

**DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARINDA
KULLANILMAK ÜZERE PEPTİD BAZLI NANO ÖLÇEKLİ
DOKU İSKELELERİNİN HAZIRLANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF PEPTIDE-
PROTEIN NANOSCAFFOLDS TO BE USED IN TISSUE
ENGINEERING APPLICATIONS**

EKİN ÇELİK

Prof. Dr. EMİR BAKİ DENKBAŞ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2013

EKİN ÇELİK'in hazırladığı “ **DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARINDA KULLANILMAK ÜZERE PEPTİD BAZLI NANO ÖLÇEKLİ DOKU İSKELELERİNİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU** “ adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan (Danışman)

Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

Üye

Doç. Dr. Mustafa Türk

Üye

Doç. Dr. Lokman Uzun

Üye

Doç. Dr. Aylin Gürpınar

Üye

Yrd. Doç. Dr. Memed Duman

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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Anne ve Babam'a

ETİK

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

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri tez yazım kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili esere bilimsel normlara uygun olarak 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.

_ / _ / 2013

Ekin Çelik

ÖZET

DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARINDA KULLANILMAK ÜZERE PEPTİD BAZLI NANO ÖLÇEKLİ DOKU İSKELELERİNİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

EKİN ÇELİK

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. EMİR BAKİ DENKBAŞ

Eylül 2013, 76 sayfa

Günümüzde değişik amaçlar için PEG, PLLA, PGA pHEMA gibi birçok çeşitli biyomateryallerden yapılan doku iskeleleri kullanılmaktadır. Son yıllarda ise özellikle üç boyutlu hücre kültürü çalışmaları gündeme gelmiş, oluşturulan doku iskelelerinin şartları ECM'ye uyarlanmaya çalışılmıştır. Çalışılan sentetik 3D sistemler birçok hücresel faaliyeti anlamamız için yardımcı olsa da, fiber boyutları hücre boyutuyla neredeyse aynı olduğundan hücreler 2D ortamda gözlemlenmiş gibi sonuç vermiştir. Bunlara alternatif olarak çalışılan hayvandan geliştirilmiş biyomateryaller boyut sorununu ortadan kalırsa da, genelde rezidüel büyüme faktörleri içerdiklerinden ve insan çalışmalarına uygun olmamaları yanında, saflıkları da tam bilinmediğinden tamamen kontrollü çalışmalar yapılamamıştır. Bu yüzden kendiliğinden düzenlenen iskeleler gündeme gelmiştir. Doğal ya da sentetik materyallerin kendiliğinden düzenlenmesi sonucu oluşan iskeleler birçok uygulama için umut vaat etmektedir. Bu tez çalışmasında kendiliğinden düzenlenen Fmoc-FF-OH peptidinin hücre ortamı içerisinde çözülerek kendiliğinden düzenlenen hidrojel doku iskelesi oluşturması sağlanmıştır. Daha sonra bu doku iskelelerine nano-hidroksiapatit eklenerek yapılan karakterizasyon çalışmaları ve optimizasyon deneyleriyle hidrojellerin yapısına etkisi kontrol edilmiştir. Ayrıca doku iskelelerinin içerisine kondrosit hücreleri hapsedilerek 3D hücre kültürü uygulaması yapılmış, histoloji deneyleriyle peptit hidrojellerin üç boyutlu hücre kültürüne uygunlukları araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Peptit hidrojel, Fmoc-FF, 3D hücre kültürü, Kendiliğinden düzenlenme, Kondrosit, Nano-hidroksiapatit.

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF PEPTIDE-PROTEIN NANOSCAFFOLDS TO BE USED IN TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

EKİN ÇELİK

Master of Science, Nanotechnology and Nanomedicine Division

Supervisor: Prof. Dr. EMİR BAKİ DENKBAŞ

September 2013, 76 pages

Tissue scaffolds made of various biomaterials such as PEG, PLLA, PGA, PHEMA or chitosan have been used for different purposes lately. In recent years, studies have been focused especially on three-dimensional cell culture, so for tissue scaffolds created, scientists try to mimic ECM. Although synthetic 3D systems which have been created helped a lot to understand many cellular activity, because the diameter of fibers are almost the same as the cells, cells behave to be in a 2D culture. Alternately used, biomaterials developed from animals may overcome the problem of diameter, but because they contain residual growth factors and are not suitable for human studies as well as being not pure enough, completely controlled studies can not be performed. Therefore, self assembling peptide scaffolds started to be used. Self assembling of natural or synthetic materials are promising for many applications. In this study, self-assembling Fmoc-FF-OH dipeptides dissolved in the cell media have self organized to form hydrogel scaffolds. Then optimization studies performed with Fmoc-FF-OH hydrogels both containing nano-hydroxyapatite and empty, and characterizations are done. 3D culture of chondrocytes in Fmoc-FF-OH scaffolds has also been performed, in which cells were encapsulated, and histological experiments are performed.

Keywords: Peptide hydrogel , Fmoc-FF-OH, 3D cell culture, Self assembling, Chondrocytes, Nano-hydroxyapatite.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi, birikim ve tecrübelerinden yararlandığım, her zaman beni destekleyen ve yol gösteren çok değerli hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş ve ailesine;

Çalışmalarım süresince sahip olduğu bilgi, deneyim ve imkanları benimle paylaşarak desteğini esirgemeyen, laboratuvar imkanlarını sağlayan sayın hocam Doç. Dr. Mustafa Türk'e;

Tez çalışmam sırasında çok değerli yardım ve desteklerinden dolayı hocam Cem Bayram'a;

Çalışmamın her adımında bana desteklerini esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarım Eda Yalçın, Sema Tuncer'e;

Birlikte çalışmaktan zevk aldığım çalışma arkadaşlarım, çok sevdiğim Biyopolimerik Araştırma Grubu üyelerine;

Tezimin bitmesini sabırla bekleyen, beni çok güldüren canım arkadaşlarım Sinem Koçkan, Bahadır Erkan, Özgür Kazar, Çağlar Altınır, Gülce Simge Taşkın, Nilüfer Sormaz, Cansu Canel, Seda Güven, Ece Akhan, Kerem Kutsal, İrem Bodur ve Haluk Onur Pulat'a;

Hayatım boyunca her an yanımda olan, her alanda inanç ve sabırla bana olan desteklerini esirgemeyen canım aileme, pamuk dedem ve babaanneme, sevgili büyükanneme ve beni bir yerlerden izlediğini hep bildiğim dedeme;

Sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim..

EKİN ÇELİK

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kendiliğinden Düzenlenen Sistemler	3
2.1.1. Kendiliğinden Birleşen Peptit Sistemlerin Agregat Yapıları	3
2.1.2. Düşük Molekül Ağırlıklı Jelatörler	4
2.1.3. Hidrojelatör Amfifiller	5
2.1.3.1 Atomik Olmayan Amfifiller	6
2.1.3.2. Bolaamfifiller	7
2.1.3.3. Gemini Sürfaktanları	8
2.1.3.4. Şeker Bazlı Sistemler	8
2.1.3.5 Diğer Hidrojelatörler	9
2.1.4. Kendiliğinden Birleşen Peptit Yapılar	10
2.1.5. Aromatik Grup Konjuge Edilmiş Peptitler	13
2.2. Düşük Molekül Ağırlıklı Jelatörlerin Kullanım Alanları	14
2.3. Hidrojeller	14
2.3.1. Fiziksel ve Kimyasal Hidrojel Yapıları	16
2.3.2. Doku Mühendisliğinde Hidrojeller	17
2.3.3. Fmoc Dipeptitlerin Hidrojel Uygulamaları	19
2.4. Doku Mühendisliğinde Üç Boyutlu Hücre Kültürü	22
2.4.1. Doku Mühendisliğinde Hücre Dışı Matriksin Önemi	23
2.4.1.1. Üç Boyutlu Hücre Dışı Matriks Çalışmalarına Örnekler	24

2.4.1.2. Üç Boyutlu ECM Benzeri Peptit Hidrojeller	26
2.4.1.3. Üç Boyutlu ECM Benzeri Ticari Hidrojeller	26
2.5. Osteokondral Dokuların Anatomisi	27
2.5.1. Artiküler Kıkırdak	27
2.6. Osteokondral Hasarlar	30
2.6.1. Osteoartrit	30
2.6.2. Osteokondral Hasarlarda Doku Mühendisliği Yaklaşımları	31
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	36
3.1. Fmoc-FF Hidrojellerinin Hazırlanması	36
3.2. Fmoc-FF/HA'nın Hücre Kültürü Ortamında Jelleştirilmesi	36
3.3. Kondrosit Hücrelerinin Fmoc-FF Jelinde Enkapsülasyonu	36
3.4. Nanohidroksiapatit Sentezi	37
3.5. Kondrosit Kültürü	37
3.5.1. Kondrosit Hücrelerinin Açılması	37
3.5.2. Kondrosit Hücrelerinin Çoğaltılması.....	37
3.6. Kondrosit Kültürü	37
3.6.1. İkili boyama(Double Staining) çalışmaları	37
3.6.1.1. Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması	37
3.6.1.2. İkili Boyama Metodu İle Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi	38
3.6.2. Hematoksilen/Eozin Boyamaları	38
3.6.3. Toluidine Blue Boyamaları	39
3.6.4. Toksikite Deneyleri	39
3.7. Alkalen Fosfataz Aktivitelerinin Değerlendirilmesi	39
3.8. Fmoc-FF-OH Hidrojellerinin Reolojik Karakterizasyonu	40
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	41
4.1. Fmoc-FF-OH Hidrojelinin Karakterizasyonu	41
4.2. NanoHA Karakterizasyonu	48
4.3. NanoHA Katkılı Fmoc-FF-OH Jellerin Karakterizasyonu	49
4.4. Fmoc-FF-OH ve NanoHA Katkılı Fmoc-FF-OH Jellerin Reolojik Değerlendirmeleri	54

