar sülfat grupları içeren bir biyopolimer grubudur. İsmi, İrlanda'nın bir köyü olan Carragheen'den alırlar. Bu köyün, sahilleri boyunca kırmızı deniz yosunlarının miktarı oldukça fazladır. CA polimeri, Chondrus, Gigartina, ve çeşitli *Eucheuma* türlerindeki kırmızı deniz yosunundan elde edilmektedir ve disakkarit (galaktoz) yapıdaki birimlerden oluşur. 3,6-anhidro-D-galaktoz birimleri  $\alpha$ -1,3 ve  $\beta$ -1,4 glikozidik bağları ile birbirlerine bağlıdır. Anyonik heteropolisakkarit yapıya sahiptir. Ortalama molekül ağırlığı 100 kDa olup, literatürde yer alan molekül ağırlığı verileri tutarsızdır. Yerli İrlanda yosununun yüz elli bin ile yirmi milyon Da arasında ortalama moleküler ağırlığa sahip olduğu bildirilmiştir. Gıda sınıfı carrageenanın 100,000-800,000 veya 200,000-400,000 Da aralığında olduğu rapor edilmiştir. Bozulmuş carrageenan (poligeenan) ise 20,000-30,000 Da ortalama molekül ağırlığına sahiptir. Yetmiş beş derecede %1.5 (w/v) CA'nın viskozitesi 0.005-0.8 Pa.s arasında değişmektedir. Bu aralık özellikle gıda katkı maddelerinde kullanılan CA polimerleri için önemlidir (Necas ve Bartosikova 2013). Viskozite konsantrasyona, sıcaklığa, diğer çözünen maddelerin varlığına, CA türüne ve moleküler ağırlığına bağlı olarak değişir. Viskozite, konsantrasyon ile neredeyse katlanarak artmakta ve sıcaklıkla da azalmaktadır. CA'ların erime sıcaklığı 50-80°C aralığındadır. Düşük pH'ta, özellikle  $\text{pH} \leq 3.0$ 'de glikozidik bağların hidrolizi gerçekleşmektedir. CA'lar asit katalizörlü hidroliz yoluyla, depolimerizasyon uğramaktadır. İçerdikleri 3,6-anhidro-D-galaktoz miktarı, sülfat gruplarının sayısı ve konumunun farklı olması, çeşitli carrageenanlar oluşturmaktadır. CA polimeri, disakkarit birimlerinde bulunan ester sülfat grubu sayısı ve pozisyonuna göre;  $\kappa$  (*kappa* carrageenan),  $\iota$  (*iota* carrageenan) ve  $\lambda$  (*lambda* carrageenan) olarak sınıflandırılır (Şekil 2.13). CA çeşitleri ortalamama %20 ile

%35 arasında sülfat grubu içerir. Uygun iyonların varlığında ve soğuk etkisiyle fiziksel olarak jelleşebilir. Bu bağlamda, fiziksel olarak iyonotropik ve termotropik jel oluşturur (Janaswamy ve Chandrasekaran, 2001; Çevikdizici, 2013; Mihaila ve ark., 2013; Yuan ve ark., 2018).



Şekil 2.13. CA çeşitlerinin yapısal olarak gösterimi;  $\kappa$  (*kappa*)  $\iota$  (*iota*) ve  $\lambda$  (*lambda*) (Li ve ark., 2014).

CA'ların bazı özellikleri Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. CA polimerlerinin bazı özellikleri (Li ve ark., 2014).

Özellikler	$\kappa$ -CA	$\lambda$ -CA	$\iota$ -CA
<b>Çözünürlük</b>			
Sıcak su (80°C)	Çözünür.	Çözünür.	Çözünür.
Soğuk su (20°C)	Na <sup>+</sup> iyonları varlığında çözünür.	Çözünür.	Na <sup>+</sup> iyonları varlığında çözünür.
<b>Jel Oluşturma</b>			
Kasyonların Etkisi	K <sup>+</sup> iyonlarının etkisi ile güçlü jel yapısı oluşturur.	Jel oluşturmaz.	Ca <sup>++</sup> iyonlarının varlığında güçlü jel yapısı oluşturur.
<b>Tuz Toleransı</b>	Zayıf	İyi	İyi
<b>Protein Reaktivitesi</b>	<i>Kappa</i> -kazein spesifik reaksiyonu	Asidik pH ile artan güçlü etkileşim	-

CA, nişasta ve jelatinden sonra en çok kullanılan hidrokolloiddir. Gıda endüstrisinde carrageenan ailesi kalınlaştırıcı, emülgatör, katkı maddesi ve stabilizatör olarak kullanılmaktadır. Kozmetik ve ilaç sektörlerinde de kullanılmaktadır. Ayrıca; diş macunu katkı maddesi (kıvam verici ajan), süt ürünlerinin içeriğinde, işlenmiş ette, diyet ürünlerinde, yangın söndürme köpüğü içeriğinde, kozmetik kremlerde, şampuanlarda ve ayakkabı cilası gibi spesifik ürünlerde de kullanılmaktadır. İlaç salım sistemlerinde de sıklıkla tercih edilmektedirler. CA, kimyasal olarak çapraz bağlandığında vücut sıcaklığında bozunmadan kalabilmektedir (Necas and Bartosikova, 2013; Mihaila ve ark., 2013).

### 2.8.1. *Kappa* Carrageenan ( $\kappa$ -CA)

$\kappa$ -CA ağırlıklı olarak *Eucheuma cottonii* (ya da sadece *cottonii*) olarak bilinen tropik deniz yosunu *Kappaphycus alvarezii*'nin ekstraksiyonu ile elde edilir (Campo ve ark., 2009).

Doğal bir polisakkarit olan  $\kappa$ -CA antivirüs, antitümör, immünomodülasyon ve antikoagülasyon gibi biyolojik özelliklere sahiptir.  $\kappa$ -CA polimerinin yapısı, kırırdak doku

ECM yapısında bulunan GAG'lara benzediği için doku mühendisliği uygulamalarına uygundur (Necas ve Bartosikova, 2013; Zia ve ark., 2017).

Sülfatlanmış polisakkaritler de dahil olmak üzere negatif yüklü moleküller, virüs üzerindeki veya hücre yüzeyindeki pozitif yüklerle etkileşime girerek inhibitör etki gösterirler ve böylece virüsün konakçı hücrelere girmesini önlerler. Ayrıca, CA polimerlerinin anti-HIV aktivitesi olduğu literatürde yer almaktadır. Fakat, güçlü antikoagülan etkisi olduğu için AIDS ilacı olarak kullanılırsa, yan etkisinin de güçlü olacağı belirtilmiştir (Necas ve Bartosikova, 2013).

$\kappa$ -CA'nın molekül formülü  $C_{24}H_{36}O_{25}S_2$  olup, ortalama molekül ağırlığı 788.647 g/mol olan  $\kappa$ -CA -2 (eksi iki) formal yüke sahiptir.

$\kappa$ -CA,  $K^+$  ve  $Ca^{+2}$  gibi katyonların varlığında fiziksel olarak jel oluşturmaktadır. Polimer zincirindeki şeker ünitelerinin konformasyonu ile ilişkili katyonlar, carrageenanların fiziksel özelliklerini belirler.  $\kappa$ -CA; sıcaklık ve katyonlar gibi jel indükleyici ajanlar varlığında tersinir jel oluşturabilmektedir. Yirmi derecenin ( $^{\circ}C$ ) altında jelleşme davranışı agaroz ve agara benzerdir (Feng ve ark., 2017; Yuan ve ark., 2018).

Tüm bu özelliklerine ek olarak; fiyatının uygunluğu, jelatine göre daha kolay bulunması ve bitkisel kaynaklı olması gibi özellikleriyle  $\kappa$ -CA'nın doku mühendisliği ve ilaç salım sistemlerindeki çalışmalarını yaygınlaştırmaktadır.

## **2.9. Mikrodalga Teknolojisi**

Alternatif bir ısı kaynağı olarak mikrodalga ışımasının kullanılması, kimyada giderek daha popüler hale gelmektedir. Geleneksel ısıtma teknikleri saatler ya da günler alabilmektedir. Mikrodalga enerji kimyası ve bu enerji kaynağı ile yapılan reaksiyonlar ise dakikalar hatta saniyeler içinde tamamlanmaktadır. Çünkü, mikrodalga enerjisi hem daha güçlü bir enerjidir hem de mikrodalga ışıması durumunda enerji moleküller tarafından doğrudan emilir. Mikrodalga ısıtma dielektrik ısıtmaya dayanır; diğer bir deyişle, kalıcı bir dipol momenti sergileyen moleküller, uygulanan elektromanyetik alana hizalanmaya çalışarak, moleküllerin dönmesine, sürtünmesine ve çarpmasına ve dolayısıyla ısı oluşumuna neden olur. Moleküllerin mikrodalga ışın kaynağı ile doğrudan ısıtılması, yan reaksiyonların

azaltılmasıyla sonuçlanırken çok hızlı ve homojen ısıtma da sağlar. Böylece ürün kalitesi ve reaksiyon verimi artar. Mikrodalga ısıtma prosesi ile elde edilen yüksek sıcaklıklar ve nispeten kısa süreler boyunca yüksek basınç koşullarında çalışabilme özelliği de reaksiyonların geleneksel yöntemlere göre daha hızlı olmasını sağlar (Sosnik ve ark., 2011; Beşkardeş ve ark., 2012; Bayrak, Demirtaş ve Gümüşderelioğlu; 2017).

Mikrodalga ışıması, organik sentez, polimer sentezi, polimer fonksiyonlandırılması ve malzeme işleme için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ek olarak, kimyasal çapraz bağlama reaksiyonlarının etkinliği, mikrodalga enerjisinin kullanılmasıyla arttırılabilir (Irmak, Demirtaş ve Gümüşderelioğlu, 2019). Geleneksel ısıtma yöntemi ve mikrodalga ısıtma yöntemi Çizelge 2.3'te karşılaştırılmıştır.

Çizelge 2.3. Geleneksel ısıtma prosesi ile mikrodalga enerjisi ile ısıtma prosesinin karşılaştırılması.

<i>Özellik</i>	<i>Geleneksel ısıtma</i>	<i>Mikrodalga ile ısıtma</i>
<b>Isıtma hızı</b>	Yavaş	Hızlı
<b>Maksimum reaksiyon sıcaklığı</b>	Çözücünün kaynama noktası ile sınırlı	Çözücünün kaynama noktasının üzerinde aşırı ısınması ile sınırlı
<b>Reaksiyon süresi</b>	Uzun	Kısa
<b>Basınç</b>	Uzun reaksiyon sürelerinden dolayı daha tehlikeli	Daha az tehlikeli
<b>Homojen ısıtma</b>	Düşük	Yüksek
<b>İkinci ürün miktarı</b>	Yüksek	Düşük
<b>Tekrarlanabilirlik</b>	Düşük	Yüksek

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez çalışmaları kapsamında ilk olarak *kappa* carrageenan'ın ( $\kappa$ -CA) geleneksel ve mikrodalga yöntemleri kullanılarak karşılaştırmalı olarak metakrilatlanması gerçekleştirilmiş ve optimum reaksiyon koşulları belirlenmiştir. Foksiyonelleştirme işleminin verimini belirlemek için proton-NMR ( $^1\text{H-NMR}$ ) analizi uygulanmıştır.  $\kappa$ -CA polimerinin UV ile foto-çapraz bağlanması için polimer konsantrasyonu, UV süresi ve foto-çapraz bağlayıcı (IRGACURE-2959<sup>®</sup>) konsantrasyonu değiştirilerek  $\kappa$ -CA hidrojeller elde edilmiştir. Elde edilen hidrojeller SEM, şişme, bozunurluk ve reoloji analizleri ile karakterize edilmiştir. Hidrojellerin biyobaskılanabilirliği Fab@home biyoyazıcı ile test edilmiştir.

Tezin ikinci aşamasında hücre kültürü çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaçla ATDC5 fare kondrosit hücrelerinin metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA çözeltisinde 21 günlük kültürü yapılmıştır. Kültür süresince hidrojelin hücre canlılığına, çoğalmasına ve kıkırdak dokuya farklılaşmasına katkısı canlı-ölü analizi, morfolojik analizler, immünohistokimyasal boyamalar ve immünohistokimyasal analizler ile kontrol edilmiştir.

Tez kapsamında yapılan tüm çalışmalarla ilgili detaylı bilgiler bu bölümde açıklanmıştır.

#### 3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler

Tez kapsamında kullanılan kimyasal ve biyolojik malzemeler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan kimyasal ve biyolojik malzeme listesi.

Malzeme İsmi	Kodu	Firması
<i>Kappa</i> Carrageenan (40 kDa)	C1013	Sigma Aldrich (Almanya)
Metakrilik Anhidrit	276685	Sigma Aldrich (Almanya)
Sodyum Hidroksit (NaOH)	1927280	Merck (Almanya)
IRGACURE-2959 <sup>®</sup>	410896	Sigma Aldrich (Almanya)
Sodyum Klorür (NaCl)	31434	Sigma Aldrich (Almanya)

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan kimyasal ve biyolojik malzeme listesi (Devamı).

Mono Potasyum Fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.04871.100	Merck (Almanya)
Hidroklorik Asit (HCl)	1927280	Merck (Almanya)
DMEM/Ham's F-12	DMEM-12-HXA	Capricorn (Almanya)
Fötal Sığır Serumumu (FBS)	S181H	Biowest (ABD)
L-Glutamin	G7513	Sigma Aldrich (Almanya)
Potasyum Klorür (KCl)	104935.5000	Merck (Almanya)
Penisilin-Streptomisin (P-S)	P4333	Sigma Aldrich (Almanya)
Dulbecco Steril Fosfat Tampon Çözeltisi (DPBS) (1x)	MBPBS-1A	Nzytech (Portekiz)
Tripsin EDTA	ECB3052D	Euro Clone S.p.A. (İtalya)
Calcein AM	C-3099	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Gluteraldehit	G-6257	Sigma Aldrich (Almanya)
Paraformaldehit	1.04002	Merck (Almanya)
TGF-β1	PHG9214	Gibco Thermo Fisher Scientific (ABD)
Mutlak Etanol (Etil alkol) ≥ 99.8%	32221	Sigma Aldrich (Almanya)
Safranin O	S8884	Sigma Aldrich (Almanya)
Tripan Mavisi	T6146	Sigma Aldrich (Almanya)
DMSO (Dimetil Sülfoksit)	276855	Sigma Aldrich (Almanya)
Insulin	91077C	Sigma Aldrich (Almanya)
Transferrin	T3309	Sigma Aldrich (Almanya)
Sodyum Selenit	214485	Sigma Aldrich (Almanya)
Papain (Papain form papayalateks)	P6148	Sigma Aldrich (Almanya)

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan kimyasal ve biyolojik malzeme listesi (Devamı).

EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit)	E3381	Sigma Aldrich (Almanya)
Sistein HCl (DL-Cysteine hydrochloride anhydrous)	C9768	Sigma Aldrich (Almanya)
Triton-X 100	T8787	Sigma Aldrich (Almanya)
BSA (Bovine Albumin Serum)	A2153	Sigma Aldrich (Almanya)
Dimetil Metilen Mavisi (DMMB)	341088	Sigma Aldrich (Almanya)
Alexa Fluor 488 Phalloidin	ab176753	Abcam, USA
Propidyum İyodür	81845	Sigma Aldrich (Almanya)
Ethidium homodimer-1 (Ethd-1)	4604	Sigma Aldrich (Almanya)
Asetik asit	1.00056	Merck (Almanya)
Eozin	E4382	Sigma Aldrich (Almanya)
Glisin	G-7126	Sigma Aldrich (Almanya)
HCl (%37)	07102	Sigma Aldrich (Almanya)
Hematoksilen	H3136	Sigma Aldrich (Almanya)
Trisodyum sitrat dihidrat	S4641	Sigma Aldrich (Almanya)
Ksilen	16446	Sigma Aldrich (Almanya)



## **3.2. Birinci Bölüm Deneysel Çalışmalar**

Bu bölümde, malzeme üretimi ve karakterizasyonu hakkında detaylı bilgi verilmiştir.

### **3.2.1. Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Üretimi**

$\kappa$ -CA polimerinin viskoelastik özelliklerinin doku mühendisliği uygulamalarına uygun olması için ve çapraz bağlanma sonrasında mekanik dayanımı yüksek hidrojel elde edilmesi için polimerin metakrilik anhidrit (MA) ile fonksiyonlandırılması gerekmektedir. Sunulan tez kapsamında,  $\kappa$ -CA'nın MA ile fonksiyonlandırılması hem geleneksel yöntem, hem de mikrodalga yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle %1.5'lük (w/v)  $\kappa$ -CA çözeltisi hazırlanmıştır. Metakrilatlama reaksiyonunda hacimce %4 ve %12 olmak üzere 2 farklı MA konsantrasyonu kullanılmıştır.

#### **3.2.1.1. Geleneksel Yöntemle Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Üretimi**

Geleneksel yöntem, literatüre uygun olarak (Mihaila ve ark., 2013) gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, 0.75 g (%1.5 w/v)  $\kappa$ -CA 50 mL distile suda 50°C'de çözdürülmüştür. Ardından bu çözeltiliye hacimce %4 veya %12 oranında MA eklenmiştir. Metakrilatlanma reaksiyonu 50°C'de 6 saat süresince gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon boyunca pH=8.0 olacak şekilde, pH kontrolü yapılmıştır. pH'ı sabit tutmak için 5M NaOH kullanılmıştır. Ayrıca, MA'nın çözelti içerisine homojen dağılmasını ve tepkimenin daha verimli gerçekleşmesini sağlamak için MA,  $\kappa$ -CA çözeltisine şırınga pompası (SyringePumpPro NE-4000, ABD) yardımıyla 0.4 mL/dk sabit hızda gönderilmiştir.

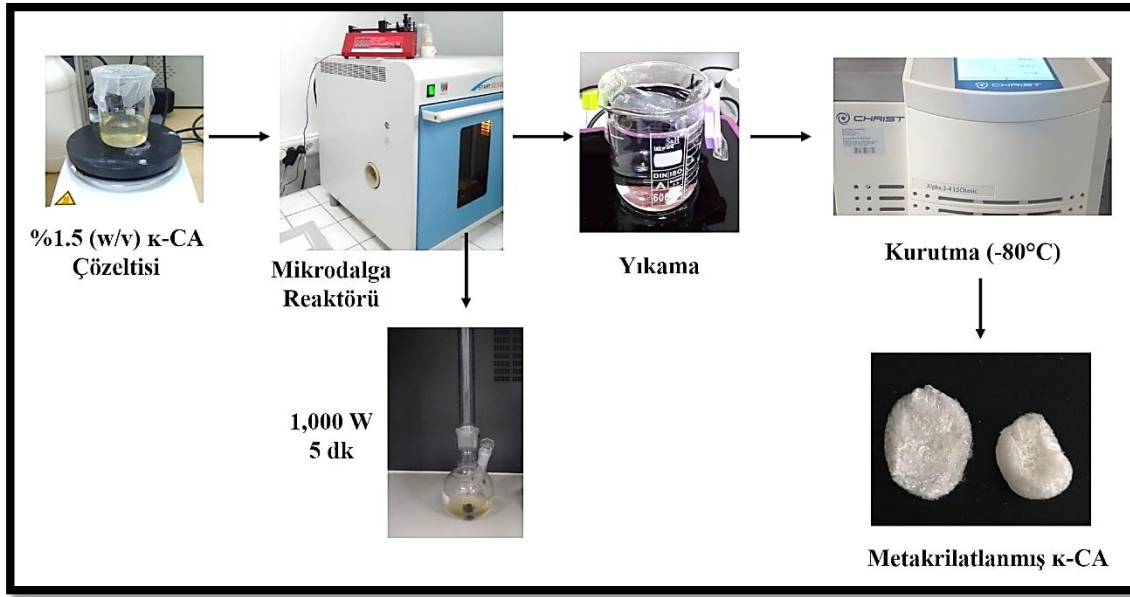
Tepkime sonunda, çözelti diyaliz membrana (Typical molecular weight cut-off 14,000; Sigma Aldrich ABD) aktarılmıştır. Saf su içerisinde 4°C sıcaklıkta ve 5 gün boyunca yıkanarak tepkimeye girmeyen MA ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Ardından çözelti, 1 gece -20°C'de ve 1 gece de -80°C'de bekletilmiş ve liyofilizatörde (Christ, Almanya) -80°C'de kurutulmuştur.

#### **3.2.1.2. Mikrodalga Yöntemiyle Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Üretimi**

Geleneksel yöntemde olduğu gibi distile suda %1.5'lük (w/v)  $\kappa$ -CA çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti, mikrodalga reaktörüne (Milestone, ABD) alınmıştır. Ardından, ikili şırınga

pompası (SyringePumpPro NE-4000, ABD) ile 1 dk boyunca MA (%4 veya %12, v/v) ile NaOH (5M) çözeltileri 0.4 mL/dk akış hızında gönderilmiş ve 15 s 1,000 Watt mikrodalga enerjisi uygulanmıştır. Bu işlem gerekli MA çözeltilisinin tamamı bitene kadar sürdürülmüştür. Sonrasında pH ölçümü yapılmış ve pH'ın reaksiyon süresince 8'de sabit tutulması için tekrar NaOH beslenmiş ve mikrodalga enerjisi (1,000 W) 15 saniyelik sürelerle 20 kez (toplam 5 dk) uygulanmıştır.

Mikrodalga yöntemi ile üretilen metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA reaksiyona girmeyen MA'nın giderilmesi için 5 gün boyunca diyaliz membran içerisinde, 4°C'de saf suda yıkanmıştır. Ardından 1 gece -20°C'de ve 1 gece de -80°C'de bekletilmiş ve liyofilizatörde (Christ, Almanya) kurutulmuştur. Şekil 3.1'de mikrodalga yöntemi ile metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA üretim prosesi gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA'nın mikrodalga yöntemi ile üretiminin şematik gösterimi.

### 3.2.2. Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Polimerinin Karakterizasyonu

#### 3.2.2.1. $^1\text{H}$ NMR (Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi) Analizi

$^1\text{H}$  NMR analizi (Bruker, Almanya), metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA'nın, MA ile reaksiyona girip fonksiyonlandığını kanıtlamak için yapılmıştır.

Analiz  $\kappa$ -CA ve metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA, D<sub>2</sub>O'da çözündürülerek 50°C sıcaklıkta yapılmıştır.

Metakrilatlanma derecesi bu analiz sonucuna göre hesaplanmıştır. Böylece,  $\kappa$ -CA'nın ne kadar metakrilatlandığı, geleneksel yöntem ile mikrodalga yöntemi arasındaki fark ve reaksiyon verimleri hakkında veriler elde edilmiştir.

Metakrilatlanma dereceleri Eşitlik 3.1 ile hesaplanmıştır (Mihaila ve ark., 2013).

Yüzde metakrilatlanma derecesi=[(Metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA'da yer alan metil grubunun alanı -CH<sub>3</sub>; 1.9-2.0 ppm + Vinil grubunun alanı -CH<sub>2</sub>; 5.4-6.0 ppm) / ( $\kappa$ -CA'da yer alan  $\beta$  galaktoz alanı; 3.89-4.0 ppm)] x 100 (Eşitlik 3.1)

### 3.2.2.2. Viskozite Tayini

$\kappa$ -CA çözeltisi (%1.5 w/v) ve mikrodalga yöntemiyle metakrilatlanmış %4 (v/v) ve %12(v/v) MA oranlarına sahip  $\kappa$ -CA çözeltilerinin viskoziteleri biyoyazıcıda kullanımlarının incelenmesi için, 30°C'den 80°C'ye kadar artan sıcaklıkta, reometre cihazında (Kinexus, Malvern, İngiltere) döner test kurulumuyla 140 s boyunca 0.1 ile 100 s<sup>-1</sup> arasında değişen frekans taramaları ile dinamik olarak belirlenmiştir.

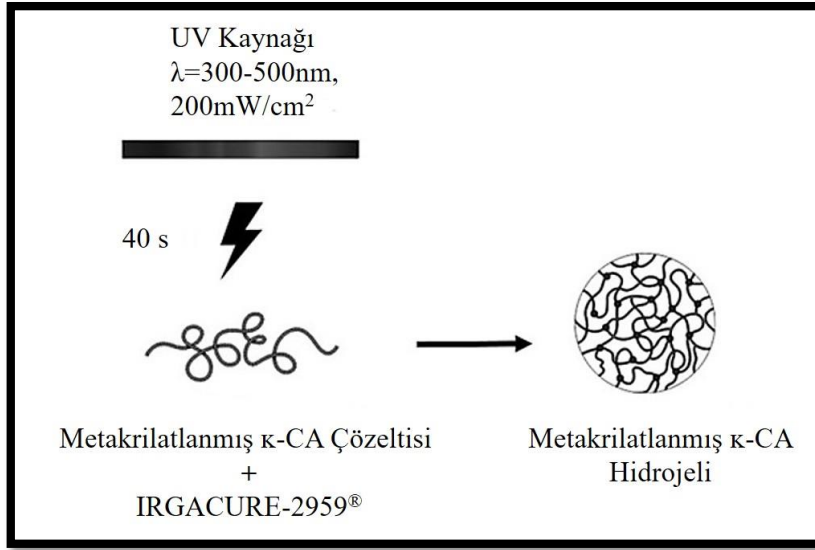
### 3.2.3. Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Hidrojellerinin Üretimi

Metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA, IRGACURE-2959<sup>®</sup> fotoçapraz bağlayıcı ajan ile UV varlığında çapraz bağlanarak kararlı yapıda hidrojeller oluşturulmuştur. Kararlı hidrojellerin elde edilmesi için farklı polimer ve IRGACURE-2959<sup>®</sup> konsantrasyonları ile UV maruziyet süreleri denenmiştir. Çizelge 3.2'de bu koşullar sunulmuştur.