4.5. NanoHA Katkılı Fmoc-FF-OH Hidrojellerin 3 Boyutlu Hücre Kültüründe Kondrosit Uygulamaları	56
4.5.1. Hematoksilen/ eozin Boyamaları	57
4.5.2. Toluidien Blue Boyamaları	59
4.5.3. Apoptoz/nekroz Oranları	61
4.5.4. WST Sonuçları	61
4.5.5. Hücrelerin Mitotik Aktivite ve GAG Sentezi Skorlamaları	62
4.6. Alkalin Fosfataz Aktiviteleri.....	63
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Amfifil yapısı	6
Şekil 2.2. Fiziksel jellerin birincil ve ikincil yapıları	16
Şekil 2.3. Fmoc dipeptitlerinin moleküler yapıları	19
Şekil 2.4. Osteokondral doku	27
Şekil 2.5. Osteokondral dokunun ayrıntılı yapısı	29
Şekil 2.6. Artiküler kırıkta yapıları	29
Şekil 2.7. Artiküler kırıkta 3 boyutlu şeması	31
Şekil 4.1. 30 mg Fmoc-FF hidrojelinin SEM görüntüsü (1).	42
Şekil 4.2. 30 mg Fmoc-FF hidrojelinin SEM görüntüsü (2).	42
Şekil 4.3. 40 mg Fmoc-FF hidrojelinin SEM görüntüsü (2).	43
Şekil 4.4. 40 mg Fmoc-FF hidrojelinin SEM görüntüsü (2).....	43
Şekil 4.5. 50 mg Fmoc-FF hidrojelinin SEM görüntüsü (2).....	44
Şekil 4.6. 50 mg Fmoc-FF hidrojelinin SEM görüntüsü (2).....	44
Şekil 4.7. 40 mg Fmoc-FF ve 4 mg GdL kullanılarak yapılan hidrojel fotoğrafı.	46
Şekil 4.8. Fmoc-FF ve nanoHA katkılı Fmoc-FF hidrojellerin FTIR pektrumu	47
Şekil 4.9. Fmoc-FF ve nanoHA katkılı Fmoc-FF hidrojellerin 1200-2000 cm^{-1} arası FTIR spektrumu	47
Şekil 4.10. nanoHA'ların zeta sizer karakterizasyonu	48
Şekil 4.11. Sentezlenen hidroksiapatit tozunun FTIR spektrumu	48
Şekil 4.12. Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin fotoğrafı.	49
Şekil 4.13. HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin fotoğrafı	49
Şekil 4.14. HA eklenmemiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin SEM görüntüsü(1)	50
Şekil 4.15. HA eklenmemiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin SEM görüntüsü(2)	50
Şekil 4.16. 5 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin SEM görüntüsü (1).	51

Şekil 4.17.	5 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin SEM görüntüsü (2)	51
Şekil 4.18.	10 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin SEM görüntüsü (1).	52
Şekil 4.19.	10 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin SEM görüntüsü (2).....	52
Şekil 4.20.	20 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin SEM görüntüsü (1).	53
Şekil 4.21.	20 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin SEM görüntüsü (2).....	53
Şekil 4.22.	HA içermeyen Fmoc-FF/DMEM hidrojelinin viskoelastisite grafiği...	54
Şekil 4.23	5 mg HA/Fmoc-FF/DMEM hidrojelinin viskoelastisite grafiği.....	55
Şekil 4.24.	10 mg HA/Fmoc-FF/DMEM hidrojelinin viskoelastisite grafiği.....	55
Şekil 4.25.	20 mg HA/Fmoc-FF/DMEM hidrojelinin viskoelastisite grafiği.....	55
Şekil 4.26.	Hidrojel içerisine hapsedilmiş kondrositler.....	56
Şekil 4.27.	HA eklenmemiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojeli içerisindeki kondrositlerin boyamaları	57
Şekil 4.28.	5 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojeli içerisindeki kondrositlerin boyamaları.	57
Şekil 4.29.	10 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojeli içerisindeki kondrositlerin boyamaları	58
Şekil 4.30.	20 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojeli içerisindeki kondrositlerin boyamaları	58
Şekil 4.31.	HA eklenmemiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojeli içerisindeki kondrositlerin toluidien blue boyamaları	59
Şekil 4.32.	5 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojeli içerisindeki kondrositlerin toluden blue boyamaları	59
Şekil 4.33.	10 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojeli içerisindeki kondrositlerin toluidien blue boyamaları	60
Şekil 4.34.	20 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojeli içerisindeki kondrositlerin toluidien blue boyamaları	60
Şekil 4.35.	Alkale Fosfataz Aktiviteleri	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Fmoc dipeptitlerinin fiberleşme özellikleri	20
Çizelge 2.2. Kullanılan ticari 3D matrisler	22
Çizelge 2.3. Osteokondral hasarların tedavisi için alışılmış olan doku iskeleleri .	33
Çizelge 4.1. Fmoc-FF-OH hidrojelinin konsantrasyon ve GdL miktarı optimizasyonu	41
Çizelge 4.2. GdL miktarının pH üzerindeki zamana bağlı etkisi	45
Çizelge 4.3. Hidrojel içerisinde 5 gün kültür edilmiş kondrositlerin apoptoz/nekroz oranları	61
Çizelge 4.4. Hidrojel içerisinde 5 gün kültür edilmiş kondrositlerin toksisite sonuçları	61
Çizelge 4.5. Hidrojel içerisinde 5 gün kültür edilmiş kondrositlerin mitotik aktivite ve GAG sentezi skorları	62

1.GİRİŞ

Kendiliğinden düzenlenme, pH, sıcaklık, çözücü etkisi, ortamın nemi gibi birçok faktöre bağlı olarak moleküllerin kendiliğinden bir araya gelmesini sağlayan ve tüp, fibril, vezikül, membran gibi çeşitli yapıları ortaya çıkaran tersinir bir süreçtir. Bu süreç kovalent olmayan etkileşimlerle (hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, π - π istiflenmesi, hidrofobik güçler, Van der Waals ve kiral dipol-dipol etkileşimleri gibi) oluşur. DNA, lipit, protein, peptit gibi birçok biyomolekül kendiliğinden düzenlenme özelliğindedir ve hücre zarının, DNA'nın oluşumu gibi birçok biyolojik süreçte biyomoleküllerin bu özelliğinin rolü vardır. Bu yapılardan özellikle peptitler biyoyumluluğu, kimyasal olarak modifiye edilebilir olması, kolay ve ucuz sentezlenebilirliği, suda çözünür yapıda olması, olağanüstü dayanıklılığı, termal ve kimyasal kararlılığı gibi birçok avantaja sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde peptitler kullanılarak birçok yapı geliştirilmiştir. Bunlar arasında ilaç ve gen salımı için geliştirilen taşıyıcı sistemler, doku mühendisliğinde hücre proliferasyonunu ve hücrelerin tutunmasını sağlayan doku iskeleleri, enzim immobilizasyonu olarak kullanılan destek matrisleri, çeşitli moleküllerin tayini için kullanılan çevresel ve tıbbi biosensörler sayılabilir.

Son yıllarda doku iskelelerinde ECM'yi taklit etmeye yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. 3 boyutlu ortamda hücre kültürü yapılarak, ECM şartlarının daha iyi sağlanması için çalışılmaktadır. Tasarlanan doku iskelesinde kullanılacak olan yapıların hücre tutunmasını sağlaması, hücreye toksik etki göstermemesi, hücre çoğalmasına izin verecek porlu bir yapıya sahip olması, hücreleri taşıyacak gerekli mekanik güce sahip olması ve hücrelerin çoğalmasına paralel bir şekilde bozunması istenir. Peptit doku iskeleleri bu özellikleri sağladığı gibi doğal bir süreç sonucunda oluşmaları nedeniyle de oldukça önemlidirler. Son yıllarda bu yapılar kullanılarak çeşitli hücrelerin tutunması için peptit doku iskeleleri geliştirilmiştir. Bunlardan özellikle Fmoc-difenilalanin peptidinin kendiliğinden düzenlenmesi ile geliştirilen peptit hidrojelleri oldukça başarılı sonuçlar sunmuştur.

Bu çalışmada öncelikle Fmoc-FF dipeptitlerinin suda jelleşme potansiyelleri değişen konsantrasyon ve jelleşme ajanı(GdL) miktarıyla optimize edilmiştir. Daha sonra Fmoc-FF dipeptitlerin hücre besi yeri ortamında jelleşme kabiliyetleri test edilmiştir.

Bu jellere artan miktarlarda nano-hidroksiapatit eklenerek karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Hücre költürü deneyleri, kondrosit hücrelerinin üç boyutlu költüre yatkınlıkları bilindiği için, primer kondrositler ile yapılmıştır.

Son olarak doku iskelelerinin üç boyutlu hücre költürüne uygunluklarını test etmek amacıyla hem değişen miktarlarda nano-hidroksiapatit(HA) eklenerek oluşturulan, hem de nano-hidroksiapatit içermeyen Fmoc-FF/ besi yeri hidrojellerin histolojik deneyleri gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Kendiliğinden Düzenlenen Sistemler

Moleküler kendiliğinden birleşme ya da düzenlenme, belli termodinamik koşullar altında, moleküllerin kovalent olmayan bağlar sonucu spontane bir şekilde yapısal olarak daha düzenli ve kararlı oluşumlar doğurmasıdır.[1]

Kendiliğinden düzenlenen yapıların örneklerine doğada da rastlanmaktadır. İpek, örümcek ağı, saçta bulunan keratin ve kolajen, hücredeki şaperon proteinler, dişler örnek olarak verilebilir.

2.1.1. Kendiliğinden birleşen peptit sistemlerin agregat yapıları

Kendiliğinden birleşen sistemler birkaç şekilde geliştirilebilir:

1-moleküler lego

2-moleküler anahtar

3-moleküler kanca

4-peptit nanotüpler/ vezikül / kapsüller

5-moleküler kavite

1-Moleküler lego: Bu grupta yer alan peptitler hem hidrofobik hem hidrofilik gruplara sahip olduklarından beta yaprak yapısı oluşturmaktadır. En önemli özellikleri de hidrofilik zeminlerde düzenli tekrarlarla tamamlayıcı iyonik bağ oluşturabilmeleridir.[2] Hidrojel iskeleler bu yöntemle oluşturulmaktadır.

Jel oluşturmak için kullanılan hidrojelatör peptidin hidrofobisitesi arttıkça hidrojinin sağlamlığı da artmaktadır. [3]

2-Moleküler anahtar: Bu peptitler yapılarını sıcaklık ve pH değişimine göre değiştirebilmektedir. Örneğin DAR16-IV peptidi, normal koşullarda beta yaprak yapısına sahipken, sıcaklık arttırılınca alfa sarmal yapıya dönüşmektedir.[4, 5]

DAR16-IV ve EAK12 peptitlerinin (-) yüklü aspartat glutamat ve (+) yüklü lizin ve arjinin grupları bu peptitleri alfa sarmal yapılar oluşturmaya teşvik etmektedir. Aynı zamanda yapılarında beta yaprak oluşturabilen hidrofilik ve hidrofobik gruplar da barındırdıklarından, bu peptitler stabil değildir.

3-Moleküler kanca: Bu peptitler kendi kendilerine değil, yalnızca bir yüzey üzerinde kendiliğinden düzenlenmektedirler. Yüzey üzerinde katman oluşturarak kendiliğinden birleşmiş olurlar. Bu gruptaki peptitler üç önemli özelliğe sahiptir:

- En sonda bulunan bölümleri birçok fonksiyonel grupla etkileşim halindedir.
- Sert ana bağlayıcı kısımları bulunmaktadır.
- Yüzey kanca molekülleri sayesinde kimyasal gruplarla etkileşime geçerek kovalent bağ da oluşturabilmektedir.