Çizelge 3.2.  $\kappa$ -CA Hidrojel Üretim Koşulları

<b>Polimer konsantrasyonları (Metakrilatlanmış <math>\kappa</math>-CA)</b>	<b>%4; %6; %8 (w/v)</b>
<b>Foto-çapraz bağlayıcı konsantrasyonu (IRGACURE-2959<sup>®</sup>) (%)</b>	<b>0.25; 0.30; 0.50; 1.00 (w/v)</b>
<b>Çapraz bağlanma süresi (UV, 365 nm)</b>	<b>15 s; 30 s; 40 s</b>

Öncelikle, seçilen oranda IRGACURE-2959<sup>®</sup> PBS (pH=7.4) içerisinde bir gece 60°C’de etüvde bekletilerek çözülmüştür. Ardından bu çözelti içerisinde metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimeri 80°C’de çözdürülerek polimer çözeltisi elde edilmiştir. Ardından çözelti viskoz sıvılara özel pipet kullanılarak tek bir gözde 100  $\mu$ L olacak şekilde 4 gözlü Petri kaplarına (35 mm  $\phi$ ) aktarılmış ve 250 Watt güce sahip UV ışık kaynağı (Tanses Technologies, UVT-200, Kanada) 5 cm ideal mesafeye ayarlanarak 40 s süresince UV ( $\lambda=300-500\text{nm}$ ,  $200\text{mW/cm}^2$ ) ile muamele edilmiş ve hidrojel oluşturulmuştur. IRGACURE-2959<sup>®</sup> ışık etkisiyle bozunduğu için tüm bu işlemler karanlık ortamda yapılmıştır. Şekil 3.2’de UV maruziyeti ile foto-çapraz bağlanma prosesi şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerinden hidrojel üretiminin şematik gösterimi.

### 3.2.4. Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Hidrojellerinin Karakterizasyonu

#### 3.2.4.1. Morfolojik Analiz (SEM)

Hidrojeller, yüzey morfolojilerinin belirlenmesi için SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ile görüntülenmiştir. İşlem öncesi hidrojeller etanol serilerinden geçirilmiştir. Hacimce %10, %30, %50, %70 ve %90 etanol çözeltilerinde birer dakika muamele edilen örnekler sonrasında mutlak (%100) etanol içerisinde alınarak analize götürülmüştür. Öncelikle, kritik nokta kurutucu (Quorum K850, İngiltere) ile etanol uzaklaştırılmış ve hidrojeller zarar görmeden kurutulmuştur. Sonrasında, örneklerin yüzeyi Au/Pd (80/20) ile kaplanmıştır

(Leica ACE 600 model, ABD). En sonunda, SEM (FEI Quanta 200F, ABD) ile görüntüleme yapılmıştır.

#### **3.2.4.2. Biyobozunurluk Tayini**

Sunulan tez kapsamında hazırlanan hidrojellerin biyobozunurluğu PBS (pH=7.4) içinde 37°C sıcaklıktaki gravimetrik ölçümlerle incelenmiştir. Bu amaçla; 1., 5., 10., 20. ve 30. günlerde PBS ortamından alınan örnekler liyofilizatörde kurutularak, kuru ağırlıkları hassas terazi (Precisa 205 A SCS;  $\pm 0.0001$  g duyarlılık, İsviçre) ile ölçülmüştür. Ayrıca örneklerin başlangıç ağırlıklarının da ölçümü yapılmıştır. Biyobozunurluk oranları % ağırlık kaybı olarak Eşitlik 3.2 ile hesaplanmıştır.

$$\text{Kütle Kaybı (\%)} = [W_o (\text{ilk ağırlık}) - W_n (\text{son ağırlık}) / W_o (\text{ilk ağırlık}) ] \times 100$$

(Eşitlik 3.2)

#### **3.2.4.3. Şişme Analizi**

Üretilen metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA hidrojellerin su tutma kapasiteleri, gravimetrik tayin yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Üretilen hidrojeller liyofilizatörde kurutularak öncelikle kuru ağırlıkları hassas terazide ölçülmüştür. Sonra, PBS (pH=7.4) içerisinde 37°C sıcaklıktaki inkübatörde 60 rpm çalkalama hızında deney başlatılmıştır. Örnek ağırlıkları 5., 10., 15., 20., 25. ve 30. günlerde hassas terazi ile ölçülmüştür. Eşitlik 3.3 yardımı ile de hidrojellerin kuru temelde şişme yüzdeleri hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme \%} = [ (\text{Şişmiş Ağırlık} - \text{Kuru Ağırlık}) / \text{Kuru Ağırlık} ] \times 100$$

(Eşitlik 3.3)

#### **3.2.4.4. Reolojik Analizler**

Mikrodalga ve geleneksel yöntemlerle üretilen metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA hidrojellerinin fizyolojik ortamı taklit etmek için 37°C sıcaklıkta reometre cihazında (Kinexus, Malvern, İngiltere) dinamik ölçüm yöntemiyle frekans ve gerinim taramaları yapılmıştır. Frekans taraması 1-200 rad/s aralığında yapılmıştır. Gerinim taraması 1 Hz sabit frekansta % 0.1-1000 aralığında artan gerinim altında belirlenmiştir. Yapılan bu reolojik ölçümler dinamik

ölçümlerdir. Bu ölçümler sonucunda, malzemenin farklı gruplarının viskoelastik özellikleri hakkında bilgi edinilmiştir.

### **3.3. İkinci Bölüm Deneysel Çalışmalar**

Bu bölümde, tez kapsamında yapılan hücre kültürü çalışmaları hakkında detaylı bilgi verilmiştir.

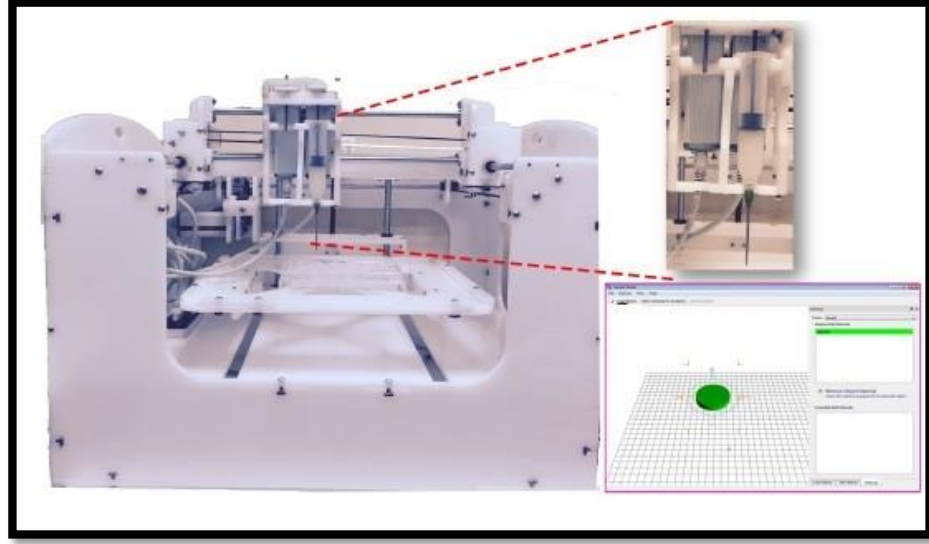
#### **3.3.1. Kültür Ortamında Hücrelerin Çoğaltılması**

Sunulan tez çalışması kapsamında ATDC5 kondrojenik hücre hattı (fare embriyonel karsinoma hücre hattı) kullanılmıştır. ATDC5 hücre hattı kıkırdak doku farklılaşma çalışmaları için model olarak kullanılan hücre hattıdır. Bu hücre hattı farklılaşmamış öncül kıkırdak hücre karakteristiği sergilemektedir. ATDC5 hücreleri çeşitli büyüme faktörleri varlığında farklılaşarak, kıkırdak dokuya yönelik araştırmalar için potansiyel bir hücre hattı olarak kullanılmaktadırlar (Tıǧlı, 2009).

Çalışmada 5. pasajdaki ATDC5 hücreleri kullanılmış ve monolayer olarak çoğaltılmıştır. Hücreler DMEM HAM'S F12 içerisine %5 (v/v) FBS, %1 (v/v) L-glutamin ve %1 (v/v) P-S bulunduran büyüme ortamı içerisinde, 37°C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe (Heraus Instruments, Almanya) çoğaltılmışlardır. İstenilen sayıya ulaşan hücreler çalışmada kullanılmışlardır.

#### **3.3.2. 3B Biyoyazıcı (Fab@Home) Sisteminin Çalışma Prensibi**

Sunulan tez kapsamında Cornell Üniversitesi bilgisayar sentez laboratuvarı tarafından geliştirilen “Fab@Home Model 3 (Seraph Robotics, ABD) 3B Biyoyazıcı” sistemi kullanılmıştır. Solidworks® programı aracılığıyla 6 mm çapına ve 1 mm kalınlığına sahip silindirik disk şeklinde hidrojeller baskılanmıştır. Sistem, viskozitesi yüksek malzemelerin kullanımı için uygundur. Çalışma prensibi, vida tabanlı ekstrüder tip biyoyazıcı olup hücrelere uygulanan kayma gerilimini azaltmak için geniş çaplı (çap 1.2 mm) iğne kullanılmıştır. Uygulanan dış kuvvet sonucu şırınga ucundaki pistonun itme etkisiyle biyoçözeltilerin (bu çalışmada ATDC5 hücrelerini içeren κ-CA hidrojelleri) sürekli bir akışla baskılanması sağlanmaktadır (Şekil 3.3).



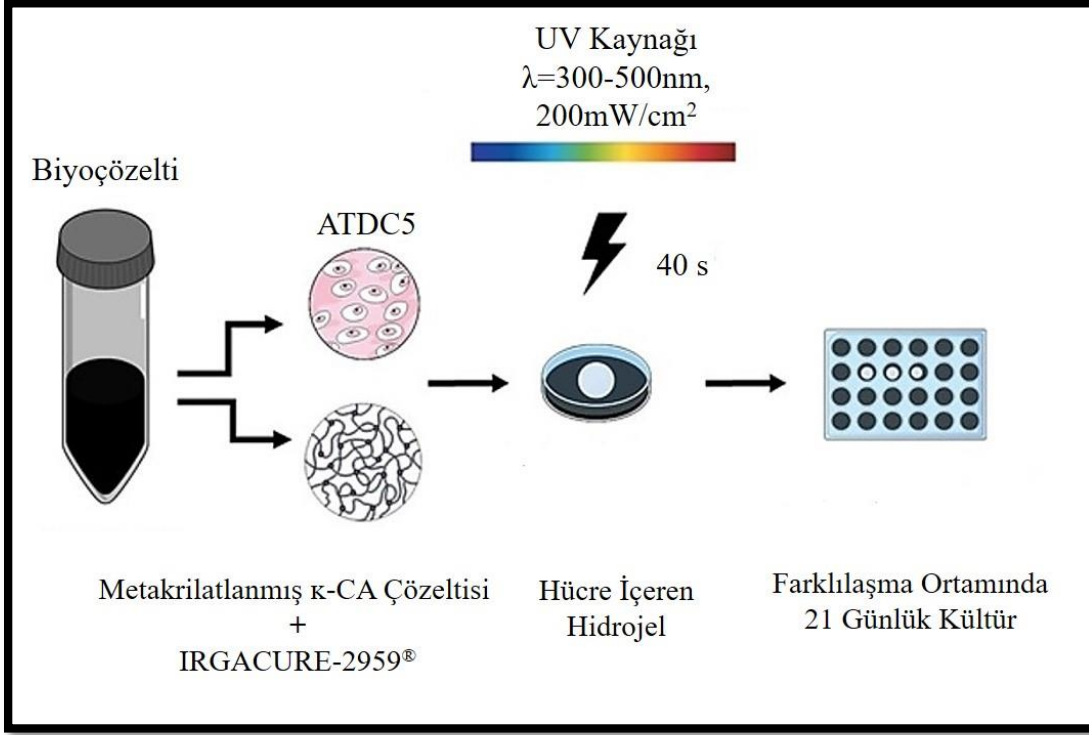
Şekil 3.3. Fab@home 3B biyoyazıcı sistemi ve “STL” uzantılı dosyada belirtilen şekle uygun olarak, biyobaskılanacak şeklin oluşturulması (Demirtaş, 2016).

### 3.3.3. 3B Hücre Kültürü Çalışmaları

Sunulan tez kapsamında yapılan hücre kültürü çalışmaları; polimer-hücre karışımının 3B baskılanarak hidrojel elde edilmesi ve elde edilen hidrojellerin 24 gözlü hücre kültürü kaplarında (non-treated 24 well plates, Thermo Fisher Scientific, ABD) CO<sub>2</sub> inkübatörü içerisinde 21 gün boyunca kültüre edilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle, %1 (w/v) IRGACURE-2959<sup>®</sup> çözeltisi hücre kültürü besi ortamı içerisinde 50°C’de 1 gece bekletilerek çözdürülmüştür. Çözdürülen IRGACURE-2959<sup>®</sup> çözeltisi 0.22 µm’lik şırınga ucu filtresi ile steril edilmiştir. Ardından metakrilatlanmış κ-CA polimerinin bu çözelti içerisinde %8’lik (w/v) konsantrasyonu oluşturacak miktarı tartılmıştır. UV fırınında 30 dk süresince sterilize edilen polimer, steril edilmiş olan IRGACURE-2959<sup>®</sup> çözeltisi içerisinde 80°C’de çözdürülmüştür. Diğer yandan, çoğaltılan ATDC5 hücreleri kültür flasklarından tripsinizasyon işlemi ile kaldırılmış ve 1,000 rpm’de 5 dk çöktürme sonrasında tripan mavisi ile boyanarak “Neubauer Lamı” yardımıyla ışık mikroskobu altında sayılmıştır. Böylece 1 mL’de  $2 \times 10^7$  hücre olacak şekilde biyoçözelti için gereken hücre miktarı belirlenmiştir. Ardından, hücreler steril polimer çözeltisi ile karıştırılarak uygun viskozitede biyoçözelti (bioink) oluşturulmuştur. Sonrasında, bir gözde 100 µL olacak

şekilde hazırlanan çözelti dört gözlü steril hücre kültürü kaplarında UV altında (40 s) çapraz bağlanmıştır. Ardından hidrojel içerisinde enkapsüle halde olan hücreler farklılaşma ortamı içerisinde 21 gün boyunca kültüre edilmiştir (Şekil 3.4). Çalışmada mikrodalga ve geleneksel yöntemle üretilmiş %12 (v/v) MA içeren  $\kappa$ -CA hidrojelleri kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Tez kapsamında yürütülen 3B kültür çalışmalarının şematik gösterimi.

ATDC5 hücreleri için farklılaşma ortamı, DMEM HAM'S F12 büyüme ortamı içerisine %1 (mg/mL) transfferin, %0.625 (mg/mL) insülin, %0.625 (mg/mL) sodyum selenit ve %1 ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) TGF- $\beta$  eklenerek hazırlanmıştır.

### 3.3.3.1. Morfolojik Analiz (SEM)

Sunulan tez çalışması kapsamında 3B baskılanan hücre-polimer karışımı içeren hidrojellerin yüzey morfolojilerinin incelenmesi için SEM analizi yapılmıştır.

Öncelikle hücrelerin sabitlenmesi (fiksasyon) işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücre içeren hidrojel örnekleri 3 kez DPBS ile birer dk yıkanmıştır. Ardından, örneği kaplayacak kadar



%2.5 (v/v) gluteraldehit eklenerek 30 dk 4°C’de bekletilmiştir. Sonrasında beşer dk tutularak 3 kez DPBS ile yıkama yapılmıştır. En son aşamada ise örnekleri kaplayacak kadar DPBS eklenerek 4°C’de saklanmıştır. Sabitlenen örnekler, SEM ile görüntülenmeden önce etanol serilerinden geçirilmiştir. Sırasıyla hacimce %10, %30, %50, %70 ve %90 etanol çözeltilerinde birer dk bekletilen örnekler mutlak (%100 v/v) etanol içerisinde analize götürülmüştür. Öncelikle, kritik nokta kurutucu (Quorum K850, İngiltere) ile etanol uzaklaştırılmıştır. Böylece hidrojeller ve hücreler zarar görmeden kurutulmuştur. Sonrasında, taramalı elektron mikroskobu için yüzey kaplama (Au/Pd kaplama) işlemi yapılmıştır (Leica ACE 600 model, ABD). En sonunda, SEM (FEI Quanta 200F, ABD) ile görüntüleme yapılmıştır.

### **3.3.3.2. Hücre Canlılık (Canlı-Ölü) Analizi**

Hücre canlılığı, canlı-ölü (live-dead) analiz kiti ile belirlenmiş ve lazer taramalı konfokal mikroskobu (CLSM, Zeiss LSM 510, Almanya) ile görüntülenmiştir. Hücre membranından geçebilen Calcein-AM hücre içi esteraz aktivitesi sonucu floresan özellikteki Calcein’e dönüşerek yeşil renk oluşturur. Hücre membranından normal koşullarda geçemeyen Ethidium homodimer-1 (Ethd-1), hücre membranında hasar varsa, hücre içine girerek çekirdekte yer alan DNA’ya bağlanır ve kırmızı renk oluşturur.

Kültürün 1. ve 21. günleri alınan %12 (v/v) MA ile metakrilatlanmış mikrodalga ve geleneksel grup hidrojeller öncelikle steril DPBS (pH=7.4) ile 5 dk olacak şekilde üçer kez yıkanmıştır. Ardından, hazırlanan boya çözeltisi (2 µM Calcein AM ve 4 µM Ethd-1) örnek başına 300 µL olacak şekilde eklenmiş ve 37°C’de 30 dk inkübe edilmiştir. Mikroskopta görüntülenmeden önce de DPBS (pH=7.4) ile üçer kez beşer dk yıkanmıştır. Ardından görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Örnekler 1 mm kalınlığında ve 6 mm olup her iki yüzeyinden de görüntüleme yapılmıştır. Konfokal analizi sonucu elde edilen floresan mikroskop görüntüleri “Image J” programı kullanılarak her bir grup için hücre canlılıkları hesaplanmıştır.

### **3.3.3.3 Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyama**

Hidrojel içerisinde kültüre edilen hücrelerin yoğunluklarını, dağılımlarını ve mikrodalga ile geleneksel metakrilatlama prosesi arasındaki farkları görmek amacıyla hematoksilen-eozin

(H&E) ile histolojik boyama yapılmıştır. Örnekler, kültürün 7. ve 21. günlerinde alınarak %4 (w/v) paraformaldehit ile fikslenerek saklanmıştır.

Örnekler boyama yapılmadan önce histolojik kasetler içerisine konarak öncelikle fiksasyon protokolü uygulanmıştır. H&E için dehidrasyon ve fiksasyon protokolü şu şekilde uygulanmıştır:

- Histolojik kasetlere içerisine yer alan örnekler öncelikle %70'lik (v/v) etanol içerisinde 30 dk bekletilmiştir.
- Kasetler sonrasında %95'lik (v/v) etanol içerisinde 30 dk bekletilmiştir.
- Kasetler tekrar yeni hazırlanmış %95'lik (v/v) etanol içerisinde de 30 dk bekletilmiştir.
- Ardından kasetler mutlak (%100 (v/v)) etanol içerisinde 30 dk bekletilmiştir. Bu basamak taze etanol hazırlanarak iki kere daha tekrarlanmıştır.
- Sonrasında kasetler ksilen içerisine transfer edilmiştir. Burada da 30 dk bekletilmiştir. Yeni ksilen çözeltisi hazırlanarak bu basamak tekrarlanmıştır.
- Son aşamada ise kasetler, parafin içerisine konarak 1 gece bekletilmiştir.

Parafin içerisine gömülen örneklerin -20°C'de donması sağlanmıştır. Sonrasında ise mikrotom (Leica Biosystems, Almanya) ile örneklerden kesit alınmıştır. Kesitler ortalama 8 µm kalınlıktadır. Ardından, lamellere alınan örneklerle deparafinizasyon işlemi ve H&E boyama protokolü uygulanmıştır. Sonrasında ksilen bazlı kapatıcı (Richard-Allan Scientific™ Cytoseal™ XYL/Thermo Scientific) ile kapatılarak mikroskop altında görüntülenmiştir.

H&E boyama, histopatolojik analizlerde en çok kullanılan analizlerden biridir. Hematoksilen mavi-mor renklidir ve nükleik asitleri boyar. Eozin ise proteinleri boyar ve pembe renk tonlarında gözükmektedir. Normal bir dokuda çekirdek mavi-siyah renkte, sitoplazma ve ECM pembe tonlarda boyanmaktadır (Nacar ve Nacar, 2017).

### 3.3.3.4. Safranin O / Fast Green Boyama

Safranin O boyama yöntemi ile glikozaminoglikan (GAG) varlığı yani kıkırdak dokuya özgü belirteçlerin varlığı anlaşılmaktadır. Safranin O / Fast Green boyama sonrası kıkırdak varlığında kesit kırmızı - pembe tonlarda gözükmetedir (Sato ve ark., 2004). Hücreli hidrojel örnekleri analiz için %4 (w/v) paraformaldehit ile 10 dk oda sıcaklığında sabitlenmiştir, PBS ile birer dakika ara ile 2 kez yıkanmıştır. Sonrasında, %0.02'lik (w/v) Fast Green ile 2 dk muamele edilmiştir. Ardından, %1'lik (v/v) asetik asit çözeltisine daldırılıp çıkartılmıştır. Sonra %1'lik (w/v) Safranin O ile 10 dk muamele edilmiştir. Ardından, 3 kez distile suda 4 yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası örnekler 2 kere ksilene daldırılıp çıkartılmıştır. Son olarak ise ksilen bazlı kapatıcı (Richard-Allan Scientific™ Cytoseal™ XYL/Thermo Scientific) ile kapatılarak mikroskop altında incelenmiştir.

Boyamada kullanılan çözeltilerin içeriği Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Safranin O / Fast Green boyamasında kullanılan çözeltilerin içerikleri.

Çözelti	Bileşen	Miktar
%0.02 Fast Green	Fast green	0.05 g
	Distile su	250 mL
%1 Safranin O	Safranin O	2.5 g
	Distile su	250 mL
%1 Asetik asit	%70 Etanol	100 mL
	Asetik asit	1 mL

### 3.3.3.5. Glikozaminoglikan (GAG) İçeriğinin Belirlenmesi

Hidrojel örnekleri içerisindeki ATDC5 hücrelerinin ürettiği GAG miktarı dimetil metilen mavisi (DMMB) kullanılarak belirlenmiştir. Kültürün 7. ve 21. günlerinde hidrojeller üzerindeki ortam uzaklaştırılarak Eppendorf tüplere alınmış ve analiz yapılmaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Ardından, analiz yapılmadan bir gün önce -80°C'den alınan örneklerin üzerine 1 mL papain çözeltisi eklenerek etüvde 60°C'de 1 gece bekletilmiştir. Böylece hidrojel örneklerinin parçalanması sağlanmış ve GAG içeriği açığa çıkmıştır. Ardından,

papain çözeltisi içeren örneklerden 40 µL alınmış ve üzerine 250 µL DMMB eklenerek 525 nm’de spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır.

Papain çözeltisi PBS içerisinde hazırlanmış olup, trisodyum sitrat dihidrat (55 mM), sodyum klorür (150 mM), sistein HCl (5 mM), EDTA (5 mM) ve papain (0.56 U/mL) içermektedir.

DMMB ise distile su içerisinde % 0.3 (w/v) glisin, % 24 (w/v) NaCl, %9.5 (v/v) 0.1 M HCl ve % 1.6 (mg/mL) DMMB ile hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin pH’ı 3.0’e ayarlanmıştır.