4-Peptit nanotüpler/ veziküller: Bu gruba örnek olarak açık uçlu peptit nanotüp ağları gösterilebilir. Bu peptitler hidrofobik uç olarak 4 ya da daha fazla glisin, polar baş grup olarak da aspartik asit bulundurmaktadır. [6] Genelde ilaç taşınımı için geliştirilen bu peptit sistemlerinin, bir tarafı ilaca tutunarak taşınımını sağlarken, diğer tarafı da sistemin hücre zarından geçmesini sağlamaktadır.[7]

5- Moleküler kavite: Bu grupta geliştirilen sistemler biyomineralizasyon çalışmalarına yöneliktir. Genel hatlarıyla sistemin polimer ve peptit kısımları bulunmakta, peptit kısmını (-) yüklü moleküler tanınma grubu, polimer kısmını ise hidrofobik kuyruk oluşturmaktadır. Bu kuyruklar kendiliğinden düzenlenerek (-) yüklü bloklar oluşturunca (+) yüklü iyonları kendine çekmekte ve mineral fazlar meydana getirmektedir. [8]

İlk gruba dahil olan hidrojel, polimerlerden ya da doğal moleküllerden oluşturulabilir. Uzun zincirli hidrokarbonlar[9], sakkaritler[10], peptitler[11], amidler[12], üre[13], nükleobaz[14], steroid türevleri[15], iki bileşenli sistemler[16] gibi birçok organik molekül hidrojelatör olarak kullanılmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı jelatörler, daha önce polimerden tasarlanan kendiliğinden birleşen doku iskelelerinin kararsızlığı sonucu gündeme gelmiştir.

2.1.2. Düşük Molekül Ağırlıklı Jelatörler

Düşük konsantrasyonlarda kovalent olmayan bağlarla kendiliğinden birleşerek 3 boyutlu fibriler ve ağı yapılar oluşturan düşük molekül ağırlıklı jelatörler ilaç salımı ve taşınımı başta olmak üzere bir çok alanda karşımıza çıkmaktadırlar. Bu iskeleler nanomedikal alanda da aşağıdaki özellikleri bakımından tercih edilmektedir:

- Kolay kullanılabilir materyallerdir.

- Toksik etkileri bulunmamaktadır.
- Başışıklık sistemi yanıtı geliştirmezler.
- Trombojenik etkileri yoktur.
- Biyo bozunur, biyo uyumlu malzemelerdir.
- Lokalize tedaviler için oldukça uygulanabilir özelliğe sahiptir. [17]

Düşük moleköl ağırlıklı jelatör bileşikleri hidrofilik özellik gösteren hidroksi grupları ve hidrofobik özellik gösteren alkali uçlar barındırır. Bu gruplar arasındaki denge ve bileşiğin sterokimyası jel oluşumunu belirler. Söz konusu bu denge, anizotropik birleşmeden sorumludur. Düşük moleköl ağırlıklı jelatörlerin arasında olan π - π istiflenmesi, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler hidrojel oluşturur. Hidrofobik etkileşimler jel oluşumunu başlatırken, aromatik grupların kesişmesiyle oluşan π - π bağları geometrik organizasyondan sorumludur. Düşük moleköl ağırlıklı jelatörler polar çözücülerini hapsederek hidrojel oluşturur, jellerin termal kararlılıkları ile kullanılan çözücülerin (DMSO, etanol) miktarları arasında ters orantılı ilişki vardır. Yani, çözücü miktarı arttıkça, hidrojin termal kararlılığı düşmekte, böylece özellikleri sıcaklıkla değişebilen bir yapı kazanmaktadır. [18]

2.1.3. Hidrojelatör Amfifiller

Jelleşme için kristalleşme ve çözünürlük arasında bir denge gereklidir. Bu durumda molekölün agregasyon sağlaması için hidrofobik, çözünürlük sağlaması için hidrofilik gruplara sahip olması ve bu grupların dengede olması, o molekölün hidrojelatör özelliği göstermesi için yeterli olmaktadır. Bu denge, amfifil bileşiklerin hidrojelatör olarak kullanılmasını gündeme getirmiştir. Ayrıca amfifil moleküllerin sahip oldukları iyonik grupları, oluşabilecek jelle pH ve iyonik bağlar aracılığıyla modifiye edilebilme özelliği kazandırması, bu moleküllerin hidrojelatör olarak kullanılmasına yardımcı olmuştur. Hidrojelatör amfifiller 5 grupta incelenebilir[19] :

1-Atomik olmayan amfifiller

2-Bolaamfifiller

3-Gemini sürfaktanları

4-Şeker bazlı sistemler

5-Diğer hidrojelatörler

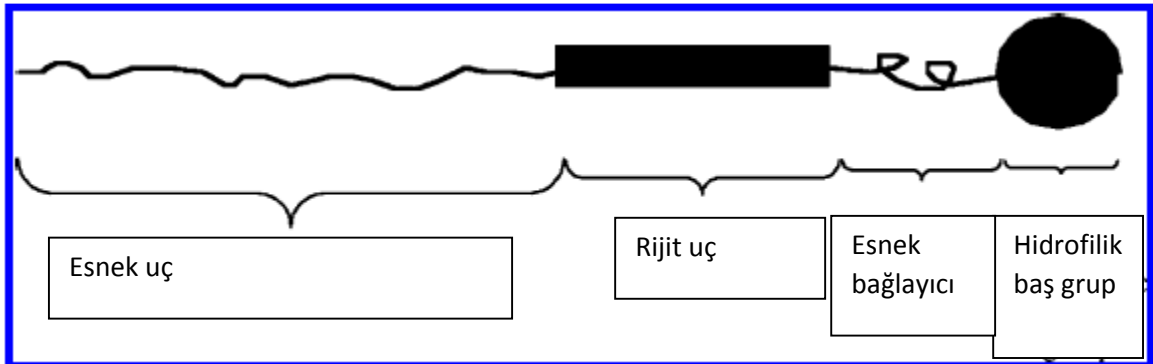
2.1.3.1 Atomik Olmayan Amfifiller:

Bu moleküller bir hidrofilik baş grup ve bu baş grubu takip eden bir ya da iki hidrofobik gruptan oluşur. Polar baş grup, karboksilik asit, aminoasit, şeker, fosfat gibi birçok fonksiyonel grup olabilir. Hidrofobik grupların ne oldukları ise molekülün yapısı ve uzunluğuna göre çeşitlilik göstermektedir. Lipidler, sabun ve deterjan günlük hayatımızda sıklıkla karşılaştığımız amfifillerdendir.

Amfifillerin neye göre misel, tüp ya da vezikül değil de hidrojel oluşturduğunu henüz tam olarak bilinmemektedir.

Kunitake ve arkadaşları, amfifilin yapısıyla oluşturdukları agregatları ilişkilendirdikleri çalışmaları sonucu, amfifilleri yapısal olarak 4 kısımda incelemişlerdir [20]:

- Hidrofilik baş grup
- Baş grubu takip eden esnek bağlayıcı
- Ardından rijit uç
- En sonda ise esnek uç



Şekil.2.1.Amfifil yapısı [19]

Kunitake ve arkadaşları ayrıca bazı moleküllerin sonuna ester veya amid grubu ekleyerek hidrojen bağı kapasitesini arttırmak istemişler ve bu çalışmaları sonucunda, 60 farklı amfilipil molekülü oluşturarak, bunların agregat morfolojilerini belirlemişlerdir. Araştırmaları sonucunda, esnek bağlayıcı ve uç kısmın agregat

yapısını değiştirdiği gösterilmiştir. Sert ucun ise yüzey kavisini etkilediği sonucuna varılmıştır.

Fuhrhop ve arkadaşları ise N-dodesilglukonamid ile jelleşme sağlayan misel benzeri fiberlerin moleküler modellemesini yapmıştır. Imae ve arkadaşları ise, amfifillerin baş grubu olarak aminoasit sürfaktanları (glutamik asit, askorbik asit, alanin) kullanmışlardır[21]. Bu çalışmalarda karboksil asidin baş grup olduğu moleküllerin oluşturduğu jellerin pH değişimine ve sıcaklığa bağımlı oldukları gösterilmiştir. Hambusa ve arkadaşları da çalışmalarında lizin ve türevlerini baş grup olarak kullanmış ve başarılı sonuçlar elde etmiştir.[22] Nakashima ve Kimizuka iki baş gruplu amfifillerle, aniyonik floresan boyası ekleyerek agregat ve jel oluştuğunu göstermişlerdir. Bu alışma iyon alışverişinin dengesini vurgulaması bakımından önemlidir [23]. Bütün bu çalışmalar bilim adamlarının amfifillerin agregat morfolojileri hakkındaki çalışmalarına ışık tutmuştur.

Geliştirilen en düşük molekl ağırlığına sahip jelatörler ise serin bazlı amfifillerdir. Molekül ağırlığı 250 Da olan bu moleküller, π - π istiflenmesi sayesinde jelleşmektedir.

Ayrıca bazı amfifillerde su içinde kendiliğinden birleşmeye yatkın olan florokarbonlar baş grup olarak kullanılmıştır.[24]

2.1.3.2. Bolaamfifiller

İki baş gruplu amfifiller bolaamfifiller olarak adlandırılır. Birçok değişik agregat morfolojisi gösterebilmektedirler. Bir molekl ağırlığında katman ya da kullanılan bağlayıcının boyuna ya da yapısına göre misel oluşturabilirler.

Shimizu ve arkadaşları, çalışmalarında birçok farklı baş gruba sahip bolaamfifil geliştirmişlerdir. Kullanılan bu moleküllerin(nükleotidler, aminoasitler, seker) jel ve fiber oluşturdukları gözlemlenmiştir. [25, 26, 27]

Francheschi ve arkadaşları amfifil yapısındaki bağlayıcı uzunluğunun misel, fiber ya da vezikül oluşmasında etkili bir faktör olduğunu kanıtlamıştır [28] . Bu çalışmaya göre uzun bağlayıcıya sahip bolaamfifiller misel oluştururken, kısa bağlayıcıya sahip moleküller konsantrasyona bağlı olarak vezikül ya da fiber oluşturmuşlardır. Bu çalışmada yalnızca en uzun bağlayıcıya sahip bolaamfifiller (20 metilen uzunluğunda) jel oluşturabilmiştir.

Alkali, bis(aminoasit) oksalil amid grupları da bağlayıcı olarak kullanılabilir.[29] Yan zincirlerin yapığı hidrofobik etkileşimler oluşan yapıya düzgün bir şekilde agrege olmayı ve düzenli fiber yapısı sağlamaktadır. Oksalil grupları ise π - π etkileşimi ve fiberleşmeyi sağlayarak hidrojel oluşumunu desteklemektedir.