### **3.3.3.6. İmmünohistokimyasal Analizler**

Kültürün 21. günü hücreli hidrojel örnekleri DPBS ile yıkandıktan sonra, %4 (w/v) paraformaldehit ile 10 dk 4°C’de muamele edilmiştir. Böylece hücreler sabitlenmiştir. Sonrasında DPBS ile 3 kez beşer dk yıkama yapılmıştır. Ardından, %0.25 (v/v) Triton - X 100 çözeltisi 30 dk ile muamele edilerek hücre zarının geçirgenliği arttırılmıştır. Ardından, 3 kez beşer dk DPBS ile yıkanmışlardır. Sonrasında hücre dışındaki proteinlerin boyanmaması için %1 (w/v) BSA çözeltisi ile 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Ardından primerler (agregan ve kollajen II primerleri), örnekleri kaplayacak şekilde (150 µL) eklenmiştir. Bir gece 4°C’de bekletilerek örneklerin primerlerle tamamen etkileşmesi sağlanmıştır. Ertesi gün, örnekler 3 kez beşer dk PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında ise örnekler, sekonder antikor olan Alexa Fluor 488 Phalloidin ile oda sıcaklığında 2 sa inkübe edilmiştir. Ardından hücre çekirdeklerine bağlanan propidyum iyodür (10 µg/mL) içerisinde 5 dk bekletilmiştir. Sonrasında tekrar 3 kez PBS (pH= 7.4) ile yapılan yıkama işleminin ardından örnekler Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM, Zeiss LSM 510, Almanya) kullanılarak incelenmiştir. Agregan ve kollajen II kıkırdak hücrelerine özgü olan proteinlerdir. Phalloidin yeşil renkte gözükürken, propidyum iyodür çekirdeğe bağlanıp kırmızı renkte gözükmektedir.

### 3.4. İstatistiksel Analizler

Sunulan tez kapsamında elde edilen sonuçlar, Graph-Pad Software InStat programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Deneysel veriler 3 paralel şekilde elde edilmiş ve  $\pm$  standart sapma değerleriyle birlikte sunulmuştur. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi, *Tukey-Kramer Multiple Comparison Test* kullanılmış ve “*p*” değerinin 0.05’ten az olduğu değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

#### 4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Sunulan tez çalışmasının hedefi; *kappa* carrageenan ( $\kappa$ -CA) polimerinin metakrilik anhidrit (MA) ile fonksiyonlandırılma işlemini mikrodalga enerjisi altında gerçekleştirerek geleneksel yöntemle göre daha yüksek verim (metakrilatlanma derecesi) elde ederken, kullanılan MA hacmini (yüzdece) düşürerek,  $\kappa$ -CA'nın viskoelastik özelliklerinin iyileştirilmesi ve biyobaskılama teknolojisine özgün yaklaşımlarla modifiye edilmiş biyoçözelti olarak sunulmasıdır.

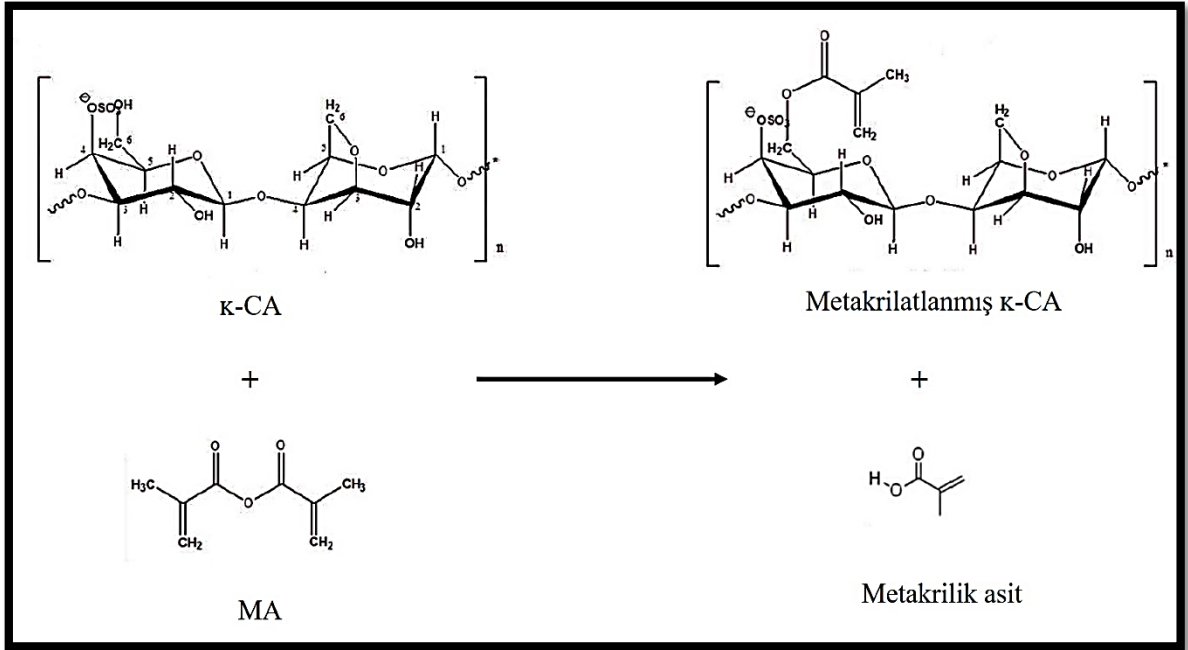
Öncelikle,  $\kappa$ -CA polimeri metakrilik anhidrit (MA) ile fonksiyonlandırılmıştır. Ardından, elde edilen metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerlerinin metakrilatlanma dereceleri  $^1\text{H-NMR}$  analizinin sonuçlarından faydalanılarak hesaplanmıştır. Sunulan tez çalışması kapsamında elde edilen metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA, 3 boyutlu (3B) biyoyazıcı çalışmalarında kullanılmak üzere yeni bir biyoçözelti olarak değerlendirilmiştir. Biyoçözeltilerdeki en önemli parametrelerden biri viskozitedir. Bu nedenle elde edilen metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerlerinin artan sıcaklığa bağlı olarak viskoziteleri ölçülmüştür. Elde edilen verilerin 3B biyobaskılama işlemi için uygulanabilirliği tartışılmıştır. Sonrasında, foto-çapraz bağlama yöntemiyle hidrojel oluşturmak için farklı polimer ve IRGACURE-2959<sup>®</sup> konsantrasyonları ile farklı UV maruziyet süreleri denenmiştir. Elde edilen hidrojellerin taramalı elektron mikroskobu ile morfolojik analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, elde edilen hidrojeller ile 30 günlük biyobozunurluk ve su tutma deneyleri yapılmıştır. Elde edilen veriler yüzde bozunurluk ve yüzme şişme değerleri olarak sunulmuştur. Ardından, hidrojellerin viskoelastik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan reolojik analiz sonuçları sunulmuş ve tartışılmıştır.

İkinci aşamada ise tez çalışmalarına hücre kültürü deneyleri ile devam edilmiştir. Öncelikle, ATDC5 kondrojenik hücre hattı büyüme ortamında çoğaltılmıştır. Ardından biyomalzeme ve hücre karışımı 3B baskılanarak karışımın istenilen özelliklerde bir biyoçözelti olup olmayacağı belirlenmiştir. Sonrasında, 21 gün süresince hücre kültürü çalışmaları yapılmış ve morfolojik analizler, canlı-ölü analizi, immünohistokimyasal ve immünohistokimyasal boyamaların sonuçları sunulmuştur.

#### 4.1. Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Üretimi ve Karakterizasyon Çalışmaları

Doku mühendisliği çalışmalarında 3B biyobaskılamada biyoçözelti olarak sıklıkla kullanılan hidrojenlerin başında kollajen, jelatin, hiyalüronik asit ve PEG gelmektedir. Ancak, bu malzemelerin bir takım olumsuz/yetersiz özelliklerinden dolayı yeni biyoçözelti arayışları gündeme gelmiştir.  $\kappa$ -CA polimeri kimyasal olarak özellikle kıkırdak dokunun da yapısında bulunan glikozaminoglikanlara (GAG) benzemektedir. Ayrıca,  $\kappa$ -CA tiksotropik bir polimerdir (Popa ve ark., 2013). Bu nedenle sunulan tez kapsamında  $\kappa$ -CA'nın biyoçözelti olarak özellikle kıkırdak doku mühendisliğine yönelik olarak kullanımı araştırılmıştır. Ancak,  $\kappa$ -CA'nın özellikleri, biyoçözelti olarak kullanmak ve kararlı yapıda hidrojel oluşturmak için tek başına yeterli değildir. Bu nedenle  $\kappa$ -CA'nın MA ile fonksiyonlandırılarak kararlı yapıda hidrojenlerin elde edilebilmesi için tez kapsamında çalışmalar yapılmıştır.

$\kappa$ -CA'nın metakrilatlanması ilk kez Mihaila ve ark. (2013) tarafından gerçekleştirilmiş ve literatürde yer almıştır. Reaksiyon Şekil 4.1'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.1.  $\kappa$ -CA'nın MA ile fonksiyonlandırılma tepkimesinin şematik gösterimi.

Ancak, tez kapsamında **geleneksel yöntem** olarak adlandırdığımız bu yöntem aşağıda belirtilen olumsuzluklara sahiptir:

- Metakrilatlanma derecesi yetersizdir (en yüksek  $37.11 \pm 7.41$ ) (Mihaila ve ark., 2013).
- Reaksiyon süresi uzundur (6 saat).
- Reaksiyon sırasında istenmeyen yan ürünler oluşmaktadır (metakrilik asit gibi).
- Reaksiyon sırasında oluşan yan ürünler, reaksiyona girmeyen metakrilik anhidrit ve çeşitli safsızlıklar reaksiyon pH'sını çok fazla düşürmektedir (pH=3.0 civarı).
- Reaksiyon sonucu oluşan metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA'nın polimer çözeltisinin de düşük pH'da olması sebebiyle hidrojel oluşumu sırasında polimerin çapraz bağlanma reaksiyonu olumsuz etkilenmektedir.
- Yan ürün vb. fazla olduğu için safsızlıkların ortamdan tam anlamıyla uzaklaşması uzun yıkama sürelerini gerektirmektedir.
- Metakrilatlanma derecesinin düşük olması sebebiyle kararlı yapıda hidrojeller elde edilememektedir. İlgili literatürde (Mihaila ve ark., 2013) düşük metakrilasyon derecesine sahip  $\kappa$ -CA'nın, UV ile fotoçapraz bağlanması sağlanamamış ve KCl gibi ajanlarla ek olarak fiziksel çapraz bağlanma ile hidrojel elde edilebilmiştir.
- Geleneksel yöntem ile sentezlenen, hem UV hem de KCl ile çapraz bağlanması sağlanan  $\kappa$ -CA hidrojellerinin ilgili literatürde (Mihaila ve ark., 2013) hücre kültürü çalışmaları toplam 72 saat yapılabilmektedir. Uzun süreli kültürlerde hidrojelin kararlılığının nasıl olduğu bilinmemektedir.

Tez çalışması kapsamında tüm bu sorunların üstesinden gelebilmek amaçlanmıştır. Bu amaçla,  $\kappa$ -CA'nın MA ile fonksiyonlandırılma işlemi mikrodalga enerjisi ile gerçekleştirilerek, geleneksel yönteme göre daha yüksek metakrilatlanma derecesine ulaşılması hedeflenmiştir. Mikrodalga enerjisi ile geleneksel yönteme göre daha kontrollü bir reaksiyon sağlanacak ve metakrilatlanma derecesi (reaksiyon verimi) artırılırken aynı zamanda reaksiyon süresi de kısaltılacaktır. Metakrilatlanma derecesi arttıkça mekanik dayanımı yüksek hidrojeller elde edilmesi beklenmektedir.

Mikrodalga enerjisi metakrilatlanma prosesini iki şekilde etkiler. Birincisi termal etkidir. Dipol momente sahip moleküller mikrodalga enerjisini kolaylıkla emerek ısı enerjisine

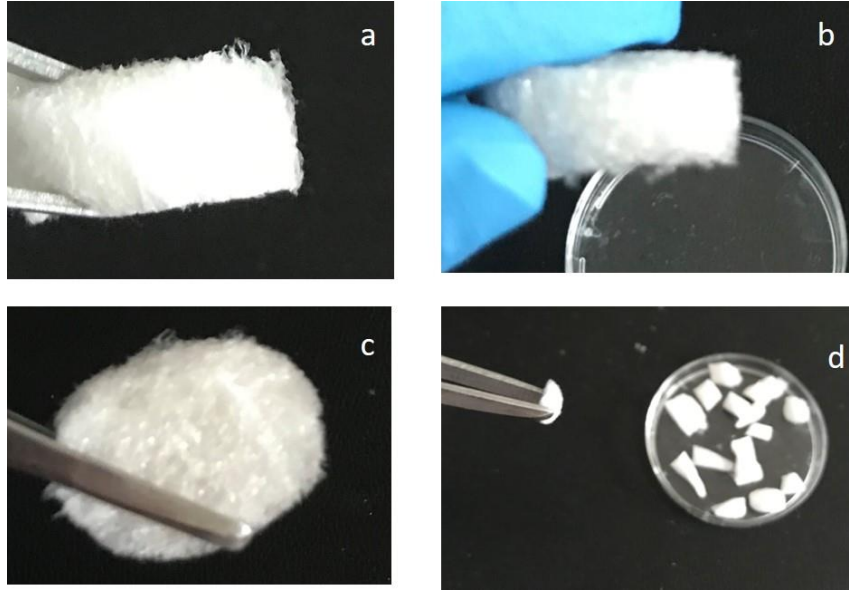


dönüştürürler. Sonrasında bu ısı enerjisi kinetik enerjiye dönüşür. Moleküller çok hızlı ısındıkları için reaksiyon çok daha hızlı gerçekleşir. İkinci etki ise mikrodalga enerjisi ile entropinin artmasıdır. Bu durumda moleküler düzeyde oluşan ısı enerjisi geleneksel yöntemlere göre daha fazla olmaktadır. Bu sayede reaksiyon boyunca oluşan ara basamaklar atlanır ve daha verimli bir bağlanma gerçekleşir (Irmak, Demirtaş ve Gümüşderelioğlu, 2019). Metakrilik anhidrit, çeşitli kimyasalların sentezinde kullanılan renksiz ve sıvı formda olan kimyasal ajandır.  $\kappa$ -CA'nın MA ile fonksiyonlandırılmasında MA,  $\kappa$ -CA'nın disakkarit birimlerindeki -OH grubundan polimere bağlanır. -OH grupları da mikrodalga enerjisini çok hızlı emerek reaksiyonunun geleneksel yöntemlere göre daha hızlı gerçekleşmesini sağlar.

Mikrodalga enerjisi genel olarak polimerizasyon reaksiyonları için geleneksel yöntemlere göre olan avantajlarından dolayı tercih edilmektedir. Mikrodalga enerjisi, çeşitli organik çözücülere olan gereksinimi ortadan kaldırarak daha çevreci ve düşük maliyetli reaksiyonların gerçekleşmesini sağlar. Çok çeşitli polimerlerde de kullanımı mevcuttur (Bagdal ve ark., 2003). Kitosan, selüloz gibi polisakkaritlerin modifikasyonları için de mikrodalga enerjisinden yararlanılmıştır (Englert ve ark., 2016).

Literatürde (Irmak, Demirtaş ve Gümüşderelioğlu, 2019) jelatin (Jel) polimeri MA kullanılarak mikrodalga yöntemiyle fonksiyonlandırılmıştır (Jel-MA) ve %4 (v/v) MA varlığında 1000 Watt güç uygulanan grupta metakrilatlanma derecesi  $89.0 \pm 1.4$  olarak bulunmuştur. Geleneksel yöntemde hacimce %4 MA kullanılarak metakrilatlanan Jel-MA'nın metakrilatlanma derecesi ise  $23.1 \pm 5.6$  bulunmuştur.

Sunulan tez çalışması kapsamında,  $\kappa$ -CA, hacimce %4 ve %12 oranlarındaki 2 farklı MA konsantrasyonu kullanılarak hem geleneksel hem de mikrodalga yöntemleri ile metakrilatlanmıştır. Mikrodalga yönteminde uygulanan koşulların (güç:1,000W, süre:5 dk) belirlenmesinde Hacettepe Üniversitesi, Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu'muzun önceki çalışmalarından faydalanılmıştır (Irmak, Demirtaş ve Gümüşderelioğlu, 2019). Böylece elde edilen gruplar kıyaslanmış ve literatürden örneklerle sonuçlar desteklenmiştir. Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle üretilen metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerlerinin liyofilizatörde kurutulduktan sonraki görüntüleri Şekil 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4.2. Yığın halinde elde edilen metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerinin görüntüleri; **a)** %12 (v/v) oranında MA içeren, mikrodalga ile üretilen polimer, **b)** %12 (v/v) oranında MA içeren, geleneksel yöntemle üretilen polimer, **c)** %4 (v/v) oranında MA içeren, mikrodalga ile üretilen polimer **d)** metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerlerine ait genel görünüm.

Elde edilen görüntüler (Şekil 4.2) incelendiğinde, gruplar arasında şekilsel açıdan belirgin bir fark olmadığı sonucu çıkarılmaktadır. Farklı MA oranları ve farklı yöntemlerle üretilen  $\kappa$ -CA grupları arasında yapısal farkları anlamak için  $^1\text{H-NMR}$  analizi ve viskozite ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

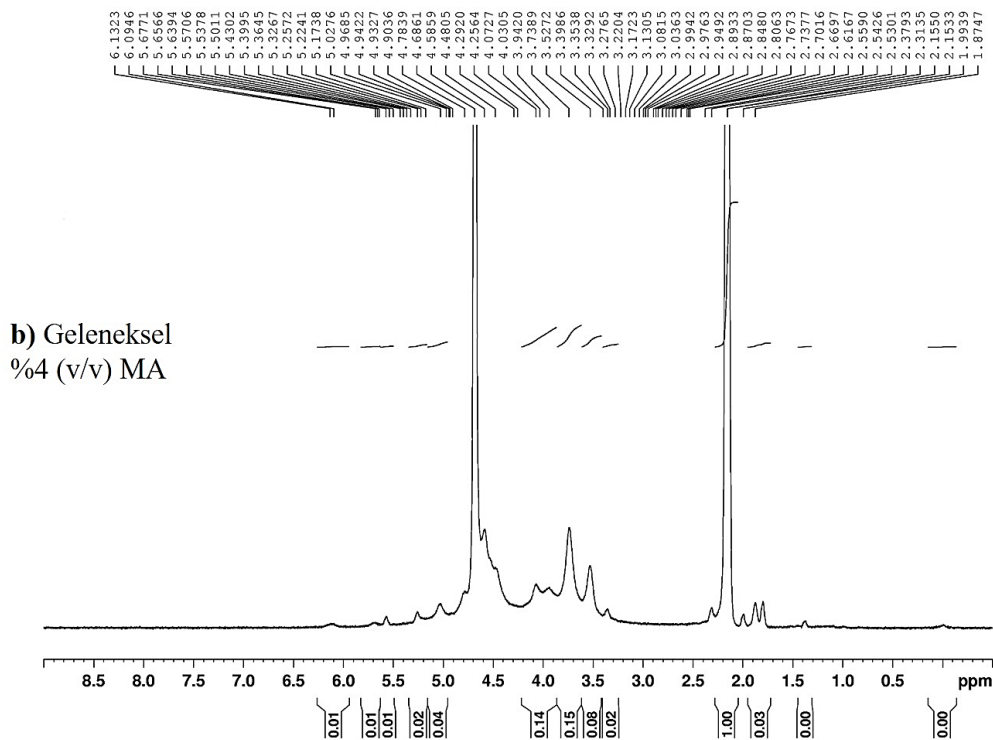
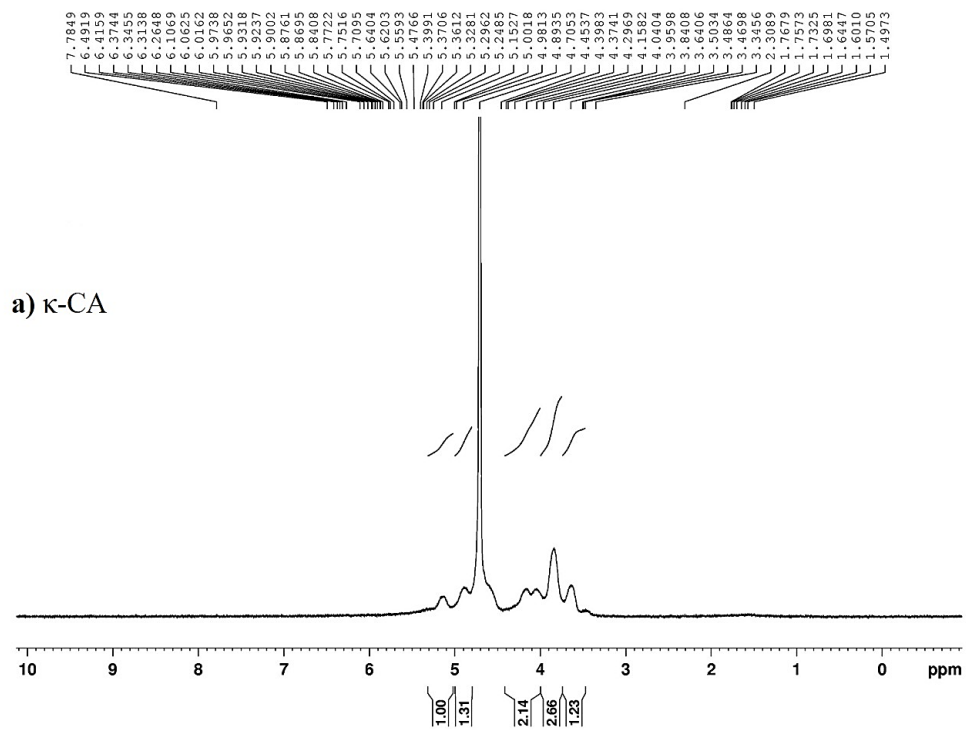
#### 4.1.1. $^1\text{H-NMR}$ Analizi (Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi)

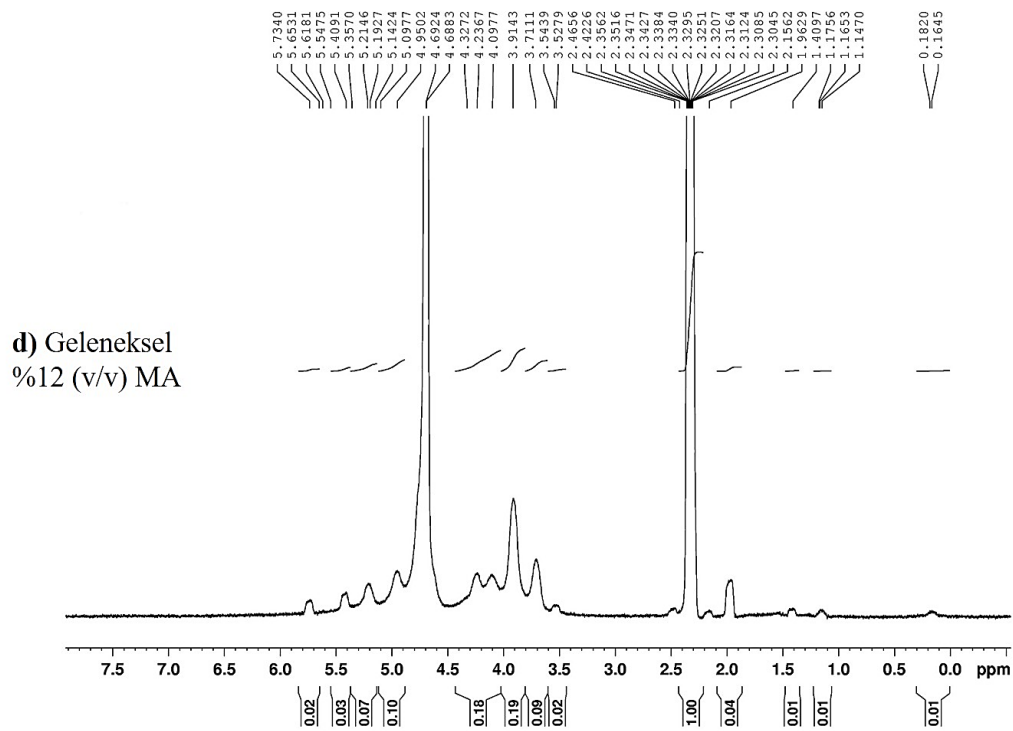
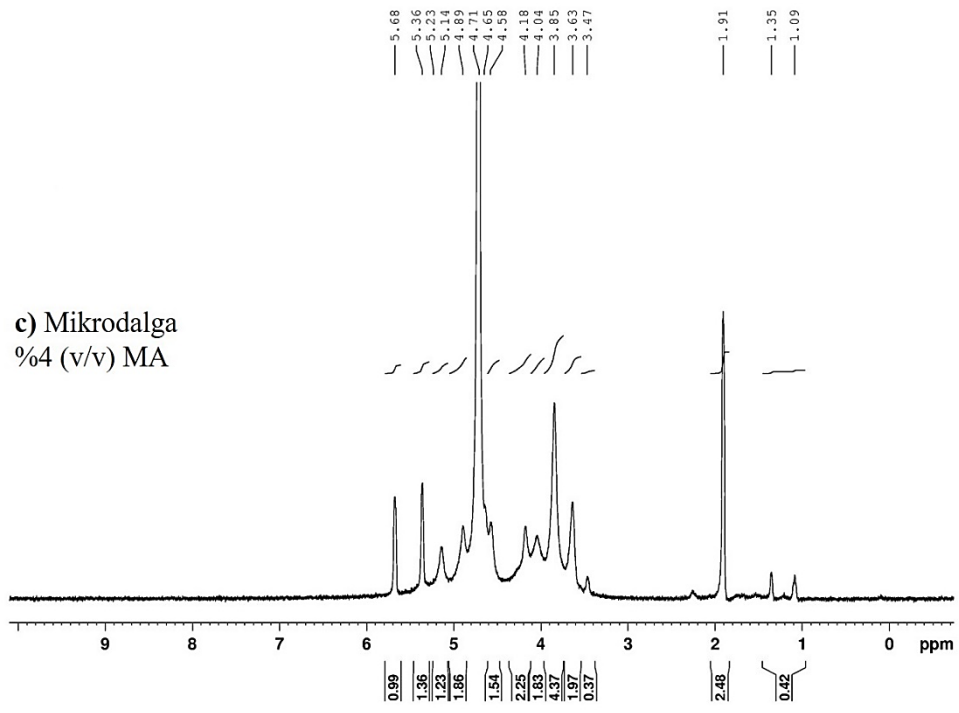
Nükleer manyetik rezonans (NMR) yöntemi, organik bileşiklerin kimyasal yapılarını anlamak için en çok kullanılan yöntemlerden biri olup, H, C, N ve P gibi çekirdekler için uygulanmaktadır. NMR, moleküler grupların bağlı miktarının kantitatif olarak belirlenmesini sağlar, böylece karışımlarda bile tüm moleküler yapıların miktarı ölçülebilmektedir. Bu yöntem, atom numarası ve/veya kütle numarası tek sayı olan atomların nükleer spine sahip