Hidrojel oluşumu için molekül yapısındaki hidrofobik ve hidrofilik grupların dengesi ile birlikte sağlanması gereken bir başka şart da izomerizasyon kinetiğidir. Yapılan çalışmalar jelleşme için izomerizasyonun hızlı olması gerektiğini göstermiştir, yavaş izomerizasyon kristalizasyona sebep olmaktadır.

2.1.3.3. Gemini Sürfaktanları

Gemini sürfaktanları amfifillere göre daha karmaşık bir moleküler yapıya sahip olduklarından daha çeşitli agregat yapıları sunmaktadır. Yapıları molekülün iki ucundaki esnek uçlar ve 2 yüklü grup arasındaki sert uçtan oluşur.

Bu moleküllerin agregat morfolojilerinde en önemli etken hidrofobiklikleridir. [30] Jelleşme ise moleküldeki alkali grubun uzunluğuna bağlıdır. Alkali grup uzadıkça jelleşme sağlanmaktadır.

Bu sürfaktanları keşfeden ve adını koyan Menger ve arkadaşları bu yapıdaki moleküllerin hemen hemen hepsini çalışmıştır. [30] Menger dışında, Oda ve Huc da 2 kıvrımlı kurdeldan oluşturdukları gemini sürfaktanlarıyla çalışmışlardır.[31, 32]

2.1.3.4. Şeker Bazlı Sistemler

Karbonhidratlar hidrojelatör oluşturmak için gereken hidrofilikliğı sağlarken aynı zamanda kiral gruplar için de geniş bir yelpazeye sahiptir.[33] Ayrıca bu moleküllerden oluşan jeller biyo uyumlu da olduklarından biyolojik jel olarak kullanılmak üzere umut vaat etmektedir.

Shinkai ve arkadaşları, hidrojelatörlerinde hidrofilik özelliklerinden dolayı karbonhidratları ve π - π bağı için değişik aromatik grupları kullanmışlardır.[33] Bu hidrojelatörlerden bazılarının termal duyarlı oldukları görülmüştür.[34]

Bhattacharya ve Acharya, dissakarit amfifillerin jelleşme özelliklerini alkol çözücülerle birlikte incelemişler ve çalışmaları sonucunda sadece çift zincirli amfifillerin tek zincir jel oluşturdukları, sıklık türevlerin hidrojel oluşturdukları

gözlemlemişlerdir[35] . Yani moleküller arası hidrojen bağı kurulması için polar-apolar grupların dengesinin yanı sıra konformasyonun da önemli bir rol üstlenmekte olduğu sonucuna varılmıştır.

2.1.3.5. Diğer Hidrojelatörler

Bu grup moleküllere örnek olarak, arberol/kaskat molekülleri, bazı tuzlar, bazı aminoasit ve asit türevleri verilebilir.

Newcome ve arkadaşları, yaptıkları çalışmalarda arberol/kaskat moleküllerini hidrojelatör olarak tasarlamışlardır. Bu moleküller oldukça büyük bolaamfifil olarak düşünebilir ve yapıdaki hidrofobik merkez agregasyon, hidrofilik gruplar ise çözünürlük sağlamaktadır.[36] Terpiridin içeren karboksilik asit tuzları da yüksek konsantrasyonda kullanıldıklarında misellerden oluşan jel oluşturabilmektedir.[37] Ayrıca Menger ve arkadaşları, arolyl_L_sistin türevleri sentezleyerek bunlardan termal olarak stabil ve yoğun jel oluştuğunu göstermişlerdir. [38]

Eğer bir molekül güçlü şekilde anizotropik seklinde kristalize oluyorsa, jelatör olabilme kapasitesine sahiptir. Bu kristalizasyon fibril oluşumunu desteklemektedir.

Bolaamfifil ve Gemini sürfaktanların karışımı olan bis(urea) dikarboksilik ailesi de hidrojelatör olarak çalışılmış ve başarılı sonuçlar vermiştir. Bu moleküller çok düşük konsantrasyonda kendiliğinden birleşerek hidrojel oluşturmaktadır.[39] Bu moleküller ayrıca jelasyon sırasında düşük pH'de fibriller halinde çökelti sağlamaktadır, bu da oluşturulan hidrojellerin pH ve iyonik güce bağımlı yapısına işaret etmektedir.[39]

Ayrıca yapılan çalışmalardan anlaşıldığı üzere, kullanılan hidrojelatörün molekül ağırlığı azaldıkça jelleşme pH'si düşmektedir.

Hidrojelatörün jelleşmesi ya da agregasyonu, moleküldeki gruplar arasındaki bağlayıcı ve uç uzunluklarına bağlıdır. Eğer aralarında uyumsuzluk varsa bu 3.boyutta düzensizliğe, yani jelleşmeye neden olmaktadır.

Yapılan tüm çalışmalar sonucu, jelasyonun hidrofobisiteyle doğru orantılı olduğu görülmüştür. Hidrofobisitesi 2.8'den küçük olan dipeptitler zayıf, kararsız jeller oluştururken, 5.5'ten büyük olanlarsa hidrojel oluşturmak için fazla hidrofobik olduklarından jel oluşumu sağlanamamaktadır. Düzgün jelasyon için hidrofobisite bu iki değer arasında olmalıdır, özellikle yan zincirlerin hidrofobisitesi önemlidir.[40]

Johnson ve arkadaşlarına göre, pH ne kadar hızlı düşerse, jel o kadar heterojen ve yoğun olmaktadır.[41]

Ayrıca jelleşme için aminoasit sekansı da önemli olduğu gösterilmiştir.[42]

2.1.4. Kendiliğinden Birleşen Peptit Yapılar

Birçok hastalıkta hücre bazlı terapiler işe yaradığından genelde hayvan kaynaklı biyolojik iskeleler ile (kolajen bazlı biyolojik iskeleler, türevleri, biyo uyumlu kopolimerler) çalışılmaya başlanmıştır. Yalnız bu materyaller prion, virüs gibi tehlikeli patojenler taşıyabildiklerinden, bilim adamlarını başka yollar aramaya sevk etmiştir.[43] Hem çok çeşitli ve biyo uyumlu olmaları hem de çok çeşitli biyo materyaller (misel, tüp[44], fiber[45], kıvrımlı kurdela[46]) oluşturdukları için peptitler son dönemde sıkça çalışılmaya başlanmıştır. Böylece sentetik peptit bazlı doku iskeleleri geliştirilmiştir.

Kendiliğinden birleşme mekanizması aşağıdaki özelliklere bağlıdır:

- Kendiliğinden birleşme yolu
- Moleküler yapı
- Peptit sekansı

Bu özelliklerdeki farklılıklara göre farklı agregatlar oluşmaktadır. [47]

Kendiliğinden birleşme mekanizması birkaç şekilde oluşabilir:

- Enzim reaksiyonları
- Çevresel koşullardaki değişimler, sıcaklık, organik çözücü eklenmesi
- Sıralı pH değişimi

Sıralı pH yöntemi kullanılarak oluşturulan metotlardan en sık kullanılanı yüksek pH'de çözmek ve hemen ardından pH'yi düşürerek jelleşme sağlamaktır. Yüksek sıcaklıktaki bu çözünürlük karboksil asit ucunun hidrojen kaybetmesine neden olur, bu deprotonasyonu ve sonrasında jelleşmeyi sağlamaktadır. [47]

Hidrojelatörlerin jelleşmesi için uygun pH, şeker öncüleri [48] ya da HCl asit [49] sayesinde sağlanmaktadır.

Yapılan çalışmalarda, pH ayarlamak için eklenen HCl asidin jel içinde asidik cepler oluşturduğu gözlemlenmiştir.[50] Bu problem asidin yavaşça eklenerek ve sıcak/soğuk döngüsü yaratarak daha homojen jeller oluşturmak hedeflenmiştir.

Kullanılan kendiliğinden birleşen peptitler [4]:

RADA16-I	+ - + - + - + - n-RADARADARADARADA-c
RGDA16-I	+ - + - + - + - n-RADARGDARADARGDA-c
RADA8-I	+ - + - n-RADARADA-c
RAD16-II	+ + - - + + - - n-RARADADARARADADA-c
RAD8-II	+ + - - n-RARADADA-c
EAKA16-I	- + - + - + - + n-AEAKAEAKAEAKAEAK-c
EAKA8-I	- + - + n-AEAKAEAK-c
RAEA16-I	+ - + - + - + - n-RAEARAEARAEARAEA-c
RAEA8-I	+ - + - n-RAEARAEA-c
KADA16-I	+ - + - + - + - n-KADAKADAKADAKADA-c
KADA8-I	+ - + - n-KADAKADA-c
EAH16-II	- - + + - - + + n-AEAEAHAAEAEAHAAH-c
EAH8-II	- - + + n-AEAEAHAAH-c
EFK16-II	- - + + - - + + n-FEFEFKFKFEFEFKFK-c
EFK12-I	- + - + - + n-FEFKFEFKFEFK-c

KLE12-I	+ - + - + - n-KLELKLELKLEL-c
RAD16-IV	++++ - - - - n-RARARARADADADADA-c
DAR16-IV	- - - - + + + + n-ADADADADARARARAR-c
DAR16-IV ^a	- - - - + + + + n-DADADADARARARARA-c
DAR32-IV	- - - - + + + + n-(ADADADADARARARAR)-c
EHK16	+ - + - + + + + - + - + + + + n-HEHEHKHKHEHEHKHK-c
EHK8-I	+ - + - + + + + n-HEHEHKHK-c
VE20 ^a (NaCl)	- - - - - - - - - - n-VEVEVEVEVEVEVEVEVEVE-c
RF20 ^a (NaCl)	++++ + + + + + + + + n-RFRFRFRFRFRFRFRFRFR-c
EFK8-II	- + - + n-FEFKFEFK-c
ELK16-II	- - + + - - + + n-LELELKLELELKLEL-c
ELK8-II	- - + + n-LELELKLEL-c
EAK16-II	- - + + - - + + n-AEAEAKAKAEAEAKAK-c
EAK12	- - - - + + n-AEAEAEAEAKAK-c
EAK8-II	- - + + n-AEAEAKAK-c
KAE16-IV	++++ - - - - n-KAKAKAKAEAEAEAE-c
EAK16-IV	- - - - + + + + n-AEAEAEAEAKAKAKAK-c
KLD12-I	+ - + - + - n-KLDLKLDLKLDL-c

2.1.5. Aromatik Grup Konjuge Edilmiş Peptitler

Hidrojelatör peptitlerin gündeme gelmesiyle beraber, aromatik koruyucu grup eklenen peptitler çalışılmaya başlanmıştır. Bu konuda ilk olarak Groot ve arkadaşları isovaline-FA'nın ph 5.8'de jel oluşturduğunu göstermiştir.* Bu peptitler aşağıda 3 grup halinde açıklanmıştır[51]:

a. Piren dipeptitleri

Bu konuda örnek olarak vankomisin çalışması gösterilebilir.