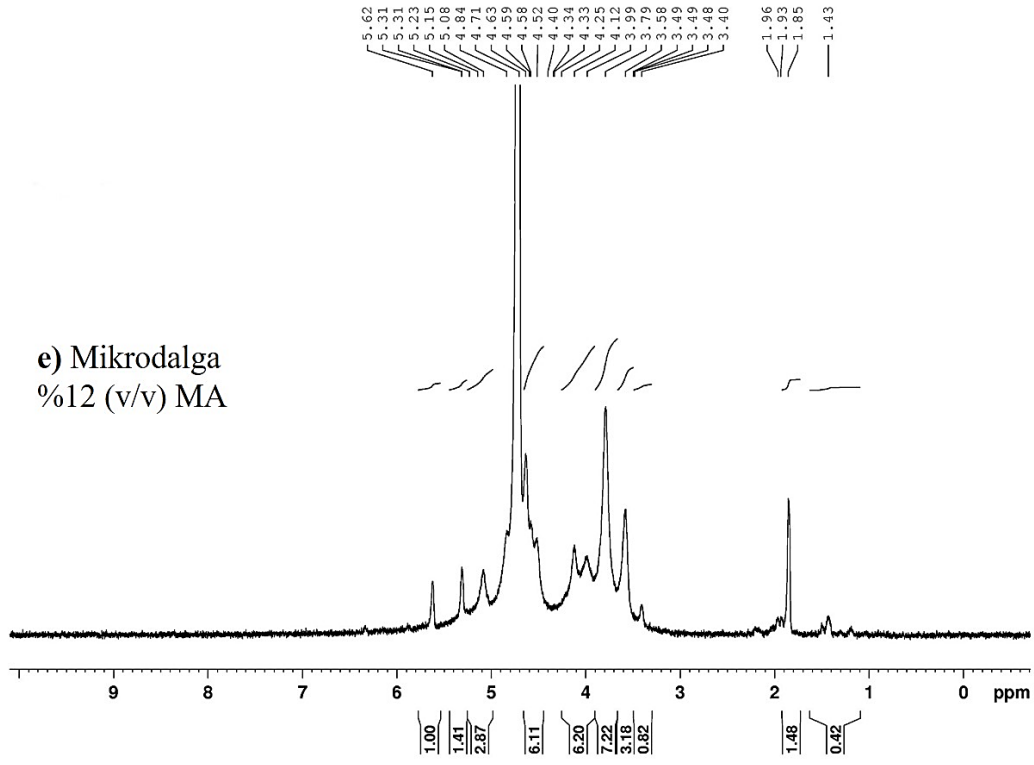
olmalarından kaynaklanan manyetik alandan faydalanılarak geliştirilmiştir. Bu atomlar, dış bir manyetik alan etkisinde bırakıldıklarında birer mıknatıs gibi davranmaktadır. Bu durumda, atomlara belirli bir enerji uygulandığında her bir atom farklı miktarda enerji absorplar. Temelde bu mantığa dayanan teknik sayesinde, bileşiğin yapısında yer alan atomlar ve/veya fonksiyonel gruplar hakkında bilgi edinilir.

<sup>1</sup>H-NMR temelde 3 veri sağlar. Birincisi, kimyasal kayma verileridir. Protonun çevresini tanımlayarak örnekteki proton tipleri hakkında bilgi sağlar. İkincisi, birbirine yakın protonların sayısı ve geometrisi hakkında bilgi verir. Üçüncüsü ise integral alanlardır. İntegraller, proton oranları ile ilgili bilgi verir. Pik şiddeti, sinyalin yüksekliği ile orantılıdır. Bu analiz örneğin kimyasal yapısı hakkında kantitatif olarak bilgi edinmemizi sağlar. Ayrıca literatürde, her bir molekül ve fonksiyonel grup için kayma değerlerine ( $\delta$ , ppm) değerlerine ulaşmak mümkündür (Malz ve Jancke 2005).

Şekil 4.3'te farklı MA miktarları kullanılarak mikrodalga ve geleneksel yöntemle metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerlerinin metakrilatlanmamış  $\kappa$ -CA polimeri ile karşılaştırmalı <sup>1</sup>H-NMR spektrumları sunulmuştur.







Şekil 4.3. Farklı MA oranları ve farklı yöntemlerle üretilen  $\kappa$ -CA polimerlerinin  $^1\text{H}$ -NMR spektrumları; **a)**  $\kappa$ -CA polimeri, **b)** geleneksel yöntemle üretilen %4 (v/v) MA oranına sahip  $\kappa$ -CA polimeri, **c)** mikrodalga yöntemiyle üretilen %4 (v/v) MA oranına sahip  $\kappa$ -CA polimeri, **d)** geleneksel yöntemle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip  $\kappa$ -CA polimeri, **e)** mikrodalga yöntemle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip  $\kappa$ -CA polimeri.

$^1\text{H}$ -NMR sonuçları incelendiğinde metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerlerinde,  $\kappa$ -CA polimerinden ve MA'dakinden farklı yeni sinyaller gözlenmiştir. MA'dan gelen akrilik

protonları  $\delta=5.5 - 6.0$  ppm'de, metil protonları ise  $\delta=1.89 - 2.0$  ppm'de gözlenmiştir.  $\kappa$ -CA'ya özgü olan  $\beta$ -galaktoz sinyal şiddeti ( $\delta=3.89$  ppm) metakrilat grubu ile bağlandığında azalır. MA,  $\kappa$ -CA'nın tekrar eden disakkarit yapısı üzerindeki -OH grubu üzerinden bağlanır.

Eşitlik 3.1 kullanılarak, spektrum verileri yardımıyla polimerlerin metakrilatlanma dereceleri (M.D) hesaplanmıştır. Yapılan hesaplamaların sonucu Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Örnek hesaplama Ek 1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Farklı yöntem ve farklı metakrilik anhidrit oranları ile sentezlenen metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerlerinin metakrilatlanma dereceleri.

<b>Üretim Yöntemi</b>	<b>Metakrilik Anhidrit Oranı (%) (v/v)</b>	<b>Metakrilatlanma Derecesi (%)</b>
Geleneksel	4	$25 \pm 5$
Mikrodalga	4	$85 \pm 9$
Geleneksel	12	$35 \pm 3$
Mikrodalga	12	$80 \pm 8$

Çizelge 4.1 incelendiğinde, aynı MA oranlarına sahip ve farklı yöntemlerle üretilerek metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA'nın metakrilatlanma dereceleri kıyaslandığında mikrodalga yöntemiyle sentezlenen  $\kappa$ -CA'nın M.D'lerinin geleneksel yöntemle sentezlenenlere kıyasla çok yüksek olduğu görülmektedir.

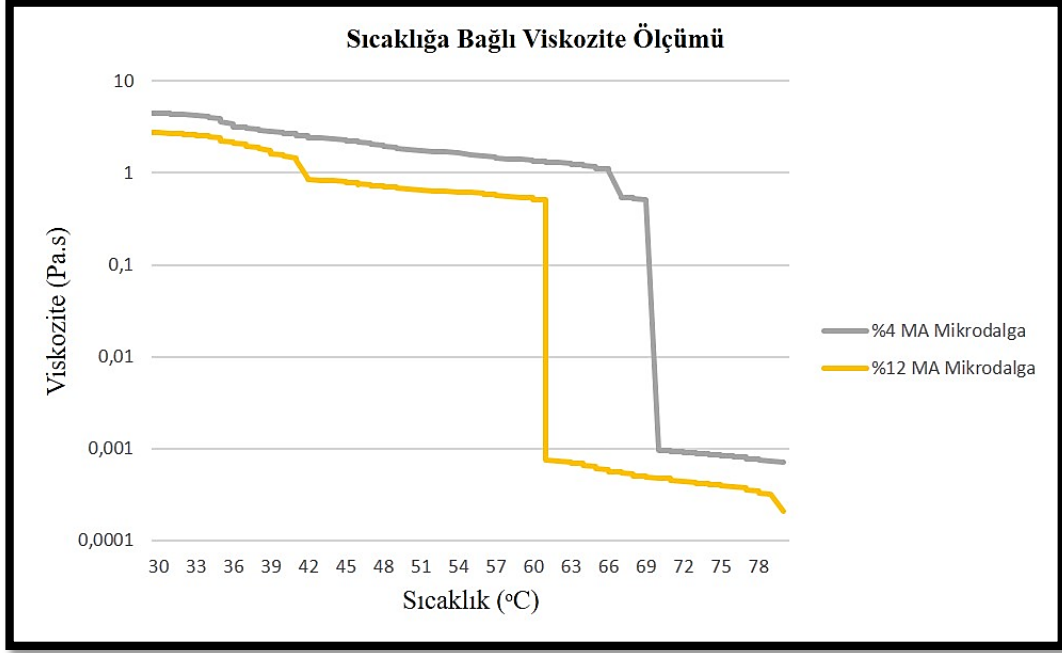
Literatürde geleneksel yöntemle metakrilatlanmış %12 (v/v) MA içeren  $\kappa$ -CA'nın M.D'si  $\%37 \pm 7$  olarak hesaplanmıştır (Mihaila ve ark., 2013). Sunulan tez çalışması kapsamında elde edilen sonuç da bu değere çok yakındır ( $\%35 \pm 3$ ). Grubumuz tarafından yapılan önceki çalışmada (Irmak, Demirtaş ve Gümüşderelioğlu, 2019) mikrodalga destekli sentezlenen Jel-MA'nın aynı reaksiyon koşullarında (1000 W, 5 dk, %4 (v/v) MA) metakrilatlanma derecesi  $\%89.0 = \pm 1.4$  olarak hesaplanırken, aynı hacimde MA kullanıldığında geleneksel yöntemle sentezlenen Jel-MA'nın M.D'si %23 olarak belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında alınan sonuçlar da ilgili çalışma ile uyumludur.

#### 4.1.2. Viskozite Tayini

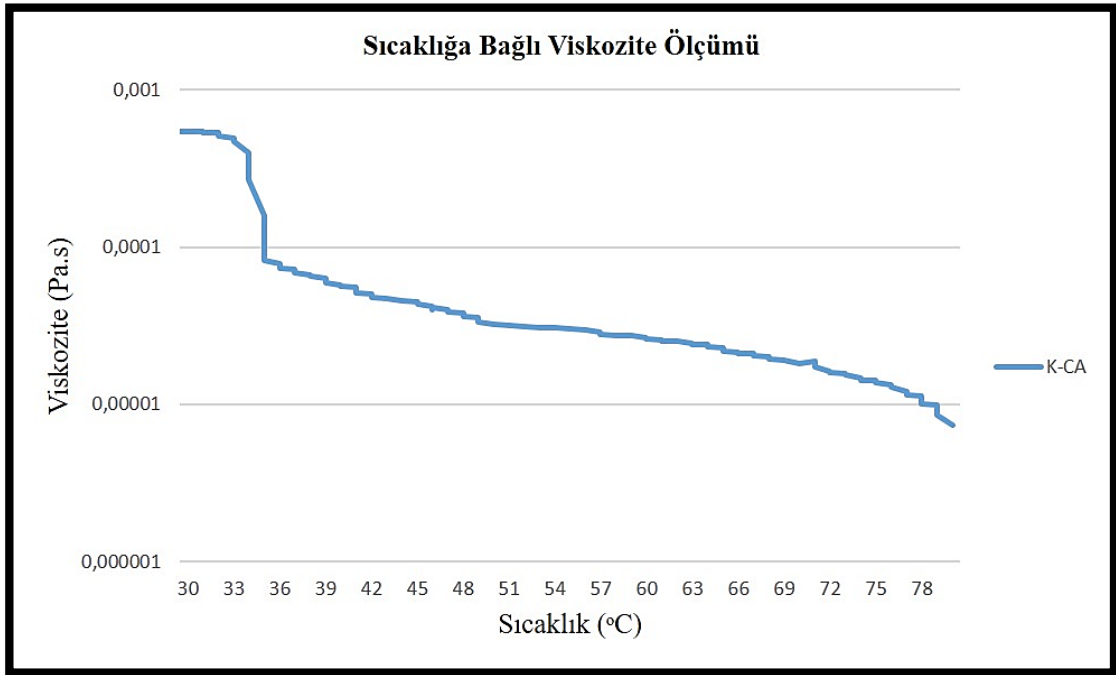
Viskozite, uygulanan bir kuvvet altında malzemenin akmaya karşı gösterdiği direnç olarak ifade edilir. Bir malzemenin 3B baskılanması için uygun aralıktaki viskozite değerlerine sahip olması gerekir. Mikroekstrüzyon biyoyazıcılarda uygun viskozite 0.03-60,000 Pa.s aralığındadır (Murphy ve Atala, 2014; Luo ve ark., 2019). Malzemelerin, baskılama teknolojilerinde uygulanan basınç sonucu oluşan kayma gerilimi nedeniyle deformasyona uğramalarını önlemek için viskozite değerleri önemlidir. Viskozite değeri örneğin konsantrasyonuna ve sıcaklığına bağlıdır.

Sunulan tez çalışması kapsamında, örneklerin artan sıcaklıkla viskozite değişimlerini belirlemek için 30°C'den başlayarak 80°C'ye kadar viskozite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında hidrojel hazırlamak amacıyla kütlece %8 (w/v) oranında polimer çözeltileri kullanıldığı için viskozite ölçümünde de %8'lik metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerleri hazırlanmıştır. Metakrilatlanmamış  $\kappa$ -CA ise reaksiyon öncesi %1.5'lük (w/v) hazırlandığı için ve aynı zamanda, literatürdeki vizkozite değerleriyle kıyaslamak adına %1.5 (w/v) konsantrasyonda hazırlanmıştır. Metakrilatlanmış ve metakrilatlanmamış  $\kappa$ -CA çözeltilerinin sıcaklığa bağlı viskozite değişimleri sırasıyla Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te sunulmuştur.





Şekil 4.4. Hacimce %4 ile %12 MA ve mikrodalga yöntemiyle metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerlerinin artan sıcaklığa bağlı olarak viskozitelerinin değişimi.



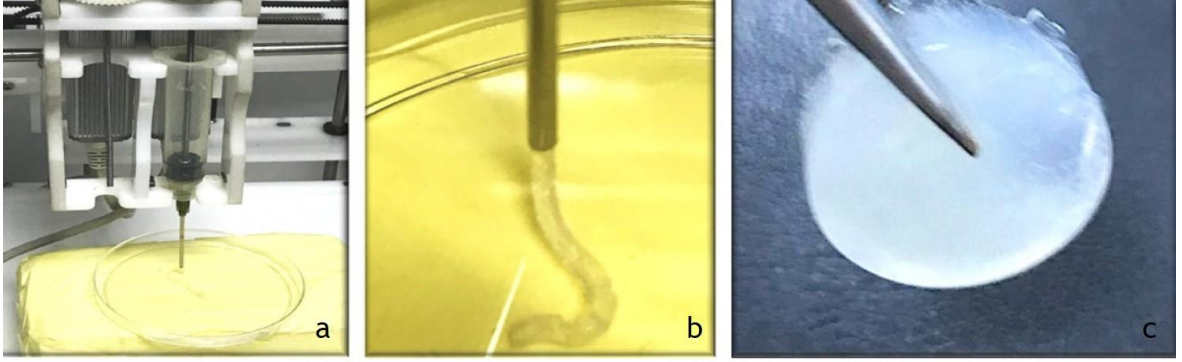
Şekil 4.5.  $\kappa$ -CA polimerinin artan sıcaklığa bağlı olarak viskozite değişimi.

Metakrilatlama işleminin malzemenin viskozitesi üzerindeki etkisine bakıldığında ise iki farklı MA oranında da (hacimce %4 ve %12) polimerlerin, metakrilatlanmamış  $\kappa$ -CA'a göre daha yüksek viskoziteye sahip oldukları görülmektedir. Ayrıca, %4 (v/v) MA içeren mikrodalga grubunun da %12 (v/v) MA içeren mikrodalga grubuna göre aynı sıcaklıkta daha yüksek viskozite değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Grafik incelendiğinde; %12 (v/v) MA içeren mikrodalga grubunun 60°C'da, %4 (v/v) MA içeren mikrodalga grubunun da 70°C civarında viskozitelerinin keskin bir geçişle azaldığı görülmektedir. Bu durum metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerinin oda sıcaklığında bal kıvamında katıya yakın bir görünüm sergilerken artan sıcaklıkla zincir yapısındaki düzensizliğin artmasına ve belli bir sıcaklık değerinde (keskin geçişin olduğu) katı halden sıvı hale geçişine bağlı olarak açıklanmıştır.

Metakrilatlanan  $\kappa$ -CA polimerlerinin PBS içerisindeki %8'lik (w/v) çözeltileri 55°C'den itibaren çözünmeye başlayıp 80°C'de tamamen çözünmektedirler.  $\kappa$ -CA'nın, IRGACURE-2959® varlığında foto-çapraz bağlama işleminin gerçekleşmesi için polimer konsantrasyonunun %8'den (w/v) az olmaması gerekmektedir. Bu da zaten doğası gereği yüksek viskoziteye sahip olan  $\kappa$ -CA polimerinin %8 gibi daha yüksek konsantrasyonda ve düşük sıcaklıkta (30°C) viskozitesinin çok yüksek olmasına neden olmaktadır.

Bir biyoçözelti olarak sunulması hedeflenen metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerinin değişken viskozite aralığına sahip olması manipülasyonda zorluklara neden olmaktadır. Şöyle ki, metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA biyoçözelti olarak 80°C'de düşük viskoziteli akışkan formundayken, hücrelerle karıştırılabilmesi için sıcaklık 40-60°C' aralığına düşürülmekte ve bu durumda da biyoçözeltinin viskozitesi önemli miktarda artmaktadır. Viskozitenin belli bir ölçüde artması 3B baskılama için olumlu bir özellik sergilerken, sıcaklık kontrolünün sağlanamaması durumunda yüksek sıcaklıkta hücre kayıplarının olması, düşük sıcaklıklarda ise viskozite artışına bağlı olarak malzemede deformasyonların meydana gelmesi, manipülasyon problemleri olarak karşımıza çıkmaktadır.  $\kappa$ -CA, yüksek viskozite gerektiren çalışmalar için uygun bir biyoçözeltidir. Yapılan viskozite ölçümlerinin sonucunda, metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA'nın manipülasyon zorlukları aşıldığında ve uygun teknolojik koşullarda Jel-MA gibi biyoçözeltilere alternatif olabileceği söylenebilir.

Çalışma kapsamında sentezlenen metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA çözeltileri ile Fab@home mikroekstrüzyon biyoyazıcı kullanılarak 3B biyobaskılama işlemi gerçekleştirilmiştir. Görüntüler Şekil 4.6'da sunulmuştur.



Şekil 4.6. **a)** Ekstrüzyon biyoyazıcı (Fab@home) ile %12 (v/v) oranında MA içeren ve mikrodalga yöntemi ile üretilen  $\kappa$ -CA'nın 3B baskılanması; **b)** şırınganın ucundan ipliksi formda baskılanan  $\kappa$ -CA'nın uygun viskozitede biyoçözelti olarak sunulması; **c)** UV sonrası 3B baskılanmış hidrojelin görüntüsü.

#### 4.2. Metakrilatlanmış $\kappa$ -CA Hidrojel Üretimi ve Karakterizasyon Çalışmaları

Sunulan tez çalışması kapsamında, mikrodalga ve geleneksel yöntemle üretilen metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerlerinden kararlı yapıda hidrojeller elde edilmesi için çapraz-bağlama koşulları incelenmiştir. Hidrojel oluşturmak için polimer (PBS içinde çözünen miktarı) ve IRGACURE-2959<sup>®</sup> (PBS içinde çözünen miktarı) konsantrasyonları ile UV maruziyet süreleri değiştirilmiştir. Çalışılan değerler ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de sunulmuştur.

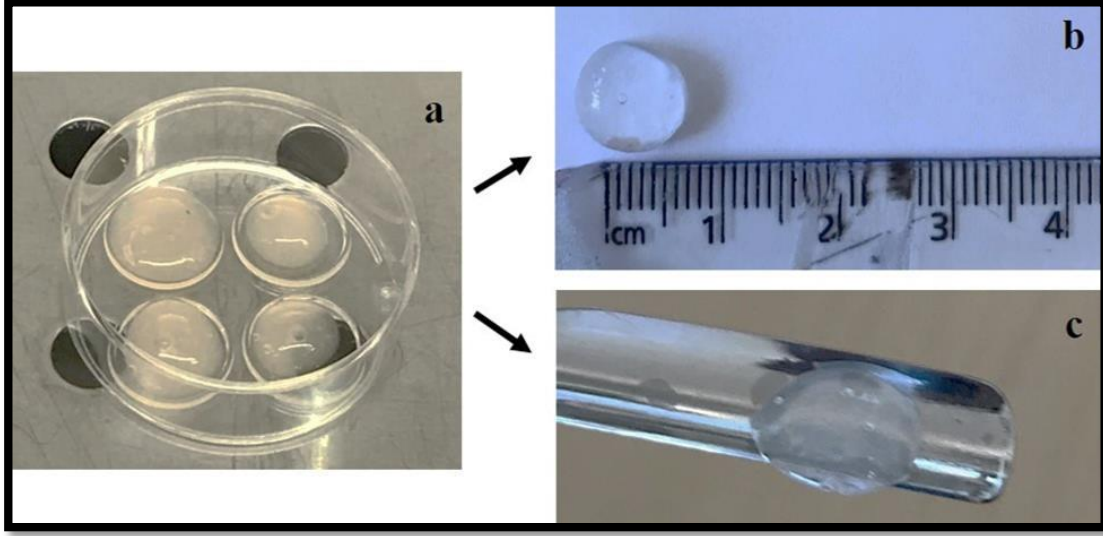
Çizelge 4.2. Metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA (Hacimce %12 MA ve mikrodalga yöntemiyle üretilen) hidrojelleri oluşturmak için çalışılan proses değişkenlerinin değerleri.

Polimer Konsantrasyonu (%) (w/v)	IRGACURE-2959 <sup>®</sup> Konsantrasyonu (%) (w/v)	UV Maruziyet Süresi (s)	Hidrojel Oluşumu
4	0.25	15	-
4	0.25	30	-
4	0.25	40	-
4	0.30	15	-
4	0.30	30	-
4	0.30	40	-
4	0.50	15	-
4	0.50	30	-
4	0.50	40	-
4	1.00	15	-
4	1.00	30	-
4	1.00	40	-
6	0.25	15	-
6	0.25	30	-

Çizelge 4.2. Metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA (Hacimce %12 MA ve mikrodalga yöntemiyle üretilen) hidrojelleri oluşturmak için çalışılan proses değişkenlerinin değerleri (Devamı).

6	0.25	40	-
6	0.30	15	-
6	0.30	30	-
6	0.30	40	-
6	0.50	15	-
6	0.50	30	-
6	0.50	40	-
6	1.00	15	-
6	1.00	30	-
6	1.00	40	Hidrojel oluştu. PBS'de 37°C'de 1 günde bozundu.
8	0.25	15	-
8	0.25	30	-
8	0.25	40	-
8	0.30	15	-
8	0.30	30	-
8	0.30	40	-
8	0.50	15	-
8	0.50	30	-
8	0.50	40	-
8	1.00	15	-
8	1.00	30	Hidrojel oluştu. PBS'de 37°C'de 1 günde bozundu.
8	1.00	40	Kararlı yapıda hidrojeller elde edildi.

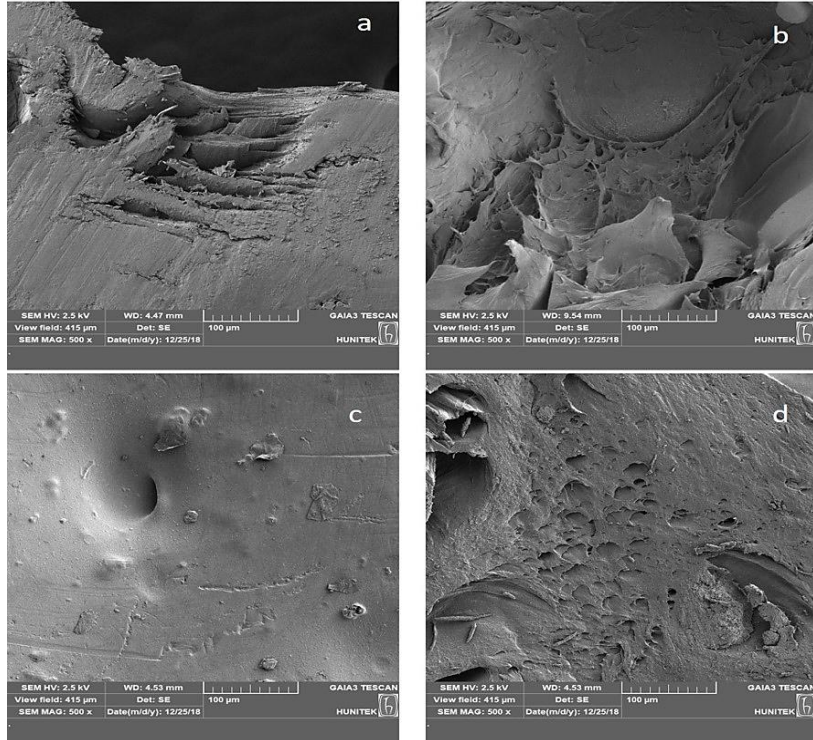
Çizelgedeki açıklamalardan da görüldüğü gibi, %12 MA ve mikrodalga ile metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerinin %8'lik çözeltileri, 40 s'de %1 IRGACURE-2959® konsantrasyonunda UV ile başarılı biçimde çapraz bağlanarak hidrojel oluşturmuştur. Diğer tüm metakrilatlanma koşullarında elde edilen polimerlerin de %8'lik çözeltileri aynı çapraz bağlanma koşullarında hidrojel oluşturmuştur. Oluşan hidrojel görüntüsü Şekil 4.7'de sunulmuştur.



Şekil 4.7. Hidrojel görüntüleri (%12 (v/v) MA, mikrodalga); **a**) 4 gözlü hücre kültürü Petri'sinde (35 mm çap) 1 göze 100  $\mu$ L hidrojel çözeltisi baskılanarak çapraz bağlanan hidrojellerin görüntüsü, **b**) PBS'te 1 gün bekletilerek yapısına su alan hidrojin görüntüsü (çap), **c**) PBS'te 1 gün bekletilerek yapısına su alan hidrojin yan görünümü (kalınlık).

#### 4.2.1. Morfolojik Analiz (SEM) Sonuçları

Tez çalışması kapsamında üretilen ve kritik nokta kurutucuda kurutulan hidrojellerin, yüzey morfolojileri SEM ile görüntülenmiştir. Görüntüler Şekil 4.8’de sunulmuştur. Hidrojellerin kesitleri alınmadan sadece yüzeyleri görüntülenmiştir. Hücre içeren hidrojellerle aradaki farkı daha iyi anlamak için görüntüleme bu şekilde yapılmıştır. Normalde, metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA hidrojellerinin kuru hidrojellerinden mikro yapıda kesitler alındığında iç kısımlarının gözenekli ve katmansal yapıda olduğu bilinmektedir (Mihaila ve ark., 2013).

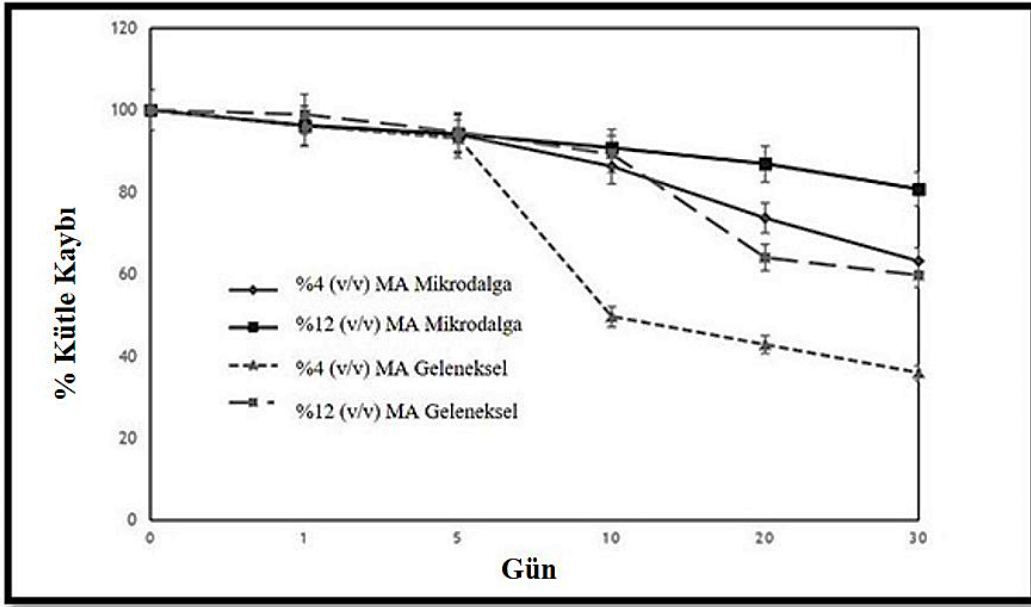


Şekil 4.8. Mikrodalg ve geleneksel yöntemlerle metakrilatlanan farklı MA oranlarına sahip hidrojellerin yüzey morfoloji görüntüleri; **a)** mikrodalg yöntemiyle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hidrojel (500X büyütme) **b)** geleneksel yöntemle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hidrojel (500X büyütme) **c)** mikrodalg yöntemiyle üretilen %4 (v/v) MA oranına sahip hidrojel (500X büyütme) **d)** geleneksel yöntemle üretilen %4 (v/v) MA oranına sahip hidrojel (500X büyütme).

Görüntüler incelendiğinde morfolojik olarak gruplar arasında belirgin bir fark görülmemiştir.

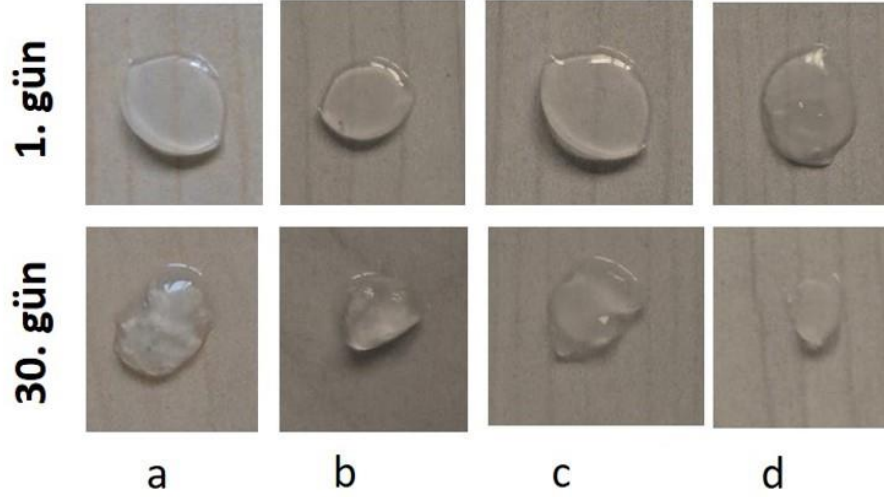
#### 4.2.2. Biyobozunurluk Deneyi Sonuçları

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan malzemeler için biyobozunurluk istenilen bir özelliktir. Hidrojellerde bozunma hidrolitik ve enzimatik olarak iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. Hidrolitik bozunma, kimyasal açıdan kararsız olan bağların kopması sonucu gerçekleşmektedir.  $\kappa$ -CA polimerinin hidrolitik olarak bozunduğu literatürde yapılan çalışmalar sayesinde bilinmektedir (Mihaila ve ark., 2013). Otuz gün boyunca PBS (pH=7.4) içerisinde ve 37°C’de yapılan bozunurluk deneyinin sonucunda elde edilen grafik Şekil 4.9’da verilmiştir. Hidrojellerin görüntüleri ise Şekil 4.10’da sunulmuştur.



Şekil 4.9. Çalışma kapsamında üretilen hidrojellerin 30 gün süresince hidrolitik bozunması.





Şekil 4.10. Hidrojellerin biyobozunurluk görüntüleri; **a**) mikrodalga yöntemiyle üretilen %12 (v/v) MA içeren grup **b**) mikrodalga yöntemiyle üretilen %4 (v/v) MA içeren grup **c**) geleneksel yöntemle üretilen %12 (v/v) MA içeren grup **d**) geleneksel yöntemle üretilen %4 (v/v) MA içeren grup.

Yapılan deney sonucunda, elde edilen bozunma oranları şu şekildedir:

- %12 (v/v) Mikrodalga %19 ± 4 oranında bozunmuştur.
- %4 (v/v) Mikrodalga %37 ± 5 oranında bozunmuştur.
- %12 (v/v) Geleneksel %40 ± 6 oranında bozunmuştur.
- %4 (v/v) Geleneksel %64 ± 2 oranında bozunmuştur.

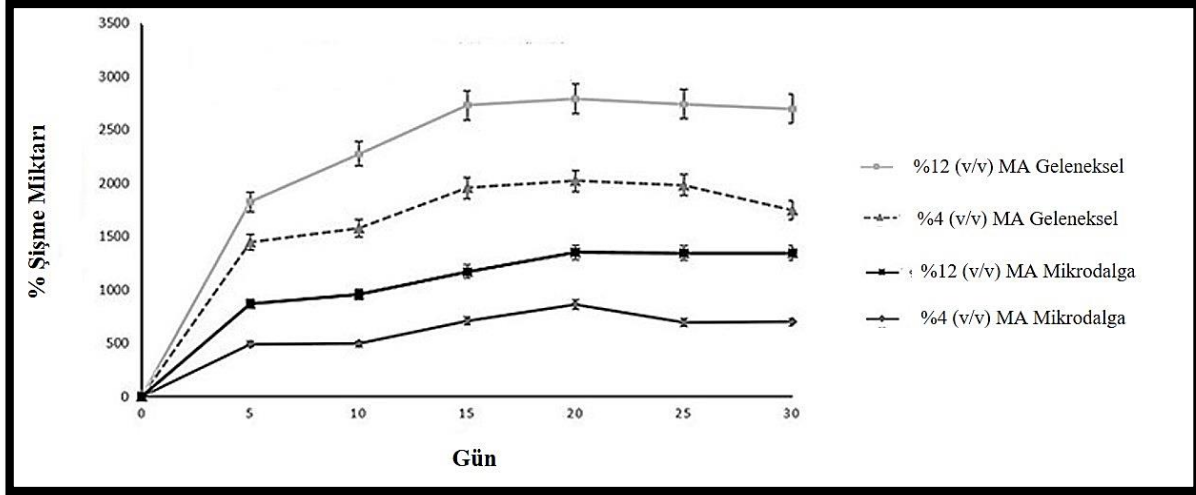
Gruplar arasındaki farklara bakıldığında, %12 (v/v) MA içeren ve mikrodalga yöntemiyle üretilmiş olan grubun diğer gruplara göre belirlenen sürede çok daha az bozunduğu görülmektedir. Bu bağlamda, mikrodalga yönteminin ve yüksek MA konsantrasyonunun malzemeyi kimyasal açıdan daha kararlı kıldığı sonucu çıkarılabilir.

Jel-MA ile yapılan benzer çalışmada da (Irmak, Demirtaş ve Gümüşderelioğlu, 2019) mikrodalga yöntemiyle metakrilatlanan jelatin hidrojellerin aynı koşullarda geleneksel yöntemle üretilen hidrojellere göre daha az bozunduğu rapor edilmiştir. Geleneksel yöntemle üretilen %4(v/v) MA oranına sahip Jel-MA 10. günden sonra tamamen bozunmuştur.

### 4.2.3. Şişme Analizi Sonuçları

Su tutma veya şişme olarak bilinen kavram hidrojellerin yapısı içerisine alınan su veya tampon çözeltiyi ifade eder ve hidrojel karakterizasyonu için önemlidir. Şişme olayı temelde hidrojelin hidrofilik gruplarıyla su arasındaki etkileşimlerle ilgilidir.  $\kappa$ -CA'nın su tutma kapasitesi yüksektir. Elde edilen hidrojeller de yüksek oranda su alarak şişmişlerdir. Hidrojeller yüksek su tutma kapasiteleri yönüyle kıkırdak dokuya benzetilebilirler. Bu da yapılan çalışma kapsamında istenilen bir özelliktir (Ottenbrite, 2010; Mihaila ve ark., 2013).

$\kappa$ -CA hidrojellerin su tutma kapasiteleri gravimetrik yöntemle belirlenmiş ve Eşitlik 3.3 yardımıyla hesaplanmıştır. Yapılan analizin sonucunda elde edilen grafik Şekil 4.11'de sunulmuştur.



Şekil 4.11. Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle üretilen farklı MA oranlarına (%12 (v/v) ve %4 (v/v)) sahip hidrojellerin kuru temelde hesaplanan % şişme değerleri.

Elde edilen veriler doğrultusunda, tüm hidrojel gruplarının 20. günde denge şişmeye ulaştıkları görülmüştür. Ancak, şişme değerleri sırasıyla %12 (v/v) MA geleneksel ( $2790 \pm 7$ ) > %4 (v/v) MA geleneksel ( $2021 \pm 5$ ) > %12 (v/v) MA mikrodalga ( $1345 \pm 4$ ) > %4 (v/v) MA mikrodalga ( $864 \pm 4$ ) hidrojelleri şeklindedir.

Geleneksel yöntemle üretilen hidrojellerin, mikrodalga yöntemiyle üretilen hidrojellere göre daha fazla su tutma kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca %12 (v/v) MA oranına sahip olan hidrojellerin %4 (v/v) MA oranına sahip olan hidrojellere göre daha fazla şiştikleri görülmektedir.

MA,  $\kappa$ -CA polimerine disakkarit birimindeki –OH grubu üzerinden bağlanmaktadır. Bağlanma olmadığında ya da daha az olduğunda boşta kalan –OH grupları su ile hidrojen bağı kurarak yapılarına daha çok su alıp şişme eğilimi göstereceklerdir. Bu nedenle geleneksel yöntemle üretilen hidrojeller yapılarına daha çok su alıp şişmiş olabilir.

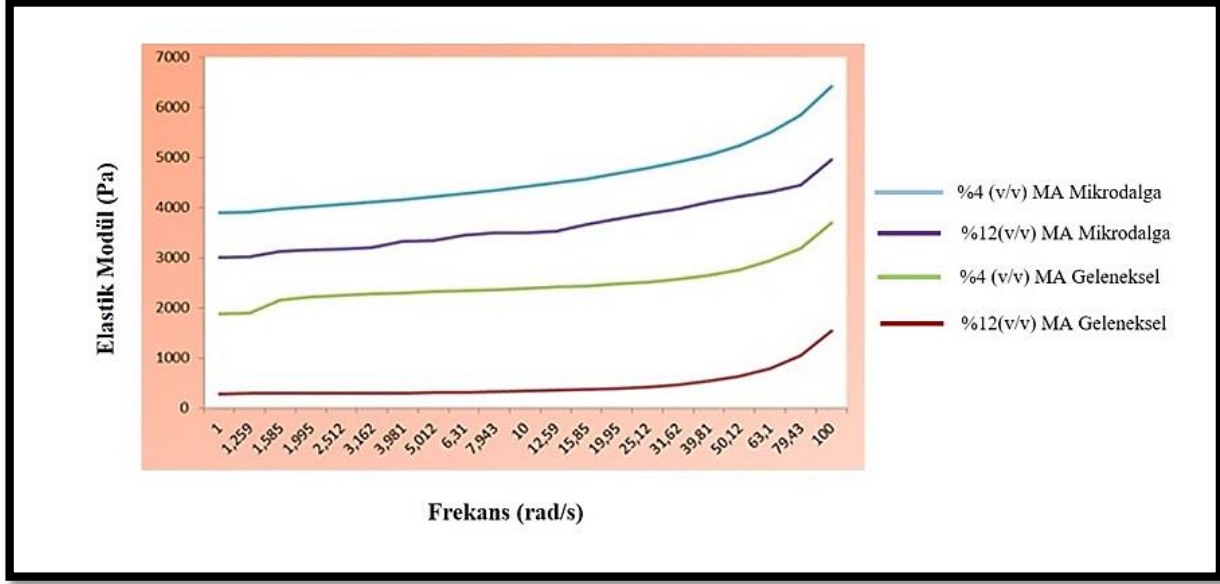
#### **4.2.4. Reolojik Analizler**

Reolojik analizler malzemelerin jel karakteristiği, viskoelastik özellikleri ve mekanik dayanımı hakkında bilgi edinmemizi sağlayan önemli analizler olup malzemelerin belirli bir kuvvet altındaki davranışlarını açıklamaktadırlar. Reolojik analizlerde modülüs kavramı genel olarak malzemelerin hareket etmeye karşı olan direncini ifade etmektedir. Tamamen elastik malzemeler katı gibi davranırken, tamamen viskoz malzemeler sıvı gibi davranmaktadır. Bu bağlamda reoloji, sıvı ve katıların mekanik davranışları üzerinde bilgi edinmemizi sağlayan bir analizdir.

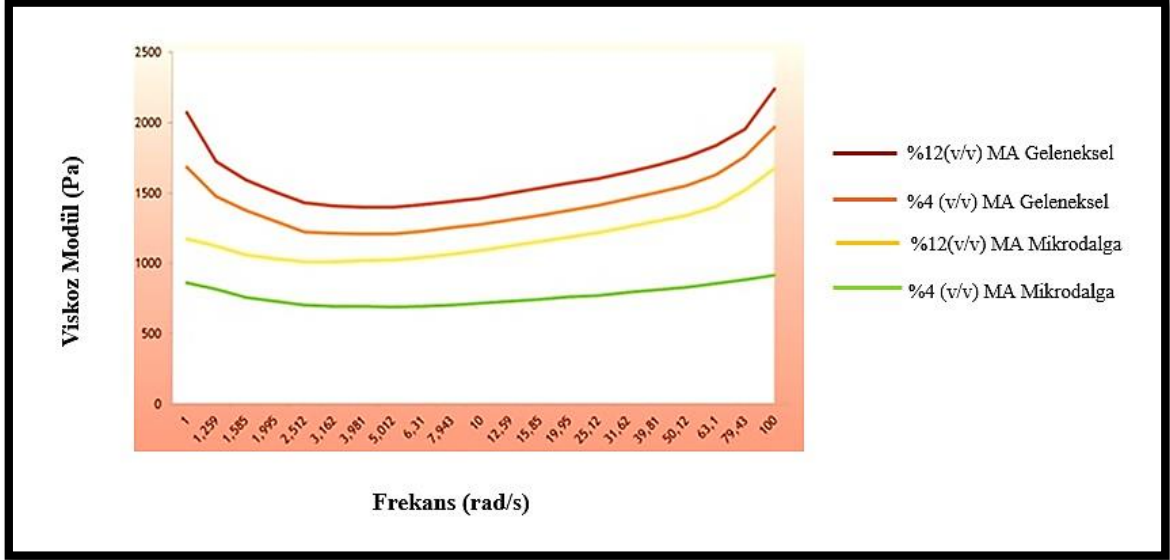
Doku mühendisliği çalışmalarında da sıklıkla tercih edilen hidrojellerin reolojik özellikleri dokuyu taklit etmek için önemlidir. Kıkırdak doku yüksek sıkışma ve gerilme değerlerine sahiptir. Bu nedenle kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılacak malzemenin viskoelastik özelliklerinin bu değerlere yakın olması istenmektedir. Reolojik analizler kapsamında sırasıyla frekans ve gerinim taramaları gerçekleştirilmiştir.

#### 4.2.4.1. Frekans Taraması Sonuçları

Reolojik analizler kapsamında yapılan frekans taraması sonucu elde edilen grafikler sırasıyla Şekil 4.12 ve 4.13’de verilmiştir.



Şekil 4.12. Mikrodalga ve geleneksel yöntemlerle üretilen %12 (v/v) ve %4 (v/v) MA oranlarına sahip hidrojellerin elastik modüllerini ifade eden grafik; %12 (v/v) MA oranına sahip geleneksel yöntemle üretilmiş hidrojel **kırmızı**; %4 (v/v) MA oranına sahip geleneksel yöntemle üretilmiş hidrojel **yeşil**; %12 (v/v) MA oranına sahip mikrodalga yöntemle üretilmiş hidrojel **mor**; %4 (v/v) MA oranına sahip mikrodalga yöntemle üretilmiş hidrojel **mavi** renkte gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Mikrodalga ve geleneksel yöntemlerle üretilen %12 (v/v) ve %4 (v/v) MA oranlarına sahip hidrojellerin viskoz modüllerini ifade eden grafik; %12 (v/v) MA oranına sahip geleneksel yöntemle üretilmiş hidrojel **kırmızı**; %4 (v/v) MA oranına sahip geleneksel yöntemle üretilmiş hidrojel **turuncu**; %12 (v/v) MA oranına sahip mikrodalga yöntemle üretilmiş hidrojel **sarı**; %4 (v/v) MA oranına sahip mikrodalga yöntemle üretilmiş hidrojel **yeşil** renkte gösterilmiştir.

Depo modülü (elastik modül,  $G'$ ) hidrojellerin viskoelastik karakterde olduğunu göstermektedir. Yapılan frekans taraması aralığında (1-100 rad/s) tüm grupların yapısal bütünlüklerini korudukları ve kararlı yapıda hidrojel yapısı sergiledikleri görülmüştür. Şekil 4.12'den de anlaşıldığı gibi hacimce %4 MA içeren ve mikrodalga yöntemiyle metakrilatlanmış hidrojel grubunun elastik modül değerinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu (4000 Pa) görülmektedir. Doğrusal viskoelastik aralık içindeki depo modülünün (elastik modülün) mutlak değeri, malzemenin gücünü, yani deformasyona dayanan kuvveti gösterir. Literatürde yapılan benzer çalışmada da %4 (v/v) MA ve 1000 W mikrodalga yöntemiyle metakrilatlanmış Jel-MA hidrojelinin frekans grafiğinde depo modülünün diğer gruplara göre daha yüksek (40 kPa) olduğu rapor edilmiştir (Irmak, Demirtaş ve

Gümüşderelioğlu, 2019). Tüm bunlar dahilinde elde edilen sonuçlar hidrojel özellikleri açısından da uygundur.

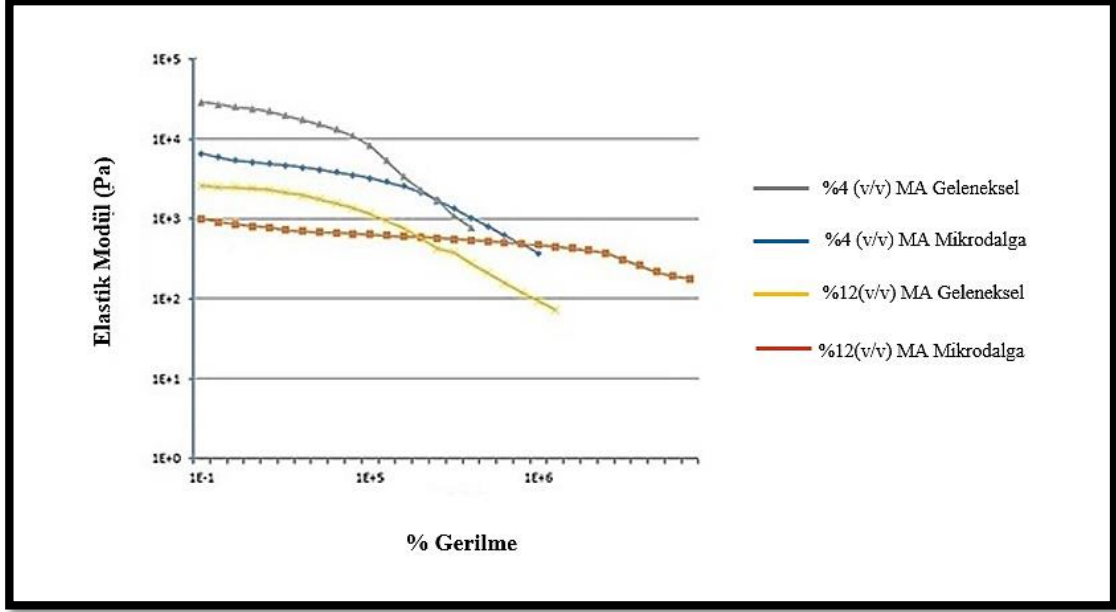
Viskoz modülü (kayıp modül,  $G''$ ) en yüksek olan grup %12 (v/v) MA oranına sahip geleneksel yöntemle sentezlenen  $\kappa$ -CA hidrojelı olup, aynı grubun elastik modülü en düşüktür. Buna göre bu grubun artan frekans aralığında diğer gruplara göre daha kırılğan özelliklere sahip olduğu sonucu çıkarılmaktadır.