D-Ala-D-Ala peptidine vankomisin ekleyerek jel oluşturan bilimadamları aynı çalışmayı L-Ala-L-Ala peptidiyle yapmış, G değerinin arttığını göstermiştir.

b. Naftalin dipeptitleri

Xu ve arkadaşları naftalin konjuge edilmiş peptitlerden oluşan hidrojeller geliştirmiştir. [52] Düzgün hidrojel oluşturan naftalin dipeptitlerin OCH₂ bağlayıcısına sahip olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca Fmoc hidrojeller gibi bunların da hücrelere toksik etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

c. Fmoc dipeptitleri

Fmoc-FF dipeptidinden jel oluşturmak için suda çözmek dışında, DMSO ya da HFIP gibi çözücüler içerisinde çözmek de denenmiştir. Ancak bu tampon çözeltilerin kullanılması, suda çözülerek yapılan Fmoc-FF hidrojellerine göre daha kararsız yapılar oluşmasına sebep olmaktadır.[52]

Fmoc-FF dipeptidinin bazik koşullarda jelleşmesinin sebebi, karboksil ucunun sahip olduğu yüksek pKa değeridir.

Fmoc-FF hidrojelleri enkapsülasyon, hücre kültürü çalışmalarında kullanılmaktadır. Ayrıca ilaç salımı için de kullanılabilir, daha önce yapılan çalışmalarda floresan moleküllerin hapsediği, büyük moleküllerin jelde hapsediği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada hamster yumurtalık hücrelerinin Fmoc jel içerisinde dağıtıldığında hücrelerin yaşamını sürdürdüğü görülmüştür. Liebmann ve arkadaşları da içerisinde hücre bulunduran PBS tampon çözeltilisine DMSO'da çözülmüş peptit solüsyonu eklendiğinde içinde hücre hapsedilmiş hidrojel oluştuğu göstermiştir.[53, 54]

Ulijn ve arkadaşları enzimle indüklenmiş hidrojelasyon gerçekleştirmişlerdir.[55]

Fmoc tripeptitler ile de hidrojel oluşturulmuştur. Bu peptitlerin de düşük ya da yüksek pH'de boraks tampon çözeltisinde jel oluşturduğu gösterilmiştir.[56]

2.2. Düşük Molekül Ağırlıklı Jelatörlerin Kullanım Alanları

Özellikle doku mühendisliği alanındaki tedavi potansiyelleri sebebiyle, bilim dünyasında sıkça çalışılan hidrojelatörler, günümüzde birçok alanda bilim adamları tarafından çalışılmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı jelatörler yüksek biyo uyumluluklarından dolayı, başta biyomedikal uygulamalarda olmak üzere, farklı birçok uygulamada kullanılmaktadır. Polimer bazlı olanlar, ayırıştırma teknolojileri ve sensör geliştirilmesi başta olmak üzere, gıda, kozmetik, ilaç sektörlerinde de tercih edilmektedir.

Agrege olma özellikleri bakımından antibiyotik aktivitesi göstermektedirler.[57] Gen taşıma aracı, kontrollü salım sistemleri gibi çalışma alanlarında kullanılabilecek bu hidrojeller kolay hazırlanabilirlikleri ve düşük konsantrasyonlarda sonuç vermeleri sebebiyle daha birçok alanda yer almaya adaydır.

Kendiliğinden birleşen materyallerin kullanım alanları:

- Biyosensörler
- Kontrollü salım mekanizmaları
- Yara onarımı için matrisler
- Jelasyonla hücre yaşamının kontrolü
- Biyokatalist immobilizasyonu
- Nanofabrikasyon
- Kalıplaştırma
- Hücre içi görüntüleme

şeklinde sıralanabilir.[58]

2.3. Hidrojeller

3 boyutlu sürekli faz madde olarak tanımlanan jeller; günlük hayatta yemek, ilaç, kozmetik gibi alanlarda olduğu gibi, laboratuvar ortamında da biyomateryaller şeklinde sıklıkla kullanılmaktadır. Günlük kullanımda alışkın olduğumuz jelatin puding, saç spreyi, deterjan jeller gibi jellerin ana maddesi sıvı olup az miktarda katı

içermektedirler. Ancak hidrojel olarak adlandırılan sıvı çözeltilerin jelleri, özellikle ilaç endüstrisinde birçok kullanıma elverişli olduğundan, bilim dünyasında son yıllarda sıkça bahsedilmeye başlanmıştır.

Hidrojel çalışmaları Wichterle ve Lim'in HEMA hidrojel çalışmasıyla başlamıştır.[59] Bu çalışmadan itibaren de biyomedikal alanlardaki kullanılabilirliklerinden ötürü bilim adamlarının ilgisini çekmektedir. Hidrojeller suda kendi ağırlıklarının binlerce kat fazlasını absorbe edebilen hidrofilik polimer bağlarıdır. Oluşturuldukları materyale göre kimyasal olarak kararlı ya da çok kararsız olabilirler, bu jeller hidro yapılarından dolayı fiziksel, geri dönüştürülebilir jellerdir. Geri dönüştürülebilir olmaları moleküllerin arasında oluşan bağların zayıf, ikincil kuvvetler (iyonik, H bağı, hidrofobik kuvvetler) olmasından ileri gelmektedir.[60] pH, ışık, ısı gibi fiziksel koşullarda kolay yönlendirilebilen özelliklerinden dolayı akıllı jel olarak da adlandırılan bu jelleri fiziksel koşullara göre değişimlerine göre aşağıdaki gibi gruplandırmak mümkündür:

- a) pH duyarlı hidrojeller: Boden'in oligopeptitleri bu gruba örnek olarak verilebilir. [46] Stupp ve arkadaşları da oligopeptitlere Ca iyonu ekleyerek hidrojel oluşumunu sağlamışlardır.[8]
- b) Spesifik moleküller arası bağlarla oluşturulan hidrojeller: [49] Eğer bir polielektrolit karşıt yüklü bir multivalent iyonla birleştirilirse, bu bağ iyonotropik bir fiziksel jel oluşturmaktadır. Kalsiyum aljinat jeli bu jellere örnek olarak gösterilebilir.
- c) Işığa duyarlı hidrojeller: Bu jeller ışığa duyarlı moleküller aracılığıyla jel oluşturmaktadırlar.[61]
- d) Enzimle indüklenen hidrojeller: F-moc dipeptitlerine alkalik fosfat enzimi eklendiğinde jel oluşumu gözlemlenmiştir.[55]
- e) Isıya duyarlı hidrojeller: Yapılan araştırmalarda DNA saliminin bu şekilde sağlanabileceği gösterilmiştir.[62]

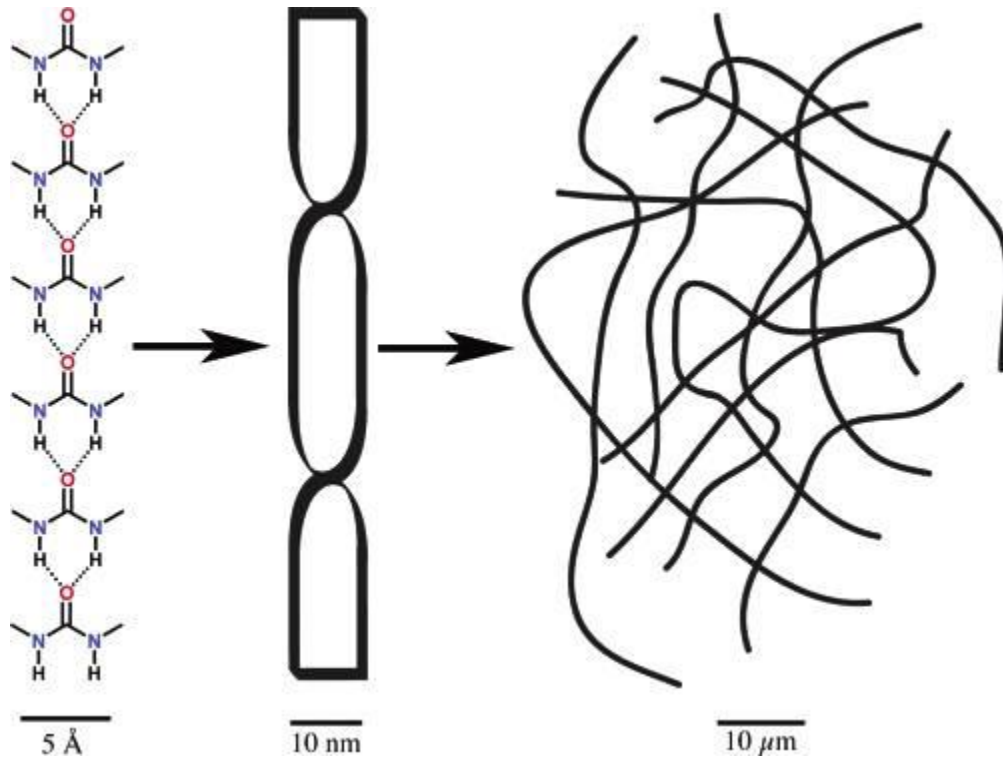
Kuru durumda olan jel su çekmeye başladığında, önce en polar, hidrofilik grupları sulu hale getirmektedir. Bu grupların sulu hale gelmesiyle birincil bağlı su grupları oluşmaktadır. Polar grupların sulu hale gelmesiyle hidrofobik gruplar ortaya çıkar, su molekülleri bu gruplarla ikincil bağlı su gruplarını oluşturur. Hem polar hem apolar

grupların suyla bağ kurup, toplam bağlı su gruplarını oluşturmalarından sonra, jel fazla suyu da emer. Jele hapsedilen fazla su, jelin ağ yapısından ötürü elastik ağ geri çekme kuvveti oluşturur. Böylece jel dengedeki şişme seviyesine ulaşmış olur. Fazla su serbest zincirlerden oluşan boşluklara dolarak ağların su almasını sağlar. Bu da çapraz bağlanmaların ve zincirlerin parçalanmasına yardımcı olur ve jel bozunur. [63]

Hidrojel oluşma süresince ne kadar uzun, ince ve elastik fiberler olursa, jelasyon o derecede iyi gerçekleşmiş, çözücü o kadar iyi hapsedilmiş demektir. Ayrıca jelasyon sıcaklığı arttırıldıkça jel oluşturan fiberlerin dallanmasının arttığı da gösterilmiştir. [63]

2.3.1. Fiziksel ve Kimyasal Hidrojel Yapıları

Fiziksel jeller elektrostatik kuvvetlerle, hidrojen bağları, π - π bağları, van der Waals bağları gibi zayıf bağlar aracılığıyla oluşur, oluşturdukları bu zayıf bağlar yüzünden homojen yapıda değildir. Bu yüzden oluşan serbest zincir uçları veya zincir halkaları, bu jellerin sorunları olarak sayılabilir. [63]



Şekil.2.2.Fiziksel jellerin birincil ve ikincil yapıları [19]

Bazen fiziksel jeller biyospesifik tanınmalar da gerçekleştirebilir, örnek olarak polimerik şeker - concanavalin A, ya da avidin - biyotin.

Eğer bir jel, bileşenlerin kovalent bağları aracılığıyla oluşmuşsa, bu jel kimyasal jel adını alır. Buna örnek olarak, Wichterle ve Lim'in oluşturdukları HEMA-EGDMA jeli gösterilebilir. Fiziksel jeller gibi kimyasal jeller de homojen değildirler. Bu jellerde hidrofobik agregasyon sonucu oluşan topaklar bulunmaktadır, geri dönüşü olmayan dirençli bir yapı oluşturmaktadırlar. Ayrıca esnekliği engellemeyen serbest zincir uçları ve zincir halkaları kimyasal jellerde de görülmektedir.

1980'de kalsiyum aljinat mikro kapsülleri geliştirilmiş[64], daha sonra Yannas ve arkadaşları da oluşturdukları hidrojellerin içine kolajen ve köpek balığı kıkırdağı ekleyerek bunları yanık dokuları yenilemek[65] için kullanmışlardır. Son yıllarda ise, hücre hapsedebilme yeteneklerinden dolayı hidrojellerden direk yapay doku üretme çalışmaları hız kazanmıştır. Hubbell ve arkadaşları PEG bazlı MMP'ye duyarlı hidrojel [66] Anseth ve arkadaşları tarafından da yara onarımında kullanılmak üzere elastaza duyarlı hidrojel oluşturmuştur.[67] Xing ve arkadaşları çalışmalarında vankomisin-piren türevinden antibiyotik özellik taşıyan hidrojel geliştirdiler.[68]

2.3.2.Doku Mühendisliğinde Hidrojeller

Doku mühendisliği yaklaşımında kullanılması tasarlanan bir doku iskelesinin sahip olması gereken özellikler aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Kolay dizayn edilebilir olmalıdır.
- Kolay değişiklik yapılabilir olmalıdır.
- Kontrollü bozunur olmalıdır.
- Sitotoksik olmamalıdır.
- Hücreyle iskele materyali etkileşmemeli, ya da hücre tutunmasını arttıracak şekilde olmalıdır.
- Enflamasyon ve bağışıklık sistemi yanıtı minimal düzeyde olmalıdır.
- Kolay üretilebilir, saflaştırılabilir ve işlem uygulanabilir olmalıdır.
- Fizyolojik koşullara uyum sağlamalıdır.

Ayrıca son yapılan çalışmalar doku iskelesinin dizaynının da çok önemli olduğunu göstermektedir. Geometriye bağlı olarak iletilen mekanik güç, kullanılan iskele

materyalinden bağımsız olarak hücrelerin yaşamı ve şekli üzerinde rol oynamaktadır.[63]

Doku mühendisliği çalışmalarında hidrojellerin kullanılmasının avantajları:

- Sulu yapıda olduğu için taşıdıkları ilaç ya da hücreleri korumaktadır.
- Hücrelere taşınacak besin için iyi bir nakil aracıdır.
- Kolay modifiye edilebilmektedir.
- Vücut sıcaklığında jelleşecek şekilde hazırlanırsa direk sıvı olarak enjekte edilebilmektedir.
- Biyo uyumlulukları bilinmektedir.

Doku mühendisliği çalışmalarında hidrojellerin kullanılmasının dezavantajları:

- Kontrol edilmesi zordur.
- Mekanik olarak zayıf özellik göstermektedirler.
- İlaç yükledikten sonra çapraz bağlama yapmak zor olabilmektedir.
- Sterilize etmek zordur. [63, 69]

Hidrojel oluşturmak için kullanılan polimerler:

-Doğal polimerler ve türevleri

-Anyonik polimerler: HA, aljinik asit, pektin, deniz yosunu, kondroitin sülfat, dekstran sülfat

-Katyonik polimerler: kitosan, poli-lisin

-Amfipatik polimerler: kolajen (ve jelatin), karboksimetil kitin, fibrin

-Nötr polimerler: dekstran, agaroz, pullulan

-Sentetik polimerler

-Poli esterler: PEG-PLA-PEG, PEG-PLGA-PEG, PEG-PCL-PEG, PLA-PEG-PLA, PHB, P(PF-co-EG), P(PEG/PBO)

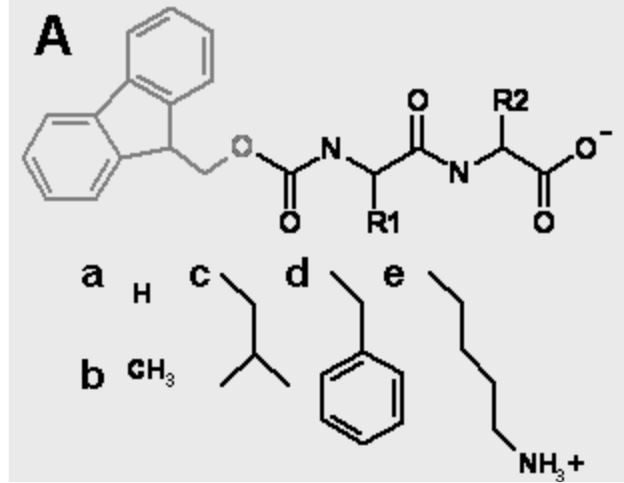
-Diğer polimerler: PEG-bis-(PLA-akrilat), PEG, PEG-g-P(AAm-ko-Vamin), PAAm, P(NIPAAm-co-AAc), P(NIPAAm-ko-EMA), PVAc/PVA, PNVP, P(MMA-ko-HEMA), P(GEMA-sulfat)

-Nötr ve sentetik polimer kombinasyonları

P(PEG-ko-peptitleri), aljinat-g-(PEO-PPO-PEO), P(PLGA-ko-serin), kolajen-akrilat, aljiant-akrilat, P(HPMA-g-peptit) [70]

2.3.3. Fmoc Dipeptitlerin Hidrojel Uygulamaları

Kendiliğinden birleşen protein yapıların kararlılığı peptitler arası hidrojen bağları, oluşan π - π istiflenmesi ve polar-apolar dengesine bağlıdır. Bu kendiliğinden birleşme mekanizması, son yıllarda ucuna aromatik grup eklenmiş, 2-6 aminoasit uzunluğundaki kısa peptitler aracılığıyla sağlanmaya başlanmıştır. Fmoc ya da naftalin gibi bu koruyucu aromatik grupların π - π etkileşimleri ve hidrojen bağı yaratarak, kendiliğinden birleşme oluşturduğu düşünülmektedir.[71] Son dönemde çalışmalar özellikle Fmoc (Flourenyl-9-methoxycarbonyl) eklenmiş peptitler üzerinde yoğunlaşmıştır.



Şekil.2.3. Fmoc dipeptitlerinin moleküler yapıları: Gly (a), Ala (b), Leu (c), Phe (d), and Lys (e) [50]

İlk olarak Vegners ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda hidrojel olabilme kapasitesi belirtilen Fmoc eklenmiş peptitlerden hidrojel olduğu daha sonra Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda[72] gösterilmiştir.

Fmoc bağlı dipeptitler, hidrofilitiklikleri arttıkça jelleşmeleri için daha yüksek konsantrasyona ihtiyaç duymaktadırlar. Peptit konsantrasyonu arttıkça jelin gücü artmakta, ağ yapısının boyutu küçülmektedir.

Fmoc-FF dipeptidi, düşük pH'lerde jelleşen başka Fmoc bağlı dipeptitlerden farklı olarak fizyolojik pH'de jelleşerek, biyomedikal alanlarda kullanım kolaylığı sağlamaktadır.

Üstelik belli koşullar altında, peptit sekansına göre farklı fiziksel, morfolojik ve mekanik özelliklerde nano yapılar oluşturulabilir. Örneğin daha önce yapılan çalışmalarda Fmoc-FF ile 3nm çapında fibriler yapılar, Fmoc-L3'ten 20nm çapında tübüler yapılar ve Fmoc-L5ten mikroskobik yaprak benzeri yapılar oluşturulmuştur.[19] Bunun yanında bütün aromatik amfifiller hidrojel oluşturmamaktadır. Örneğin aynı koşullarda Fmoc-FG hidrojel oluştururken, Fmoc-GF çökelti oluşturmuştur. [72]

Çizelge 2.1.Fmoc dipeptitlerinin fiberleşme özellikleri [47, 50]

Fmoc peptidi	Oluşturduğu fiber kalınlığı	Fiber oluşturduğu pH
Gly- Gly	33±8	<4
Ala- Gly	30±6	<4
Ala- Ala	68±18	<4
Leu- Gly	22±5	<4
Phe- Gly	25±6	<4
Gly- Phe	-	-
Phe- Phe	56±13	<8

Fmoc peptidinin Boc grubuyla olan bileşikleri de hidrojel çalışmalarında kullanılmıştır. Fmoc –VLK(Boc) ve Fmoc-K(Boc)LV bileşiklerinin, lizin yapısı Boc grubu tarafından korunarak yük ve fazladan kısımların varlığından doğabilecek sorunları engellediği için, hidrojel oluşturdukları gözlemlenmiştir.[72]

Uljin ve arkadaşları, yaptıkları çalışmalarda F-moc molekülünün GG; GF; FG ve FF bileşiklerinin kendiliğinden birleşme kapasitelerini karşılaştırmış, pKa geçişlerinin molekülün hidrobisitesine bağlı olduğunu göstermişlerdir. [50] Jelleşme pH'si(geçiş pH'si) Fmoc-GG molekülünde(en düşük hidrofobisite) en düşük, Fmoc-FF de(en yüksek hidrofobisite) en yüksek değerini almıştır.[50]

Ayrıca floresan spektroskopisi ile moleküllerin supramoleküler etkileşimlerine de bakılmış, Fmoc-FF'nin diğer moleküllere göre daha fazla kesişen florenil kısımlara sahip olduğu gösterilmiştir.

Yapılan FTIR deneylerinde, Fmoc'un FG, GF ve GG bileşiklerinde düşük pH'de beta yaprak yapılarının oluşmadığı gözlemlenmiştir. Ancak Fmoc-FF aynı pH'de beta yaprak yapılarına rastlanmıştır. Bu bulgudan yola çıkılarak fenilalanin molekülünün sahip olduğu büyük fenil yan grupların düşük pH'de geniş beta yaprak oluşumunda ve kararlığında önemli bir role sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Fmoc grubuna glisin eklenmesiyle artan esneklik, beta yaprak sert yapılarının oluşumuna izin vermemektedir.