Bu veriler ışığında sonuçları taartışamak gerekirse; %4 (v/v) MA oranına sahip mikrodalga yöntemiyle üretilen hidrojeller, diğer gruplara göre daha elastiktir, yani mekanik dayanımı diğer gruplara göre artan frekans karşısında daha yüksektir. Viskozite tayini deneyinde de %12 (v/v) MA mikrodalga grubuna göre %4 (v/v) MA mikrodalga grubunun daha yüksek viskoziteye sahip olduğu bilinmektedir (Şekil 4.4). Bu da %4 (v/v) MA mikrodalga grubunun daha az akışkan olduğu ve katı hal özelliklerinin daha fazla olduğu şeklinde yorumlanmaktadır. Sonrasında, %12 (v/v) MA oranına sahip mikrodalga grubunun viskoelastik özelliğinin geleneksel gruplara göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Mikrodalğanın malzemenin fiziksel özelliklerini, mekanik dayanımını etkilediği sonucu da buradan ayrıca anlaşılmalıdır.

Frekans taraması sonucunda tüm gruplar için  $G' > G''$  şeklindedir. Bu durumda tüm gruplara ait hidrojellerin viskoelastik katı davranışı sergilediği sonucu çıkarılmaktadır.

#### 4.2.4.2 Gerinim Taraması Sonuçları

Mikrodalga ve geleneksel yöntemlerle üretilen %4 (v/v) ve %12(v/v) MA oranlarına sahip hidrojelere 2 s aralıklarla 1 Hz osilasyon uygulanarak gerinim taraması yapılmıştır. Elde edilen verileri doğrultusunda oluşturulan grafik Şekil 4.14'te sunulmuştur.



Şekil 4.14. Mikrodalga ve geleneksel yöntemlerle üretilen %12 (v/v) ve %4 (v/v) MA oranlarına sahip hidrojellerin gerinim-elastik modülünü ifade eden grafik; %12 (v/v) MA oranına sahip geleneksel yöntemle üretilmiş hidrojel **sarı**; %4 (v/v) MA oranına sahip geleneksel yöntemle üretilmiş hidrojel **gri**; %12 (v/v) MA oranına sahip mikrodalga yöntemle üretilmiş hidrojel **turuncu**; %4 (v/v) MA oranına sahip mikrodalga yöntemle üretilmiş hidrojel **mavi** renkte gösterilmiştir.

Hidrojeller, polimer zincirleri bir noktadan sonra deforme olmuştur. Artan gerinim ile yapısal bütünlüğünü en hızlı kaybeden grup %4 (v/v) MA geleneksel grup olmakla birlikte, kararlı yapısını artan salınımına rağmen en uzun süre koruyan grup %12 (v/v) MA mikrodalga grubu hidrojellerdir. Literatürde de geleneksel yöntemle üretilen Jel-MA hidrojelini (%4 (v/v) MA) artan gerinim ile yapısal bütünlüğünü kaybederken, mikrodalga yöntemi ile sentezlenen Jel-

MA (%4 (v/v) MA) hidrojel grupları kararlı yapılarını korumuşlardır (Irmak, Demirtaş ve Gümüşderelioğlu, 2019).

Mikrodalga ile sentezlenen hidrojel gruplarının frekans ve gerinim taramalarındaki viskoelastik özelliklerinin geleneksel yöntemle sentezlenen hidrojel gruplarına göre daha iyi olduğu net olarak görölmektedir. Fakat, kullanılan MA yüzdelerinin (hacimce %4 ve %12)  $\kappa$ -CA hidrojelleri üzerindeki etkileri net olarak anlaşılamamaktadır. Frekans taramalarında viskoelastik özellikleri en iyi olan grup %4 (v/v) MA mikrodalga iken, gerinim taramasında %12 (v/v) MA mikrodalga grubudur.

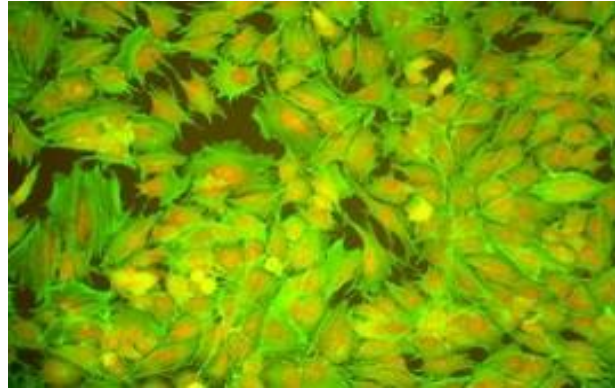


### 4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmanın bu kısmında hidrojel öncül çözeltisi, hücre kültürü ortamında çoğaltılan ve yeterli sayıya ulaşan hücreyle karıştırılmış ve foto-çapraz bağlamanın ardından elde edilen hidrojellerin 21 günlük kültürü yapılmıştır. Hücre içeren hidrojel grupları %12 (v/v) MA oranına sahip geleneksel ve mikrodalga gruplarıdır. Hidrojel karakterizasyon çalışmalarında bir problem olmamasına rağmen %4 (v/v) MA oranına sahip grupların hücre kültüründe ilk 5 gün içinde bozunduğu görülmüştür. Bu nedenle hücre kültürü çalışmalarına %12 (v/v) MA içeren gruplarla devam edilmiştir. Sadece canlı/ölü analizinde %4 (v/v) oranına sahip mikrodalga grubundan görüntüler elde edilmiştir.

#### 4.3.1. ATDC5 Hücre Hattı

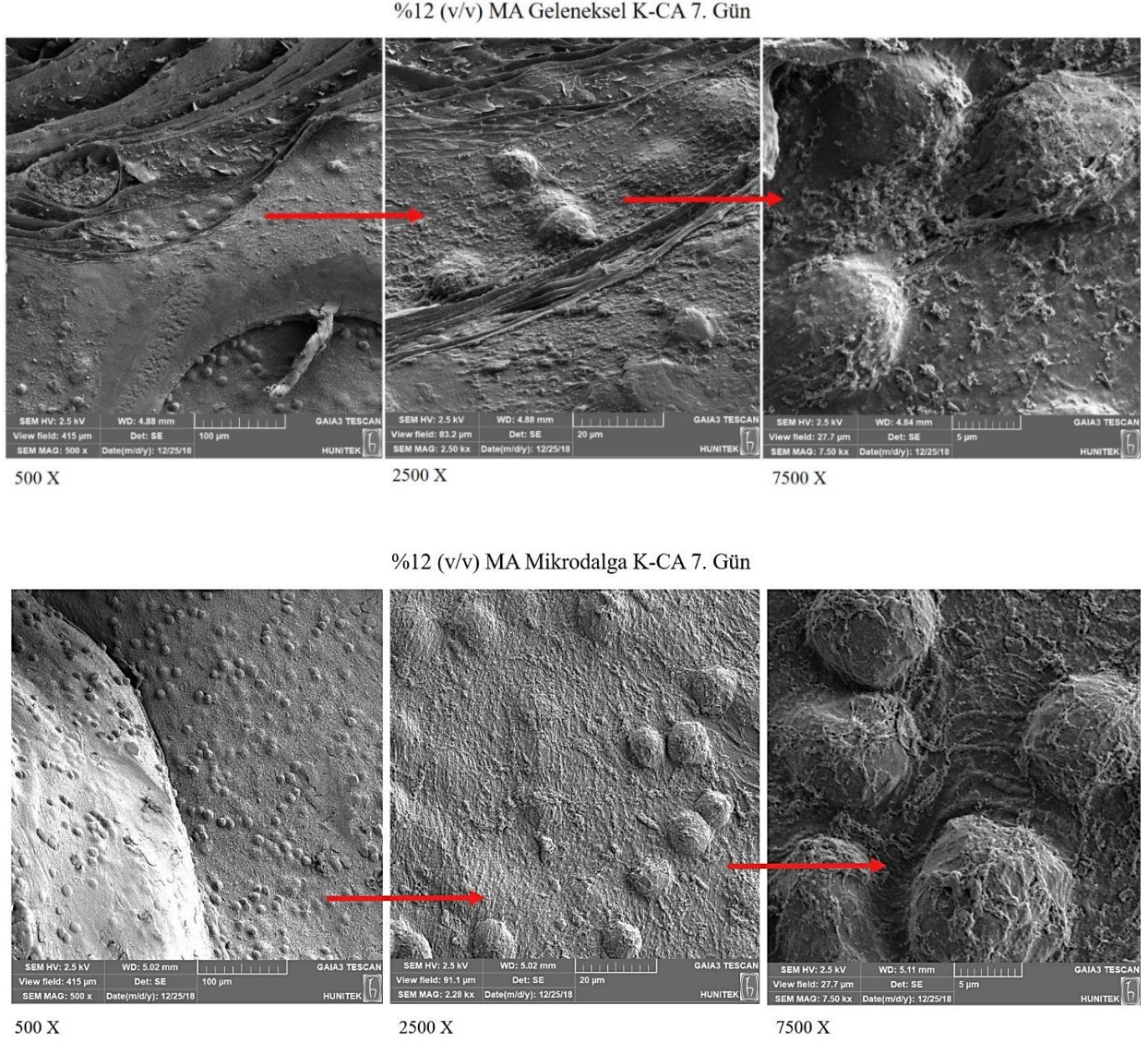
ATDC5 hücre hattı epitel benzeri morfolojide ve yüzeye bağımlı fare teratokarsinoma kıkırdak öncül hücreleridir. Uygun ortam ve uyaranlarla küresel morfoloji sergileyen kıkırdak hücrelerine farklılaşma kapasiteleri yüksektir. Grubumuz tarafından yapılan hücre karakterizasyonu çalışmaları sonucunda ikilenme süreleri 46 sa olarak bulunmuştur. Hücre kültürü kaplarında çoğaltılan ATDC5 hücrelerinin morfolojileri ve hücre iskelet organizasyonu immünofloresan boyama tekniği kullanılarak görüntülenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. ATDC5 hücre hattının immünofloresan boyama görüntüsü. Yeşil renk aktin filamentlerini, kırmızı renk hücre çekirdeklerini göstermektedir.

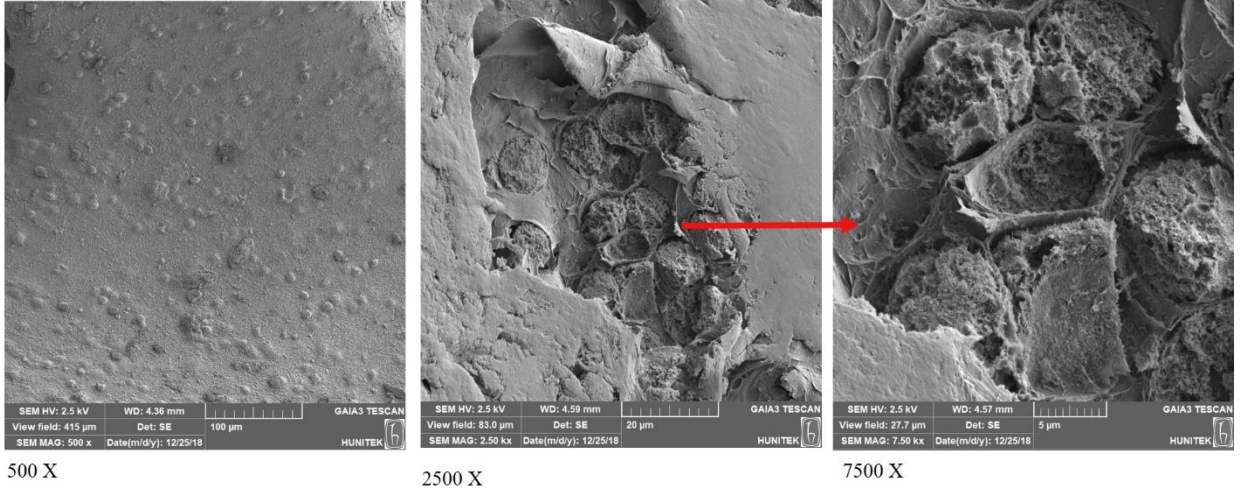
### 4.3.2. Morfolojik Analiz (SEM)

Tez çalışması kapsamında üretilen %12 (v/v) MA içeren geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle metakrilatlanmış hücreli  $\kappa$ -CA hidrojellerinin 7. ve 21. günlerdeki görüntüleri sırasıyla Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de verilmiştir.

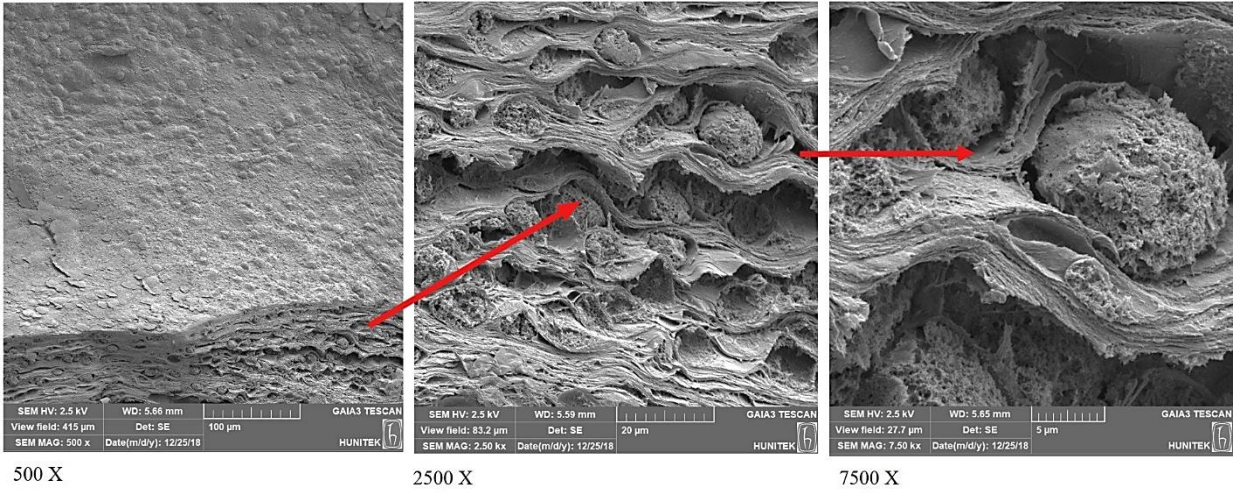


Şekil 4.16. Hacimce %12 MA ile metakrilatlanmış, hücre içeren ve farklı yöntemlerle üretilen  $\kappa$ -CA hidrojellerin 7. gün SEM görüntüleri.

%12 (v/v) MA Geleneksel K-CA 21. Gün



%12 (v/v) MA Mikrodalga K-CA 21. Gün

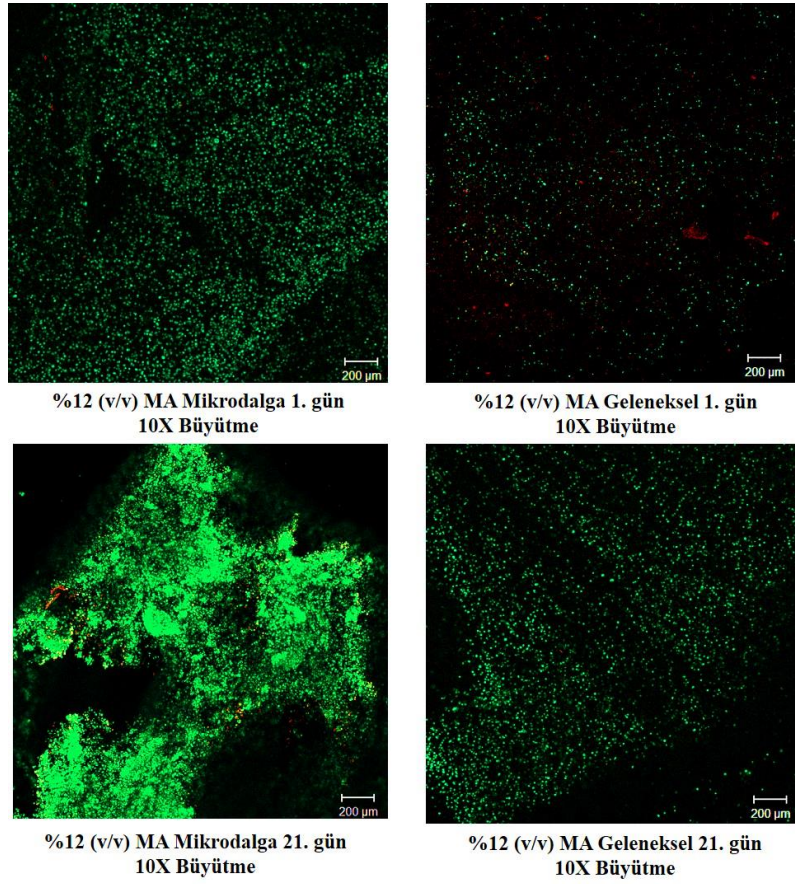


Şekil 4.17. Hacimce %12 MA ile metakrilatlanmış, hücre içeren ve farklı yöntemlerle üretilen  $\kappa$ -CA hidrojenlerin 21. gün SEM görüntüleri.

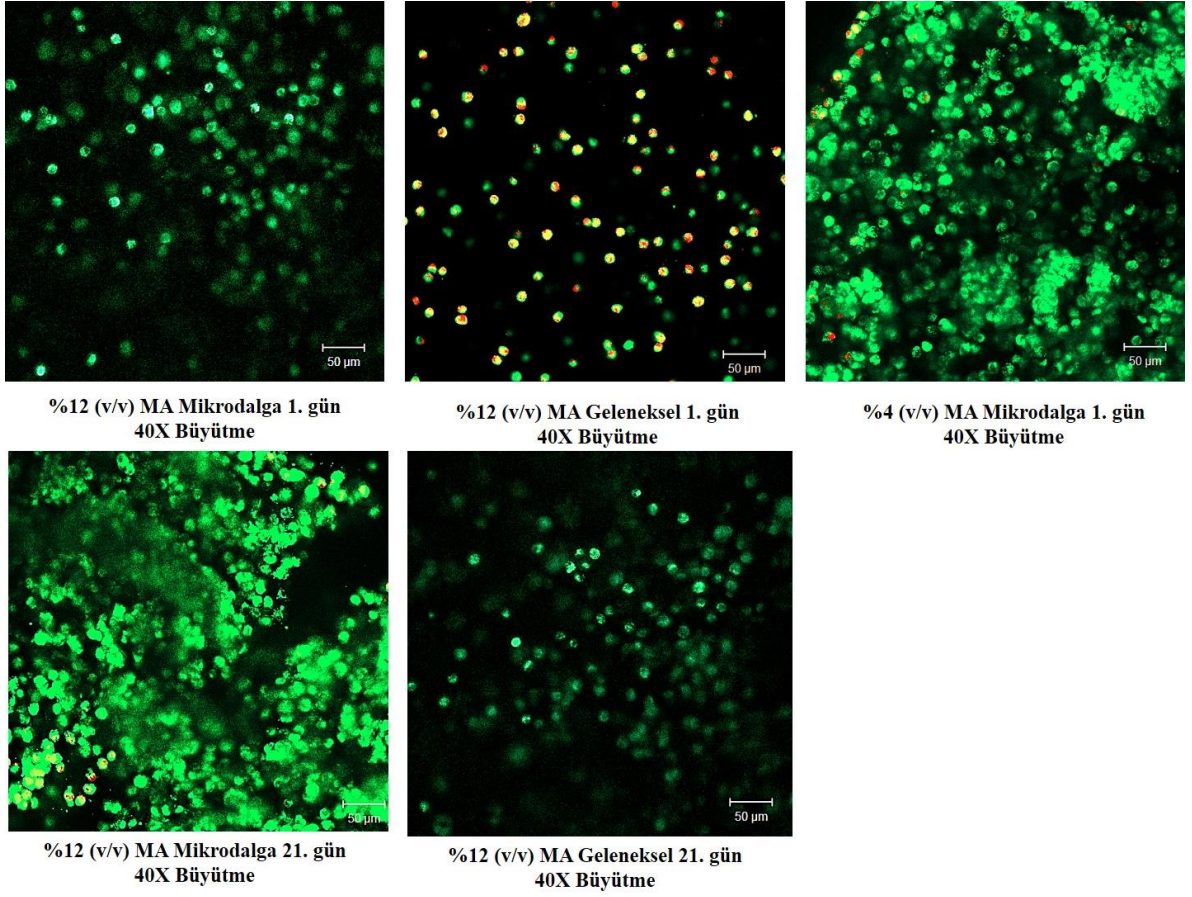
SEM görüntüleri incelendiğinde her iki grupta (geleneksel ve mikrodalga) da hücrelerin varlığı görülmektedir. Yirmi birinci günde hücreler yedinci güne göre daha fazladır. Bu da hücrelerin çoğaldığını göstermektedir. Aynı zamanda ATDC5 hücreleri yuvarlaklaşmış ve kendilerine lakün oluşturmuşlardır. Bu da kıkırdak doku benzeri bir yapının oluştuğunu göstermektedir. Hidrojel yapısı 3B olduğu için hücrelerin hidrojinin her bölgesine dağıldığı derinlerde de yer aldıkları görülmektedir.

### 4.3.3. Canlı-Ölü Analizi Sonuçları

Hücrelerin hidrojeller içerisindeki canlılık oranları canlı-ölü (live-dead) analiziyle belirlenmiştir. Canlı hücreler yeşil, ölü hücreler kırmızı renkte gözükmektedir. Yüzde canlılık “Image J” programıyla hesaplanmıştır. Mikrodalga ve geleneksel yöntemle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hidrojeller içerisindeki hücrelerin canlılık analizleri 1. ve 21. günlerde yapılmıştır. Mikrodalga yöntemiyle üretilen %4 (v/v) MA oranına sahip hidrojeller içerisindeki hücrelerin canlılık analizi ise 1. günde yapılmıştır. Elde edilen görüntüler ve veriler sırasıyla Şekil 4.18, Şekil 4.19, Çizelge 4.3, Şekil 4.20’de sunulmuştur.



Şekil 4.18. Geleneksel ve mikrodalga yöntemiyle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hücreli hidrojellerin 1. gün 10X büyütme görüntüleri (üstteki görüntüler), geleneksel ve mikrodalga yöntemiyle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hücreli hidrojellerin 21. gün 10X büyütme görüntüleri (alttaki görüntüler), yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ise ölü hücreleri göstermektedir.

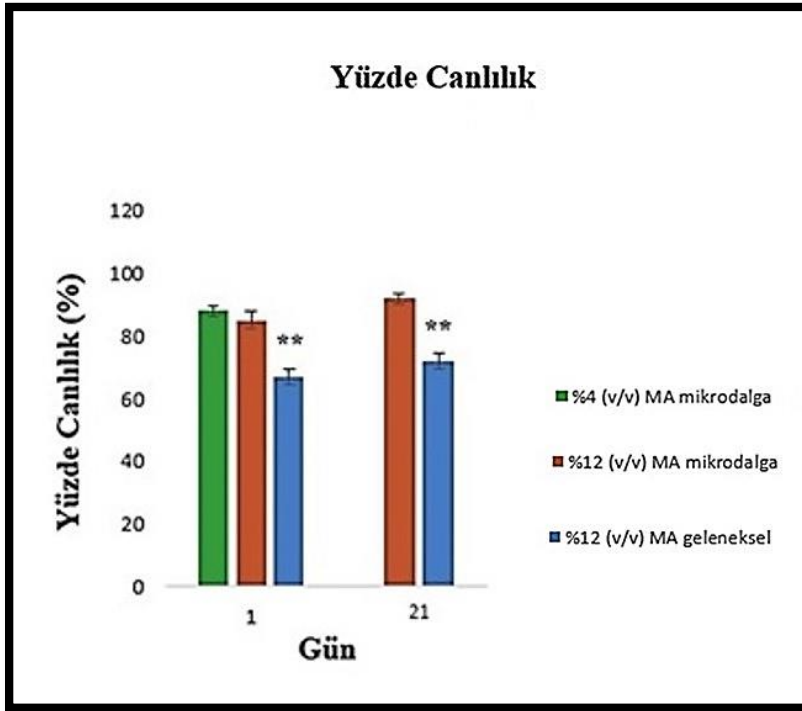


Şekil 4.19. Geleneksel ve mikrodalga yöntemiyle üretilen %4 ve %12 (v/v) MA oranlarına sahip hücreli hidrojellerin 1. gün 40X büyütme görüntüleri (üstteki görüntüler), geleneksel ve mikrodalga yöntemiyle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hücreli hidrojellerin 21. gün 40X büyütme görüntüleri (alttaki görüntüler), yeşil renk canlı hücreleri kırmızı renk ise ölü hücreleri göstermektedir.

Çizelge 4.3. Hücre içeren  $\kappa$ -CA hidrojelde hücre canlılık (%) oranları.

### Yüzde (%) Canlılık

	Mikrodalga %12 (v/v) MA	Geleneksel %12 (v/v) MA	Mikrodalga %4 (v/v) MA
1.gün	%90.0 $\pm$ 5.0	%70.7 $\pm$ 4.0	%93.3 $\pm$ 4.7
21.gün	%93.3 $\pm$ 3.3	%75.3 $\pm$ 4.5	-----



Şekil 4.20. Mikrodalga yöntemiyle üretilen %12 (v/v) ve %4 (v/v) MA içeren hücreli grupların, geleneksel yöntemle üretilen %12 (v/v) MA içeren hücreli grubun 1. gün yüzde canlılık oranlarının bar grafiği ile ifade edilmesi; mikrodalga ve geleneksel yöntemlerle üretilen %12 (v/v) MA içeren hücreli grupların, 21. gün yüzde canlılık oranlarının bar grafiği ile ifade edilmesi (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu %4 (v/v) MA mikrodalga 1. gün ve %12 (v/v) MA mikrodalga 1. gün grupları iken %12 (v/v) MA geleneksel grup \*\* p<0.01; kontrol grubu %12 (v/v) MA mikrodalga 21. gün grubu iken \*\* p<0.01).

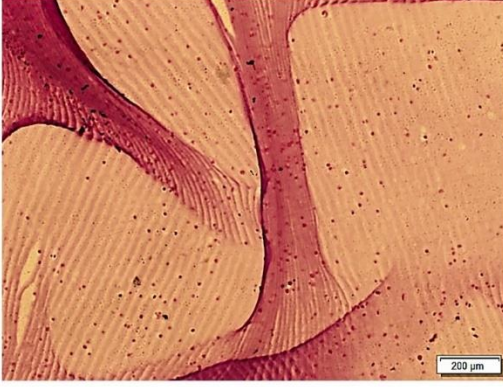
İki grupta (%12 (v/v) MA mikrodalga ve geleneksel) da yüzde canlılık oranları ilk günden sonra artmıştır. Image J aracılığıyla hesaplanan % canlılık sonuçlarına göre mikrodalga gruplarında geleneksellere göre yüzde hücre canlılığı daha fazla olup, istatistiksel olarak da anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0.01$ ). Bunun nedeni  $\kappa$ -CA sentez yönteminde, mikrodalga üretiminde yapı içersine katılan (reaksiyona giren) metakrilik anhidritin geleneksel yöntemle göre daha fazla olması olabilir. Mikrodalga enerjisi sayesinde reaksiyon verimi artırılmıştır (Çizelge 4.1). İki üretimde de yıkama basamağı aynı olmasına rağmen geleneksel yöntemde reaksiyona girmeyen MA'nın ortamda kalmış olabileceği ve bu durumun hücre canlılığını etkilemiş olabileceği sonucuna varılmıştır. İki mikrodalga grubu arasında hücre canlılığı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Jel-MA ile yapılan benzer çalışma (Irmak, Demirtaş ve Gümüşderelioğlu, 2019) incelendiğinde ise canlı-ölü analizinde mikrodalga grubundaki canlılık oranlarının geleneksel gruba göre daha fazla olduğu rapor edilmiştir.

#### **4.3.4. Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyama**

Hematoksilen-Eozin (H&E) kombinasyonu rutin histopatolojik analizlerde en sık kullanılan boyalardan biridir. Hematoksilen koyu mavi-mor renklidir ve nükleik asitleri boyar. Eozin pembe renktedir. Tipik bir dokuda çekirdekler mavi-siyah renkte, sitoplazma ve ECM pembenin farklı tonlarında boyanmaktadır (Nacar ve Nacar, 2017).

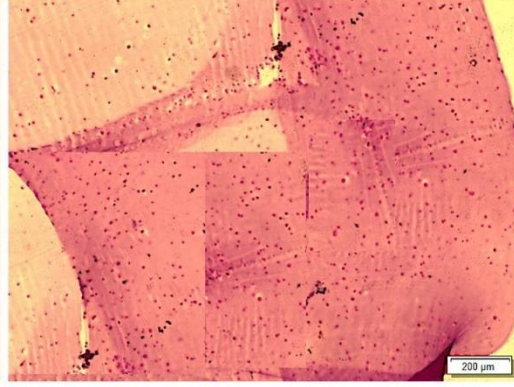
Bu bilgiler doğrultusunda hücre içeren %12 (v/v) MA oranına sahip mikrodalga ve geleneksel yöntemle üretilmiş hidrojelilerin 7. ve 21. günlerindeki görüntüleri sırasıyla Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de sunulmuştur.

Geleneksel %12 (v/v) MA 7. gün



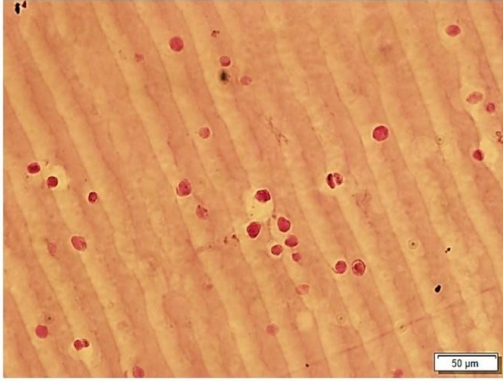
10 X

Mikrodalga %12 (v/v) MA 7. gün



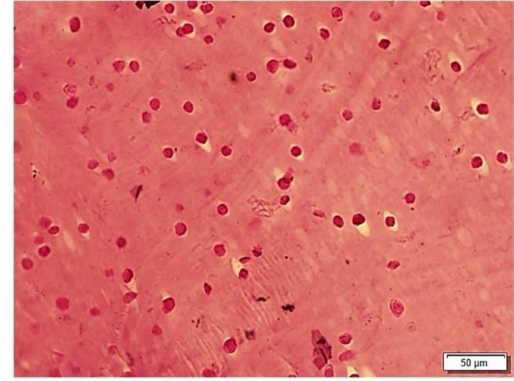
10 X

Geleneksel %12 (v/v) MA 7. gün



40 X

Mikrodalga %12 (v/v) MA 7. gün

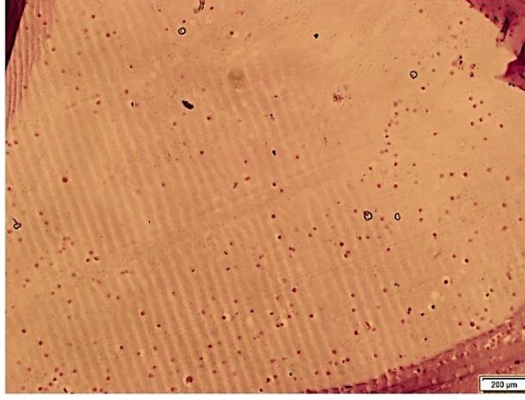


40 X

Şekil 4.21. Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle üretilen  $\kappa$ -CA hidrojellerinin hücre kültürünün 7. günündeki H&E boyama görüntüleri. Soldaki görüntüler geleneksel, sağdaki görüntüler mikrodalga grubudur. Üstteki görüntüler 10 X, alttaki görüntüler 40 X büyütmedir.

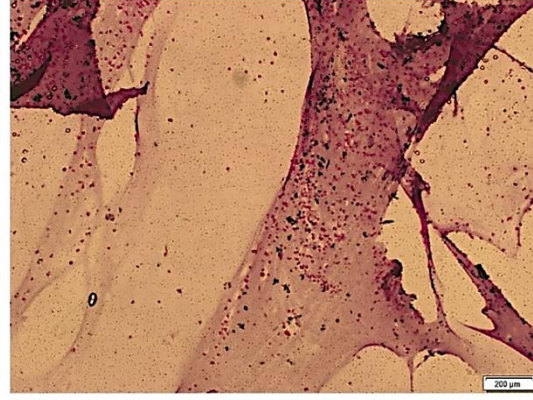


Geleneksel %12 (v/v) MA 21. gün



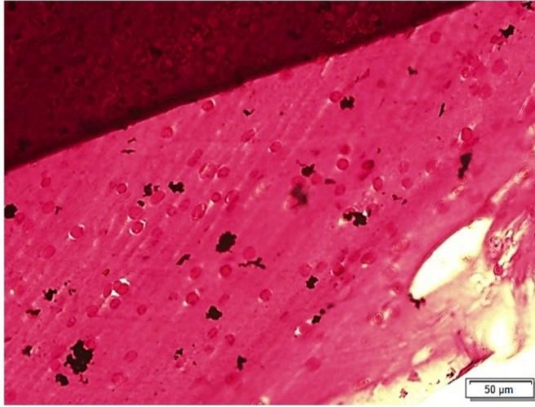
10 X

Mikrodalga %12 (v/v) MA 21. gün



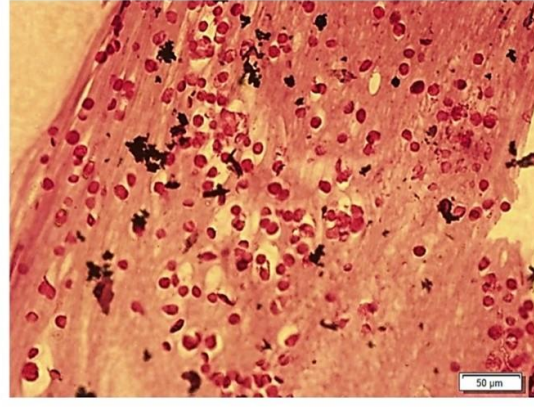
10 X

Geleneksel %12 (v/v) MA 21. gün



40 X

Mikrodalga %12 (v/v) MA 21. gün



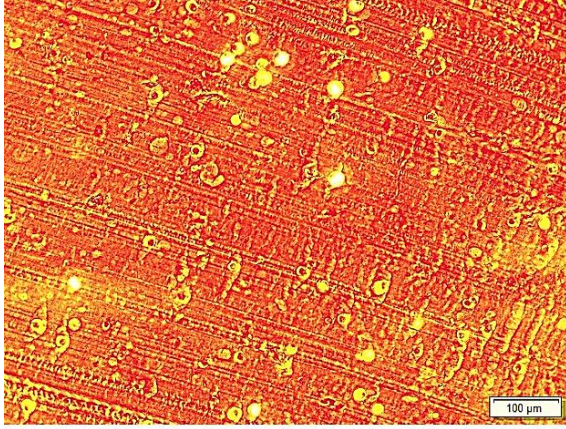
40 X

Şekil 4.22. Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle üretilen  $\kappa$ -CA hidrojellerinin hücre kültürünün 21. günündeki H&E boyama görüntüleri. Soldaki görüntüler geleneksel, sağdaki görüntüler mikrodalga grubudur. Üstteki görüntüler 10 X, alttaki görüntüler 40 X büyütmedir.

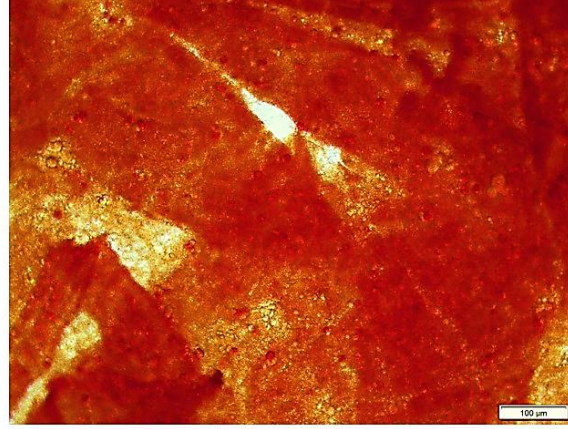
Örneklerden elde edilen görüntüler incelendiğinde her iki grupta da hücre ve ECM varlığı net bir şekilde görülmüştür. Hücre çekirdekleri koyu mor renge boyanmıştır. Hücrelerin içi de pembe renkte gözükmektedir. Bu da hücrelerdeki protein varlığını göstermektedir. Ayrıca hücreler yuvarlaklaşarak kıkırdak hücrelerine özgü morfoloji sergilemişlerdir. Mikrodalga grubunda ise geleneksel gruba göre daha hücre varlığı görülmektedir.

#### 4.3.5. Safranin O / Fast Green Boyama

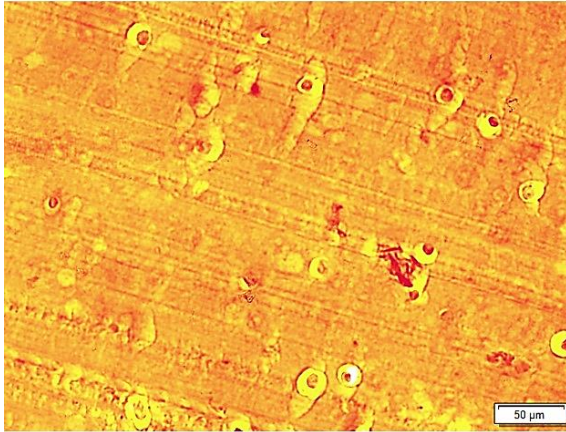
Safranin O / Fast Green boya kıkırdak dokuya özgül bir boyadır. Safranin O / Fast Green boya özellikle GAG birikimi olan yerlerin yoğun kırmızı gözükmelerini sağlayarak, kıkırdak doku farklılaşmasını kanıtlar. Kültürün 7. ve 21. günlerinde alınan hidrojel örnekleri Safranin O / Fast Green ile boyanarak ışık mikroskopunda görüntülenmiştir. Görüntüler Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'te sunulmuştur.



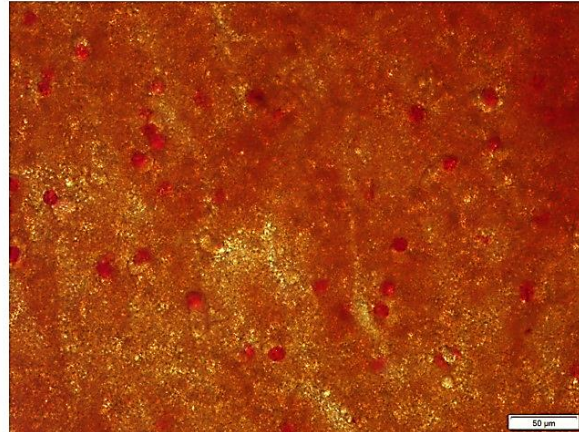
%12 (v/v) MA Geleneksel 7. gün  
20X Büyütme



%12 (v/v) MA Mikrodalga 7. gün  
20X Büyütme

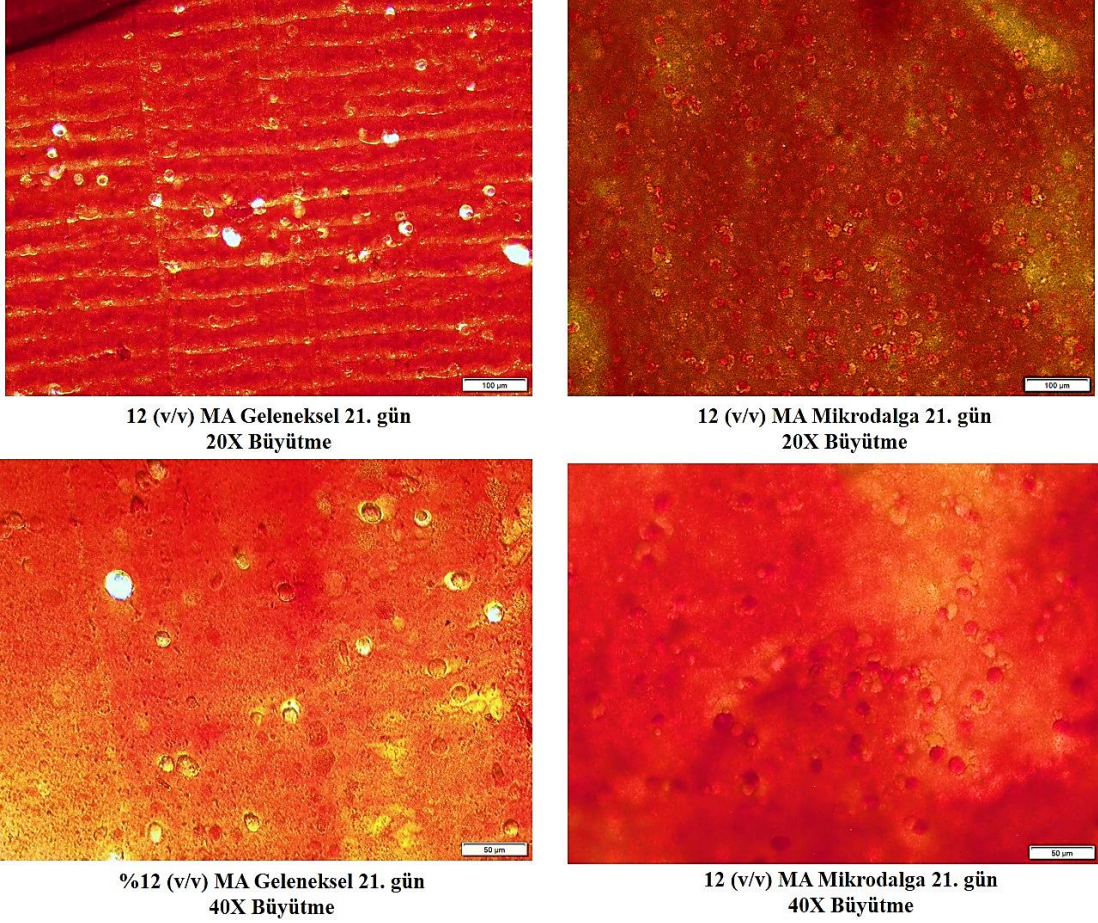


%12 (v/v) MA Geleneksel 7. gün  
40X Büyütme



%12 (v/v) MA Mikrodalga 7. gün  
40X Büyütme

Şekil 4.23. Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hidrojellerinin hücre kültürünün 7. günündeki Safranin O / Fast Green boyama görüntüleri. Soldaki görüntüler geleneksel, sağdaki görüntüler mikrodalga grubudur. Üstteki görüntüler 20 X, alttaki görüntüler 40 X büyütmedir.

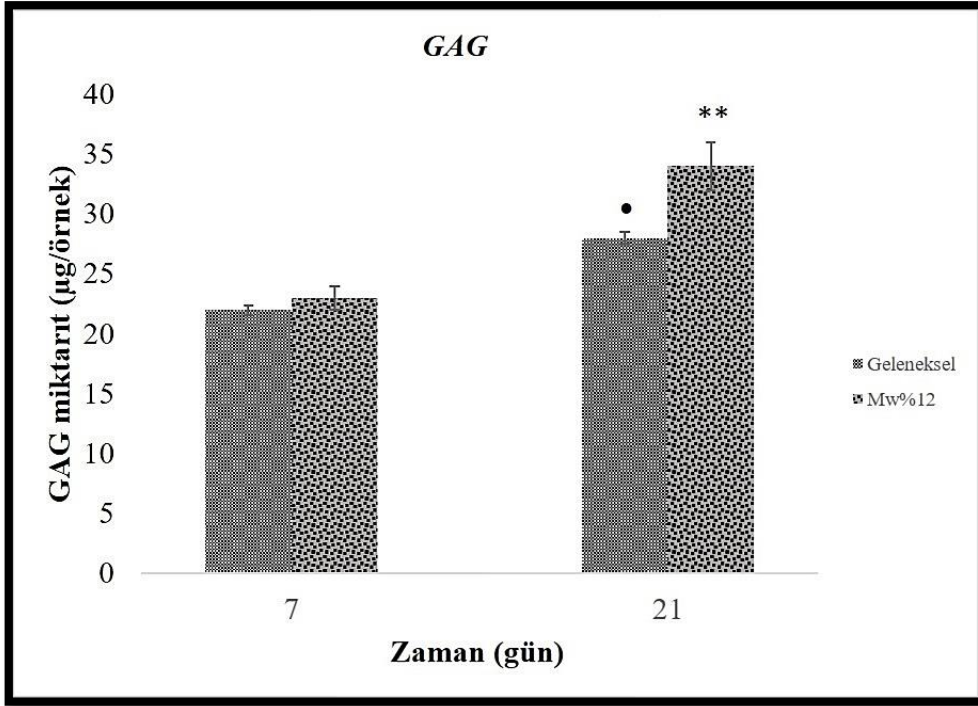


Şekil 4.24. Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hidrojellerinin hücre kültürünün 21. günündeki Safranin O / Fast Green boyama görüntüleri. Soldaki görüntüler geleneksel, sağdaki görüntüler mikrodalga grubudur. Üstteki görüntüler 20 X, alttaki görüntüler 40 X büyütmedir.

Şekil 4.23 ve Şekil 4.24 incelendiğinde, özellikle küresel şekilde gözükmekte olan hücrelerin çekirdeklerine yakın bölgelerdeki kırmızı tonlarda boyanmalar dikkat çekmektedir. Boyamada malzeme de boyanmıştır. Fakat, küresel yapıdaki hücreler ve boyanan sitoplazmaları net olarak gözükmemektedir. Bu da hücrelerin kıkırdak dokuya farklılaştığını ve sitoplazmada GAG varlığını göstermektedir. Hem geleneksel hem de mikrodalga gruplarında kıkırdak farklılaşması gözükmemektedir. Ancak, özellikle mikrodalga grubunun 21. günlerdeki görüntülerinde hem kırmızı tonunun hem de hücre yoğunluğunun arttığı net bir şekilde görülmektedir.

#### 4.3.6. Glikozaminoglikan (GAG) İçeriğinin Belirlenmesi

Farklılaşarak küresel morfolojiye sahip olan kondrositler glikozaminoglikan (GAG), kollajen II ve agregan gibi kıkırdak yapısına özgü ECM molekülleri sentezlemektedirler. Üretilen hidrojel yapılarının içersindeki ATDC5 hücrelerinin kıkırdak hücrelerine farklılaşmasını göstermek ve grupları kendi aralarında kıyaslamak için GAG içeriği belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda oluşturulan grafik Şekil 4.25'te sunulmuştur.

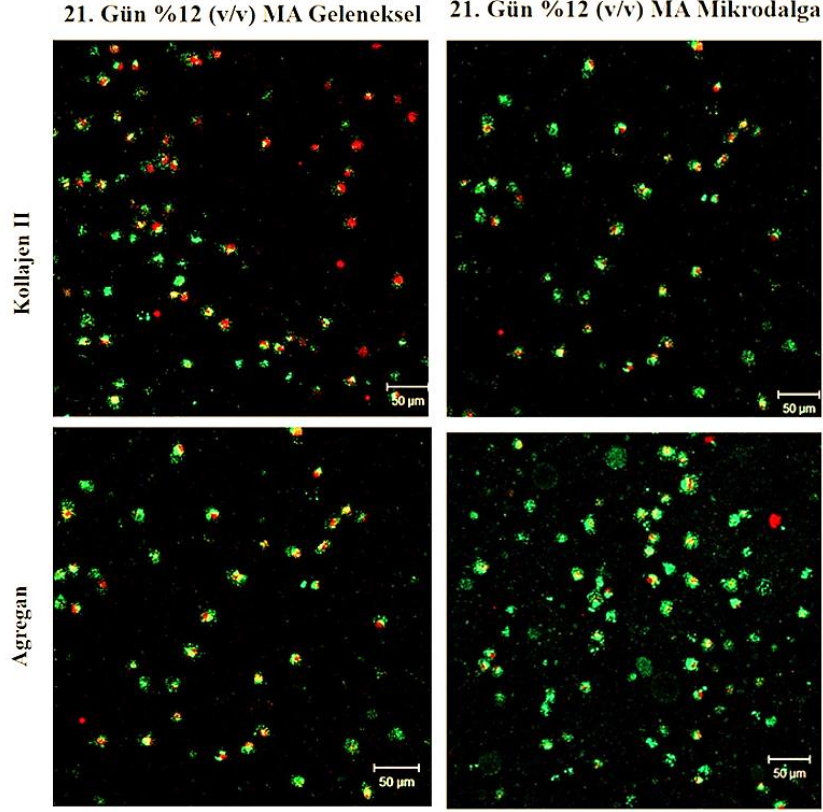


Şekil 4.25. Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle üretilen %12 (v/v) MA içeren hücreli hidrojel gruplarının 7. ve 21. günlerdeki GAG içeriğini belirten bar grafiği; •, \*\*\* istatistiksel olarak anlamlı farklılık (n=3, kontrol grubu %12 (v/v) MA mikrodalga 7. gün iken %12 (v/v) MA mikrodalga 21. gün \*\*\* p<0.01; kontrol grubu %12 (v/v) MA geleneksel 7. gün iken %12 (v/v) MA geleneksel 21. gün • p<0.05).