Ancak beta yaprak oluşturmasa da düşük pH'de Fmoc GG, GF, FG bileşiklerinin de geniş kendiliğinden birleşmiş yapılar oluşturmaktadır. Bu durum düşük pH'de gerçekleşmesi kaydıyla, beta yaprak oluşumu ile kendiliğinden düzenlenen yapıların oluşumunun alakalı olmadığını göstermektedir. Yani Fmoc moleküllerinin sahip olduğu florenil kısımlar arasındaki π - π etkileşimleri kendiliğinden birleşme mekanizmasının gerçekleşmesi için yeterlidir. Fakat yüksek pH'de Fmoc GG ve Fmoc GF'nin kendiliğinden birleşmiş yapılar oluşturamamasından da anlaşılacağı üzere, kendiliğinden birleşmiş yapıların oluşması molekülün beta yaprak oluşturma kapasitesine bağlıdır.

Fmoc-FF molekülünden oluşan yapıların iyi tanımlanmış lamelar organizasyonuna diğer Fmoc bileşiklerinde rastlanmamaktadır, bu durum moleküllerin oluşturduğu kendiliğinden düzenlenmiş yapıların farklı kararlılıklara sahip olmaları sonucunu doğurmaktadır. Fmoc FF molekülünün oluşturduğu yapılar birçok fiberin bir araya gelerek lateral birleşmesi sonucu oluşurken; diğer bileşiklerde tekil fiberlerin lateral büyümesi sonucunda oluşmaktadır.[19]

Ayrıca Yang ve arkadaşlarının[73] yaptıkları çalışmalarda Fmoc-Phe jellerinin π - π istiflenmelerinin daha güçlü olduğu ve bunun sonucunda da Fmoc-Leu jellerine göre daha güçlü ve daha esnek yapıda olduklarını gösterilmiştir. Fmoc-FF molekülünün sahip olduğu anti inflammatuar özellikler de göz önünde bulundurularak bu çalışmada Fmoc-FF molekülü tercih edilmiştir.

Fmoc dipeptit çözeltisinin pH'sinin düşmesi sonucu jelleşme gerçekleşmektedir. Bu durum kendiliğinden birleşen yapılar arasındaki organizasyonu arttırarak düzenli

fibriller oluşmasını sağlamaktadır. pH'nin düşürülmesi HCl asit eklenmesi ya da Glukono-delta-Lakton (GdL) ilavesi ile sağlanmaktadır. Ancak HCl eklenerek yapılan çalışmalarda jelasyon sırasında oluşan çözünürlük farkı ya da agregat oluşumu yüzünden heterojen yapılar görülebilmektedir. Bu sorun ısıtılarak çözülmeye çalışılmıştır. Buna karşın, GdL eklenerek yapılan çalışmalarda pH'nin yavaşça düştüğü ve bunun sonucunda daha homojen yapılar oluştuğu gözlemlenmiştir.[19]

GdL'nin çözeltinin pH'sini yavaşça düşürmesinin avantajları aşağıda sıralanmıştır:

- GdL'nin çözünme hızı, hidrolize olma hızından daha fazladır, bu da hidrojelin daha düzgün olmasını sağlamaktadır.
- GdL'nin hidrolize olma hızı olabildiğince düşük olduğundan hidrojelin düzgün birleşmesini sağlamaktadır.

2.4. Doku Mühendisliğinde Üç Boyutlu Hücre Kültürü

Bilindiği üzere hücre kültürü deneyleri şu an biyoloji, tıp, genetik konularında her türlü çalışmanın temelini oluşturmaktadır. Hücre kültürü, hücrelerin büyüme şartları ne kadar gerçeğe yakın olursa o kadar başarılı olmaktadır. Ancak günümüzde kullanılan pek çok hücre kültürü teknikleri 2 boyutta kalmakta, bu da hücrelerin yaşam döngülerinin her aşamasında gereken boyutsal ve zamansal organizasyona olanak vermemektedir. Ayrıca 2D hücre kültürlerinde hücre zarının sadece bir kısmı hücre dışı matriks (ECM) ile temas halinde olup, diğer kısımlar ise boş kültür ortamına maruz kalmaktadır. Bu durum doğal olmayan, polarize integrin bağlanmasını, hücrelerin gereksiz kimyasal aktiviteler içerisine girmesine sebep olmakta ve hücreleri kötü etkilemektedir.[74] Ek olarak 2D yüzeysel bir ortam olduğundan hücre göçünü çok kolay hale getirmektedir, ancak bu normal koşullarda hücreler için bu kadar kolay değildir.

3D hücre kültürünün önemi en fazla kanser araştırmalarında kendini göstermektedir. 1992'de, Peterson ve arkadaşları insan meme epitel hücrelerinin 3D kültür içerisinde normal büyüme davranışı içerisinde bulunduğunu, fakat 2D kültürde tümör oluşumuna gittiğini göstermiştir.[75]

3D ortamların 2D ortamlara göre;

- Farklılaşma
- İlaç metabolizması
- Ekspresyon (Gen, Protein)
- Genel hücre faaliyetleri
- *In vitro* ortama benzerlikleri
- Morfolojileri
- Çoğalma
- Uyarana karşı verdikleri tepkileri
- Canlılık

başlıklarının hepsinde daha başarılı oldukları gösterilmiştir. Bu yüzden bilim adamları 3 boyutlu kültür çalışmalarına geçmenin yollarını aramaktadır.

2.4.1. Doku Mühendisliğinde Hücre Dışı Matrisin Önemi

Doku mühendisliği alanındaki hücre kültürü çalışmalarında asıl hedef çekirdekletmeye teşvik edici çevre yaratmaktır. Bilindiği üzere hücrelerin sağlıklı büyüüp yaşamasında en önemli faktör hücre dışı matristir. Bu yüzden bu alandaki çalışmalarda, laboratuvar ortamında hücre dışı matris taklit edilmeye çalışılmaktadır. Hücre dışı matris hücrelere mekanik destek (fibronectin, kolajen, laminin), direkt hücre bağlanması, proliferasyon, farklılaşma, morfoloji, gen ekspresyonu, göç ve hücreler arası iletişim sağlamaktadır. 3D kültür için tasarlanan doku iskeleleri ECM'in bu özelliklerine sahip olmalıdır.

Bunlara ek olarak önemli olan ECM'ye benzerlik sağlanırken, tasarlanan doku iskelesinin hücrelerin besin ve atık alışverişine elverişli olması gerektir. ECM'yi tam olarak taklit edebilmesi için tasarlanan doku iskelesinin özellikle önemli olarak,

- İntegrin bağlanma bölgesi olmalıdır.
- Büyüme faktörü salımı yapabilecek yapıya sahip olmalıdır.
- Biyomekanik özellikleri ECM'ye benzer olmalıdır.[76]

Bir doku iskelesinin 3D hücre kültüründe kullanılabilmesi için belli şartları sağlaması gerekmektedir:

- Hücre göçüne izin verecek şekilde makro gözenekli yapıya sahip olmalıdır.
- Hücrelerin bağlanabilmesi için mikro gözenekli alanları da olmalıdır.

- Besin alışverişi, doku infiltrasyonu ve damarlanmayı sağlamak için birbirine bağlı porozite yapısında olmalıdır.[77]

Ayrıca tasarlanan doku iskelesi kullanım amacına göre dizayn edilmelidir. İmplant olarak tasarlanmış bir doku iskelesinin üzerindeki hücrelere rehberlik edip, daha sonra bağışıklık yanıtı yaratmaksızın parçalanması beklenir. Buna karşılık 3D *in vitro* model olarak kullanılacak bir doku iskelesinin, ECM'yi iyi taklit etmesi yeterli olacaktır.

2.4.1.1. Üç Boyutlu Hücre Dışı Matriks Çalışmalarına Örnekler

- Mikro gözenekli doku iskeleleri: Bu iskelelerin gözenekleri çok geniştir(100 mikron), bu yüzden hücrelerin daha çok 2D ortamda gibi davranış sergiledikleri gözlenmiştir.
- Nano fibriler doku iskeleleri: Bu gruptaki iskeleler ECM'yi daha iyi taklit etmekle beraber, strese dayanıklı olmadıkları görülmüştür.
- Hidrojel doku iskeleleri: Hem küçük gözeneklere hem de strese karşı daha dayanıklı bir yapı göstermektedirler. Bu doku iskeleleri yüksek miktarda su tutmakta ve hücrelerin oksijen, besin, atık taşınımı gibi temel alışveriş gereksinimlerini yürütebilmektedir. Doğal hidrojeller ECM'yi daha iyi taklit edebilmesi için hücre dışı matriks bileşenlerinden oluşturulmaktadır [78]:
 - Kolajen
 - Fibrin
 - Hyaluronik asit
 - Kitosan
 - Aljinat
 - İpek fibrilleri

Bunlarla beraber,

Poli etilenglikol (PEG), poli vinilalkol(PVA), poli(2-hidroksietil metakrilat), PHEMA gibi doğal kaynaklı olmayan hidrojeller de bulunmaktadır, ancak doğal kaynaklar türevlenerek üretilen doku iskelelerinin (kitosan, vb.) biyo uyumlulukları ve biyo aktiflikleri oldukça yüksek olduğundan daha çok tercih edilmektedir. Ancak bu iskelelerin de bazı dezavantajları bulunmaktadır:

- Kompleks tanımlanmış yapıya sahiplerdir.
- Kullanılan materyalin sıklık uyumlaması zor, oluşturulan doku iskelesinin özelliklerini değiştirmek kolay değildir.

- Kontaminasyon riski yüksektir.
- Çok kolay bozulabilmektedirler. [78]

Yapay olarak tasarlanan ECM'ler hücre büyümesini ve tutunmasını arttırdığı bilindiğinden kolajen, fibronektin, elastin, laminin gibi hücre dışı matriks proteinleriyle desteklenmiştir. Bu proteinlerin varlığı integrinlerin daha kuvvetli bağlanmasını ve doğal olarak hücrelerin ECM'ye daha sağlam tutunmasını sağlamaktadır.[79] Hücre dışı matriks proteinleri gibi, büyüme faktörleri de jele hapsedilebilir. Ayrıca jele spesifik ligandlar bağlanabilmektedir.

3D hücre kültürünün zorlukları:

- Oksijen sağlanması sıkıntısı vardır.
- Ortam 2D'ye göre daha heterojen yapıdadır.
- Büyüme faktörlerinin dağılımı zor olmaktadır.
- Görüntüleme ve karakterizasyonu zordur. [78]

3D hücre kültürü çalışmaları öncelikle kök hücre alanında bilim adamlarının dikkatini çekmiştir. İlk olarak 2006'da Baharvand ve arkadaşları insan embryonik kök hücrelerinin 3D kolajen doku iskelesi içerisinde hepatositlere dönüştüğünü göstermişlerdir[80]. Tanaka ve arkadaşları da fare embriyonik kök hücrelerinde 3D kültür içerisinde kondrojenik başkalaşım sağlamayı başarmışlar [81]. Levenberg ve arkadaşları yaptıkları çalışmada hESC hücrelerin büyüme faktörleriyle desteklendiği takdirde, 3D kültür içerisinde sinir, kıkırdak, karaciğer hücrelerinin karakterlerini gösterdiğini ispatlamıştır.[82]

Bu tip çalışmalar sonucu daha spesifik tasarımlar yapılmaya çalışılmış ancak ne yazık ki stabilite korunamadığından başarılı olamamıştır. Fakat bu çalışmalarda da işe yarayabilirlik ve üretilebilirlik sorunları doğduğundan, araştırmalar peptit türevlerinden hidrojel geliştirilmesi çalışmaları üzerine yoğunlaştırılmıştır.