Geleneksel ve mikrodalga grupları arasında GAG içeriğinin yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark (p>0.05) olmamakla birlikte, hücrelerin her iki grupta da kültürün son gününe geldiğinde GAG sentezlerinin arttığı sonucu çıkarılmaktadır. Mikrodalga yöntemindeki artış geleneksel yöntemle göre daha fazladır.

#### 4.3.7. İmmünohistokimyasal Analizler

Agregan ve kollajen II de GAG gibi kıkırdak hücrelerinin salgıladığı, hücre içinde ve ECM'de fazla miktarda bulunan moleküllerdir. Kıkırdak farklılaşmasını göstermek için kültürün 21. gününde alınan hidrojel örneklerine agregan ve kollajen II boyamaları uygulanmıştır. Elde edilen görüntüler Şekil 4.26'da sunulmuştur.



Şekil 4.26. Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle üretilen %12 (v/v) MA oranına sahip hidrojellerin hücre kültürünün 21. günündeki kollajen II ve agregan boyama görüntüleri, 10 X büyütme. Kırmızı renk hücre çekirdeklerini, yeşil renk agregan ve kollajen II moleküllerini göstermektedir.

Görüntüler incelendiğinde iki grubun da kıkırdak dokuya farklılaştığı kollajen II ve agregan salgıladığı gözükmektedir. Agregan ve kollajen II birikimi fazla olan yerlerde yeşil renk de fazladır. Küresel yapıda olan hücrelerin iç kısımları ve çevreleri boyanmıştır. Özellikle mikrodalga gruplarında boyanma geleneksel gruplara göre daha fazladır.

## 5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar temel olarak iki kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısım, *kappa* carrageenan ( $\kappa$ -CA) polimerinin metakrilik anhidrit (MA) ile fonksiyonlandırılması ve ardından gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarını içermektedir. İkinci kısım ise ATDC5 kıkırdak öncül hücreleriyle karıştırılan polimer çözeltisinin 3 boyutlu (3B) baskılanarak uygun özelliklerde biyoçözelti olarak sunulması ve foto-çapraz bağlama yöntemiyle kıkırdak doku farklılaşmasına yönelik hidrojel elde edilmesidir. Elde edilen hidrojeller, 21 günlük farklılaşma ortamında kültüre edilip, gerekli analizler yapılarak elde edilen sonuçlar sunulmuştur. Gerçekleştirilen çalışma kapsamında elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- ✓  $\kappa$ -CA polimeri MA ile geleneksel yöntem alternatif olarak mikrodalga yöntemiyle fonksiyonlandırılarak sentezlenmiştir. Geleneksel yöntemde; 50°C'de 6 sa süren tepkime, mikrodalga yönteminde 1000 W mikrodalga enerjisi ile 5 dk'da gerçekleştirilmiştir.
- ✓ Metakrilatlama hacmen %4 ve %12'lik MA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Geleneksel yöntemde %4 (v/v) MA ile metakrilatlanan  $\kappa$ -CA polimerinin metakrilatlanma derecesi (M.D)  $25 \pm 5$  iken, mikrodalga yöntemi ile sentezlenen  $\kappa$ -CA'nın M.D'si  $85 \pm 9$  olarak hesaplanmıştır. Geleneksel yöntemde %12 (v/v) MA ile sentezlenen  $\kappa$ -CA polimerinin M.D'si  $35 \pm 3$  iken, mikrodalga yöntemiyle metakrilatlanan  $\kappa$ -CA'nın M.D'si  $80 \pm 8$  olarak hesaplanmıştır. Metakrilatlanma dereceleri <sup>1</sup>H-NMR analizi sonucuna göre belirlenmiştir.
- ✓ MA oranını azaltılarak (hacimce %4) yüksek M.D'ye ( $80 \pm 8$ ) sahip metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimeri elde edilmiştir.
- ✓ Mikrodalga yöntemiyle metakrilatlanmış %12 (v/v) MA oranına sahip  $\kappa$ -CA, Fab@home mikroekstrüzyon biyoyazıcı ile 3B baskılanabilmiş ve viskozitesi, 3B biyobaskılamaya uygun bir biyoçözelti olarak sunulmuştur.
- ✓ Metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA polimerinden hidrojel eldesi için foto-çapraz bağlayıcı ajan olan IRGACURE-2959<sup>®</sup> ile UV ışık kaynağı kullanılarak foto-çapraz bağlama prosesi uygulanmıştır. Buna göre %8 (w/v) makromer konsantrasyonunda hazırlanan

metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA çözeltilerinin, %1 IRGACURE-2959<sup>®</sup> ile karıştırılarak 5 cm mesafe ve 40 s UV maruziyeti ile hidrojel yapıları oluşturulması sağlanmıştır.

- ✓ Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle ve hacmen %4 ile %12 MA oranlarında metakrilatlanan hidrojellere PBS (pH=7.4) içinde uygulanan 30 günlük biyobozunurluk testinde geleneksel gruptaki % kütle kaybının mikrodalga gruplarına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bozunma: %12 (v/v) MA mikrodalga grubu ( $19 \pm 4$ ) < %4 (v/v) MA mikrodalga grubu ( $37 \pm 5$ ) < %12 (v/v) MA geleneksel grup ( $40 \pm 6$ ) < %4 (v/v) MA geleneksel grup ( $64 \pm 2$ ) şeklinde olmuştur.
- ✓ Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle ve hacmen %4 ile %12 MA oranlarında metakrilatlanan hidrojellerin PBS (pH=7.4) içerisindeki 30 günlük şişme deneyi sonucu denge şişme değerleri gravimetrik yöntemle belirlenmiştir. Geleneksel grupların mikrodalga gruplarına göre yapılarına daha fazla su aldıkları görülmüştür. Ayrıca tüm gruplar denge şişmelerine 20. günde ulaşmışlardır. Şişme değerleri: %12 (v/v) MA geleneksel ( $2790 \pm 7$ ) > %4 (v/v) MA geleneksel ( $2021 \pm 5$ ) > %12 (v/v) MA mikrodalga ( $1345 \pm 4$ ) > %4 (v/v) MA mikrodalga ( $864 \pm 4$ ) olarak belirlenmiştir.
- ✓ Gerçekleştirilen reolojik analizlerin sonucunda; G' değerleri: %4 (v/v) MA mikrodalga (4200 Pa) > %12 (v/v) MA mikrodalga (3100 Pa) > %12 (v/v) MA geleneksel (2150 Pa) > %4 (v/v) MA geleneksel (250 Pa) şeklinde bulunmuştur. G'' değerleri ise %4 (v/v) MA mikrodalga (750 Pa) > %12 (v/v) MA mikrodalga (375 Pa) > %4 (v/v) MA geleneksel (200 Pa) > %12 (v/v) MA geleneksel (190 Pa) şeklindedir.
- ✓ Hücre kültürü çalışmaları kapsamında ATDC5 hücreleri kültür ortamında çoğaltılmıştır. Tek tabaka olarak çoğaltılan hücrelerin fibroblastik morfolojide olduğu görüntülenmiştir.
- ✓ Hidrojel karakterizasyon çalışmalarında sorun yaşanmamasına rağmen %4 (v/v) MA oranına sahip grupların kültür ortamında ilk 5 gün içinde bozunduğu görülmüştür. Bu nedenle hücre kültürü çalışmalarına %12 (v/v) MA içeren gruplarla devam edilmiştir.
- ✓ Geleneksel ve mikrodalga yöntemleriyle metakrilatlanan %12 (v/v) MA oranına sahip  $\kappa$ -CA polimerler çözeltileri  $2 \times 10^7$  hücre/mL olacak şekilde ATDC5 hücreleri

ile karıştırılıp 3B baskılanarak, hücre içeren hidrojeller başarılı bir şekilde elde edilmiştir.

- ✓ Elde edilen hücreli hidrojellerin kıkırdak farklılaşma ortamında 21 günlük kültürü gerçekleştirilmiştir. Kültürün 7. ve 21. günlerinde hidrojellerin yüzeyleri ve kesitleri SEM ile görüntülenmiştir. Hücrelerin farklılaşarak kondrosit benzeri küresel morfoloji sergiledikleri görülmüştür. Ayrıca, hücreler hidrojelin 3B yapısında homojen dağılım olarak çoğalmışlardır. Görüntüler incelendiğinde %12 (v/v) MA mikrodalga grubunda %12 (v/v) MA geleneksel gruba göre hücre yoğunluğunun daha fazla olduğu görülmektedir.
- ✓ Hücre içeren hidrojellere 1. ve 21. günlerde yapılan canlı-ölü boyama sonucunda hücrelerin yüzde canlılıkları “ImageJ” programıyla hesaplanmıştır. Buna göre 1. gün % hücre canlılıkları: %12 (v/v) MA geleneksel grup  $70.7 \pm 4.0$  , %12 (v/v) MA mikrodalga grubu  $90.0 \pm 5.0$ , %4 (v/v) MA mikrodalga grubu  $93.3 \pm 4.7$ , olarak; 21. gün % hücre canlılıkları: %12 (v/v) MA geleneksel grup  $75.3 \pm 4.5$ , %12 (v/v) MA mikrodalga grubu  $93.3 \pm 3.3$  olarak hesaplanmıştır.
- ✓ Hücre kültürü çalışmalarının 7. ve 21. günlerinde gerçekleştirilen hematoksilin & eozin (H&E) boyamasında %12 (v/v) MA geleneksel ve mikrodalga gruplarının her ikisinde de hücre varlığı net bir şekilde görüntülenmiştir. Hücreler koyu mor, sitoplazma ve ECM proteinleri pembe tonlarında boyanmıştır. Ayrıca, hücre yoğunluğunun mikrodalga grubunda daha fazla olduğu da görülmüştür.
- ✓ Hücre kültürü çalışmalarının 7. ve 21 .günlerinde gerçekleştirilen Safranin O / Fast Green boyamalarında %12 (v/v) MA geleneksel ve mikrodalga gruplarının her ikisinde de hücrelerdeki GAG birikimi sonucu koyu kırmızı boyanma net olarak görüntülenmiştir. Bu kıkırdak doku farklılaşmasının olduğunu gösteren önemli bir belirteçtir.
- ✓ Hücre kültürü çalışmalarının 21. gününde gerçekleştirilen immünohistokimyasal analiz kıkırdak doku farklılaşmasına özgü olan agregan ve kollajen II varlığını kanıtlamak için yapılmıştır. Her iki grupta (%12 (v/v) MA mikrodalga ve geleneksel) da agregan ve kollajen II varlığı görülmüştür.

Sunulan tez çalışması kapsamında elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde;  $\kappa$ -CA polimerinin MA ile fonksiyonlandırılmasında, reaksiyonun literatürden farklı olarak



mikrodalga yöntemi ile gerçekleştirilmesinin metakrilatlanma derecesini arttırdığı ve reaksiyon süresini kısalttığı görülmüştür. Ayrıca düşük MA (hacimce %4) oranı ile yüksek M.D ( $85 \pm 9$ ) elde edilmiştir. Bununla birlikte mikrodalga enerjisi ile gerçekleştirilen metakrilatlama prosesinde  $\kappa$ -CA polimerinin geleneksel yöntemle metakrilatlanan  $\kappa$ -CA'na göre viskoelastik özelliklerinin ( $G'$ ,  $G''$ ) ve viskozite değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında da mikrodalga gruplarında hücre yoğunluğunun ve canlılığının geleneksel gruplara göre daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, iki grupta da kıkırdak dokuya farklılaşma gözlenmiştir. Elde edilen bulgular ışığında, viskoelastik özellikleri mikrodalga prosesi ile metakrilatlanarak modifiye edilen  $\kappa$ -CA sahip olduğu viskoelastik özellikler ile, 3B biyobaskılama çalışmaları için literatüre yeni bir biyoçözelti olarak kazandırılmıştır.

Gelecekteki çalışmalar için üretimden üretime geçişebilen problemlerin araştırılması, bu problemlerin çözüme kavuşturulması ve metakrilatlanmış  $\kappa$ -CA'nın kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında kullanımının artırılması önerilmektedir.  $\kappa$ -CA'nın özellikle biyoyazıcılarla kullanımının daha fazla araştırılması, farklı hücre kaynaklarıyla ve/veya çeşitli biyosinyal molekülleriyle birlikte baskılanarak kıkırdak doku farklılaşmasını desteklemeye yönelik çalışmaların yapılarak sunulan bu çalışmanın ilerletilebileceği görüşlerinize sunulmuştur.

## 6. KAYNAKLAR

- Akkiraju, H., and Nohe, A., *Journal of Developmental Biology*, 3 (2015) 177-192.
- Almeida H.V., Sathy, B.N., Dudurych, I., Buckley, C.T., O'Brien, F.J., and Kelly, D.J., *TISSUE ENGINEERING: Part A*, 23 (2017) 1-2.
- Armiento, A.R., Stoddart, M.J., Alini, M., and Eglin, D., *Acta Biomaterialia* 65 (2018) 1-20.
- Bayrak, G.K., Demirtaş, T.T., Gümüşderelioğlu, M., *Carbohydrate Polymers*, 157 (2017) 803-813.
- Beşkardeş, I.G., Demirtaş, T.T., Durukan, M.D., and Gümüşderelioğlu, M., *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(11) (2012) 1233-1246.
- Bogdal, D., Penczek, P., Pielichowski, J., and Prociak, A., *Adv Polym Sci* 163 (2003) 193-263.
- Boushell, M.K., Hung, C.T., Hunziker, E.B., Strauss, E.J., and Lu, H.H., *Connective Tissue Research*, 58(5) (2016) 393-406.
- Campo, V.L., Kawano, D.F., Silva, D.B. da, and Carvalho, I., *Carbohydrate Polymers*, 77(2) (2009) 167-180.
- Cheung, H.Y., Lau, K.T., Lu, T.P., and Hui, D., *Composites: Part B*, 38 (2007) 291-300.
- Chung, C., ve Burdick, J.A., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (2008) 243-262.
- Demirtaş, T.T., *Kemik Hasarları İçin Vaskülarize Doku Mühendisliği: 3B Biyoyazıcı İle Hidrojel/Hücre/Biyosinyal Sistemlerin Hazırlanması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2016.
- Demirtaş, T.T., Irmak, G., and Gümüşderelioğlu, M., *Biofabrication*, 9(3), (2017).
- Distantina, S., Rochmadi, R., Fahrurrozi, M., and Wiratni, W., *Modern Applied Science*, 7(8) (2013).

- Doral, M.N., Dönmez, G., Atay, Ö.A., Bozkurt, M., Leblebicioğlu, G., Üzümcügil, A., ve Aydoğ, T., TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi, 6 (2007) 1-2.
- Drury, J.L., and Mooney, D.J., *Biomaterials*, 24 (2003) 4337-4351.
- Englert, C., Schwenke, A.M., Hoepfener, S., Weber, C., and Schubert, U.S., *Advances in Polymer Science*, (2016) 1-32.
- Faust, H.J., Guo, Q., and Elisseeff, J.H., *Principles of Regenerative Medicine*, Third Edition, Elsevier, Chapter 53, 2019.
- Feng, W., Feng, S., Tang, K., He, X., Jing, A., and Liang, G., *Journal of Alloys and Compounds* 693 (2017) 483-489.
- Gasparini, L., Mano, J.F., and Reis, R.L., *Journal of The Royal Society Interface* 11 (2014).
- Guillot, B., and Guillemot, F., *Trends in Biotechnology*, 29 (2011) 4.
- Hoshi, K., Fujihara, Y., Yamawaki, T., Harai, M., Asawa, Y., and Hikita, A., *Histochemistry and Cell Biology*, 149 (2018) 375-381.
- Irmak, G., Demirtaş, T.T., and Gümüşderelioğlu, M., *ACS Biomater. Sci. Eng.* 5 (2019) 831–845.
- Irvine, S.A., and Venkatraman, S.S., *Molecules*, 21(9) (2016) 1188.
- Janaswamy, S., and Chandrasekaran, R., *Carbohydrate Research*, 335 (2001) 181-194.
- Kikuchi, M., and Kanama, D., *Quarterly Review*, 24 (2007) 51-67.
- Li, L., Ni, R., Shao, Y., and Mao, S., *Carbohydrate Polymers*, 103 (2014) 1-11.
- Luo, W., Liu, H., Wang, C., Qin, Y., Liu, Q., and Wang, J., *Adv. Eng. Mater.*, 900019 (2019) 1-23.
- Makris, E.A., Gomoll, A.H., Molizos, K.N., Hu, J.C., and Athanasious, K.A., *Nature Reviews Rheumatology*, 11(1) (2015) 21-34.

Malz, F., and Jancke, H., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 38 (2005) 813-823.

Mardones, R., Jofre, C.M., and Minguell, J.J., *International Journal of Stem Cells*, 8 (2015) 1.

Mihaila, S.M., Gaharwar, A.K., Reis, R.L., Marques, A.P., Gomes, M.E., and Khademhosseini, A., *Advanced Healthcare Materials*, 2 (2013) 895-907.

Mobasher, A., Gauthaman, K., Musumeci, G., and Batt, M.E., *Maturitas*, 78(3) (2014) 98-188.

Mori, A.D., Fernandez, M.P., Blunn, G., Tozzi, G., and Roldo, M., *Polymers*, 10 (2018) 285.

Murphy, S.V., and Atala, A., *Nature Biotechnology*, 32(8) (2014) 773-785.

Nacar, E., ve Nacar, A., *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 8(29) (2017) 46-49.

Necas, J., and Bartosikova, L., *Veterinari Medicina*, 58(4) (2013) 187-205.

Ottenbrite, R.M., *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*, Park, K., and Okano, T. (Eds.), Springer, London, 2010.

Popa, E.G., Caridade, S.G., Mano, J.F., and Reis, R.L., *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(5) (2013) 550-563.

Risbud, M.V., and Sittinger, M., *Trends Biotechnology*, 20(8) (2002) 351-356.

Sato, T., Chen, G., Ushida, T., Ishii, T., Ochiai, N., Tateishi, T., and Tanaka, J., *Materials Science and Engineering C* 24 (2004) 365-372.

Sop, E.S., *Doku Genişletme Amaçlı Hidrojel Sentezi, Karakterizasyonu ve Şişme Kinetiği, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2013.*

Sosnik, A., Gotelli, G., and Abraham, G.A., *Progress in Polymer Science*, 36(8) (2011) 1050-1078.

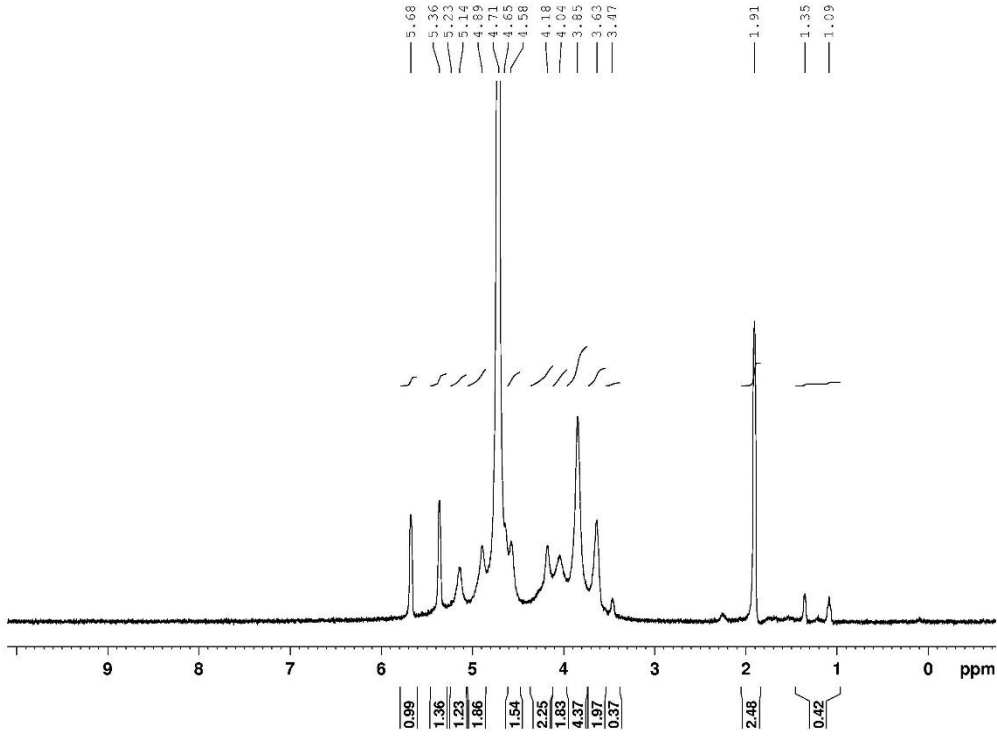
Temenoff, J.S., and Mikos, A.G., *Biomaterials*, 21 (2000) 431-440.

Tığlı, R.S., Kıkırdak Doku Rejenerasyonunda Kitosan Doku İskelesi Destekli Biyoreaktör Performansının İncelenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2009**.

Yuan, C., Sang, L., Wang, Y., and Cui B., Food Chemistry, 266 (**2018**) 545-550.

Zia, K.M., Tabasum, S., Nasif, M., Sultan, N., Aslam, N., Noreen, A., and Zuber, M., International Journal of Biological Macromolecules, 96 (**2017**) 282-301.

## 7. EKLER



**Ek 1.** Mikrodalga yöntemi ile metakrilatlanan %4 (v/v) MA oranına sahip  $\kappa$ -CA polimerinin  $^1\text{H-NMR}$  analizi.

Yüzde metakrilatlanma derecesi= $[(\text{Metakrilatlanmış } \kappa\text{-CA'da yer alan metil grubunun alanı } -\text{CH}_3; 1.9\text{-}2.0 \text{ ppm} + \text{Vinil grubunun alanı } -\text{CH}_2; 5.4\text{-}6.0 \text{ ppm}) / (\kappa\text{-CA'da yer alan } \beta \text{ galaktoz alanı; } 3.89\text{-}4.0 \text{ ppm})] \times 100$  (Eşitlik 3.1)

Eşitlik 3.1'e göre hesaplama şu şekildedir:

1.91 ppm pikinin altında kalan alanın değeri: 2.48

5.36 ppm'in solunda kalan pikin alanı: 1.36

3.85 ve 4.04 ppm'in arasındaki pikin alanı: 4.37

Formüle göre:  $[(2.48 + 1.36) / 4.37] \times 100 = \% 88$  olarak hesaplanmıştır.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 27.06.2019

Tez Başlığı / Konusu: Mikrodalga Desteği ile Metakrilatlanmış *Kappa* Carrageenan Hidrojellerin 3B Baskılanması ve Kırkırdak Doku Mühendisliğinde Kullanımının Araştırılması

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 93 sayfalık kısmına ilişkin, 17/06/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 8'dir

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~çerçeve~~
- 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.

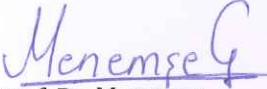
Gereğini saygılarımla arz ederim.

27.06.2019  
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Gülnihal Tok İlhan  
Öğrenci No: N16124883  
Anabilim Dalı: Biyomühendislik  
Programı:  
Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

  
Prof. Dr. Menemşe  
GÜMÜŞDERELİOĞLU  
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

## 8. ÖZGEMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı-Soyadı : Gülnihal Tok İlhan  
Doğum Yeri : Kayseri  
Medeni Hali : Evli  
E-posta : [gulnihaltk@gmail.com](mailto:gulnihaltk@gmail.com)  
Adresi : Bağlıca Mah. Bağlıca Bulv. Hilalpark Sitesi 47-B Kat:6  
No:24 Etimesgut/ANKARA

### Eğitim Bilgileri

Lise : Ahmet Eren Anadolu Lisesi (2010)  
Lisans : Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik  
Bölümü (2016)  
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik ABD (2019)

Yabancı Dil ve Düzeyi : İngilizce – Orta

### Çalışma Alanları

- Doku mühendisliğinde hidrojel çalışmaları
- 3 boyutlu biyobaskılama çalışmaları
- Hücre kültürü çalışmaları



### **Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi**

TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı 118M734 Numaralı “Mikrodalga Desteği ile Metakrilatlanmış Kappa Carrageenan Hidrojellerin 3B Baskılanması ve Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Kullanımının Araştırılması” Başlıklı Proje – 30,000 TL

### **Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar**

Tok İlhan, G., Irmak, G. and Gümüşderelioğlu, M., Microwave Assisted Methacrylated *Kappa* Carrageenan ( $\kappa$ -CA) Bio-Ink for Tissue Engineering Applications, Poster Presentation, International Symposium on 3D Printing in Medicine, 16-17 November 2018, Ankara, Turkey.