Peptit iskelelerin avantajları:

- Doku iskelesinin oluşması için çok az miktarda peptit yetmektedir.
- Polimer iskelelerine göre daha küçük alan kaplamaktadır.
- Toksisiteleri oldukça düşüktür.

- Spesifik dizayn yapılabilmektedir.[83]

2.4.1.2. Üç Boyutlu ECM Benzeri Peptit Hidrojeller

Daha önceki çalışmalarda birçok hücre hattının peptit jel yüzeylere tutunup çoğaldığı gösterilmiştir. Ayrıca RADA4 ve EAK4 peptitlerinden oluşturulan hidrojellerin de bağışıklık sistemi cevapları kontrol edilmiş, toksik reaksiyon vermedikleri ispatlanmıştır. [83] Zhang ve arkadaşları Oktapeptitler ve hegzadekapeptitlerden kondrosit, sinir ve endotel hücre kültürlerinde kullanılan hidrojeller geliştirmişlerdir. [84] Ayrıca Stupp ve arkadaşları da oktapeptit ve alifatik uçlarla modifiye edilmiş biyo aktif penta peptitlerden nanofibriler doku iskeleleri geliştirmişlerdir.[45] Fmoc peptit türevleri hidrojel çalışmalarında ilk olarak Xu ve arkadaşları (2003) tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra Ulijn ve arkadaşları (2006) da bu peptitlerin esnek ve kullanılabilir olduğunu ispatlayarak, 2D ve 3D hücre kültürü çalışmalarında kullanmışlardır. Bu çalışmalardan bir süre sonra da Gazit ve arkadaşları benzer başka bir dipeptit türevinden oluşturdukları hidrojelde 2 boyutlu hücre kültürü geliştirmişlerdir.[85]

2.4.1.3. Üç Boyutlu ECM Benzeri Ticari Hidrojeller

Kullanılan ticari matrisler tabloda gösterilmiştir:

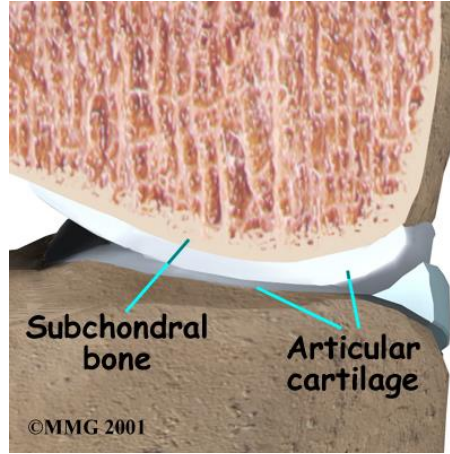
Çizelge 2.2. Kullanılan ticari 3D matrisler [83]

Karakter	h9e	Puramatrix gel (BD Biosciences)	Matrigel (BD Biosciences)	Alginate hydrogel (ALgimatrix)
Materyal	Peptit (19 a.a.)	Peptit (16 a.a.)	EHS fare tümöründen alınan baz membranından geliştirilmiştir.	Polisakkarit
Gözeneklilik	50-200 nm	50-200 nm	50-400 nm	50-200 µm
Çözelti pH'si	Nötr	Asidik pH 3	Değişken (asidik pH'den fizyolojik pH'ye doğru)	Kuru
Jelleşme	Hidrojel direkt olarak hücre kültür ortamında ya da Ca ²⁺ , Na ⁺ iyonları içeren bir solüsyonda karıştırılarak oluşturulabilir.	pH 4.5-5'ten yüksek pH'de jelleşme başlamaktadır.	Jelleşme 10C'den yüksek sıcaklıkta başlamaktadır.	Jelleşme için kalsiyum içeren jel katılaştırma tamponu eklenmelidir.

2.5. Osteokondral Dokuların Anatomisi

2.5.1. Artiküler kıkırdak

Artiküler kıkırdak sinoviyal eklemlerdeki uzun kemiklerin uçlarını kaplayarak, esnekliği ve ağırlığın dağıtılmasını sağlayarak eklem hareketlerinin kolaylaştırıcı yapıdır.[86, 87]



Şekil.2.4. Osteokondral doku [89]

Artiküler kıkırdakta bulunan tek hücre kıkırdak hücresidir. Bu hücreler embriyo gelişimi sırasında mezenkimal kök hücrelerden gelişmiştir, matriksin büyük bir bölümünü oluşturmaktadırlar, toplam doku hacminin %10'unu kaplamaktadırlar.[88] Kıkırdak ECM'si %75 su ve %25 katı matriksten oluşmaktadır. Bu matriks alan %50-73 kolajen, %15-30 proteoglikan ve daha az miktarda glikoproteinden oluşmaktadır. Bulunan kollajenin %90-95'i tip 2 kolajendir, kolajenfiber oluşturarak dokunun hacmi ve şeklinin korunmasını sağlamaktadır.

Kolajen tip IX, X, XI ve VI gibi diğer kolajenler de dokunun yapısına destek olmaktadır. Bir ya da daha fazla glikoazamin(GAG) molekülünün kovalent bağlanmasıyla oluşan proteoglikanlar, kolajen ağ içine gömülmüştür.[88] Ekleme uygulanan aşırı yük, negatif yüklü GAG zincirlerinin suyla temas etmesi sonucu oluşan kompleks yapının yarattığı şişme basıncı sayesinde tolere edilmektedir.

Yapılan daha önceki çalışmalarda, artiküler kıkırdak dokusunun çok düzenli, 4 ayrı alana sahip olduğu görülmüştür. Bu alanlar dış tanjansiyel, orta, derin and kalsifiye alan [90-93] olarak adlandırılmaktadır.

Alanlarda bulunan kondrositler yoğunlukları, morfolojileri, mitotik ve metabolik aktiviteleri açısından farklılıklara sahiptir.[94,95]

Dış tanjansiyel alan (toplam kalınlığın %10-20),artiküler yüzeyde kaygan bir alan oluşturur, uzunlamasına yerleşmiş hücreler ve sıkça yerleştirilmiş kolajen fibriller barındırmaktadır.

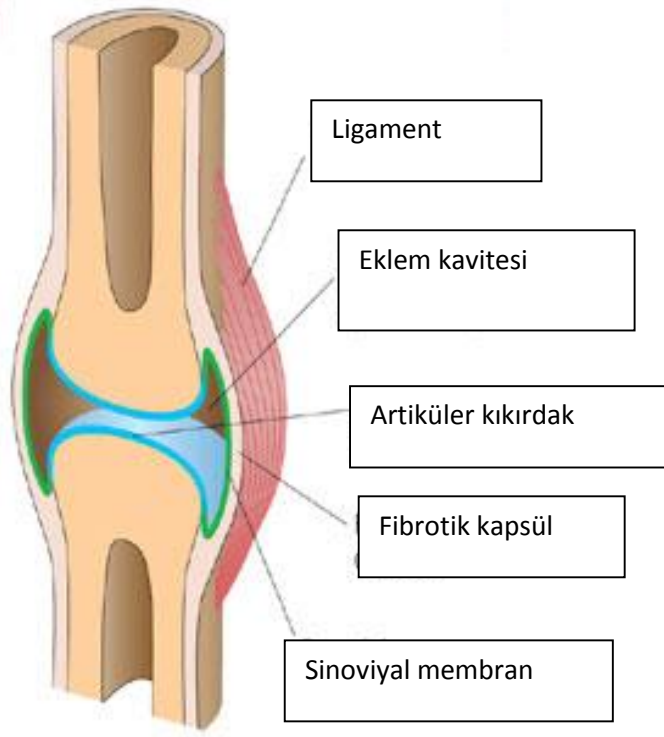
Orta alan (toplam kalınlığın %40-60) daha dağınık sıralanmış, daha geniş kolajen fibriller ve daha yuvarlak kondrositler bulunmaktadır.

Orta alanın tam altında yerleşmiş derin alanda ise elips hipertrofik kondrositler daha kalın kolajen fiberler arasında dağılmıştır.

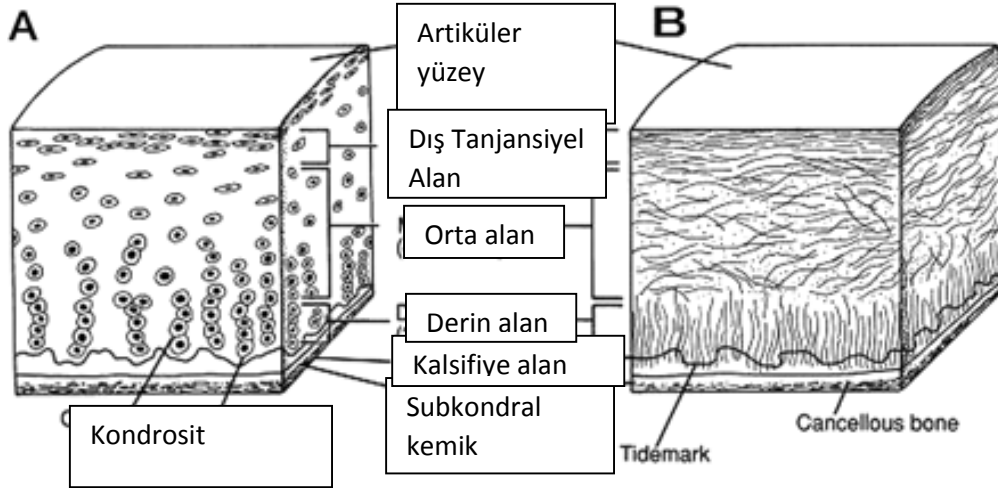
En sonda bulunan kalsifiye alanın ise içerisinde daha küçük kondrositler, kalsiyum tuzları ve kıkırdaktan kemiğe doku geçişini sağlayan zayıf bir damar ağı bulunmaktadır.

Artiküler yüzeyden subkondral kemiğe doğru ilerledikçe, alanlar içerisindeki su miktarında orantılı bir düşüş görülmektedir. Ayrıca kolajen miktarı %86' dan %67' ye düşmekte, proteoglikan içeriği ise dış tanjansiyel alandan orta alana geçerken artmakta, derin alanda tekrar azalmaktadır.[90]

Artiküler kıkırdak çok hücre barındırmaması, kanla beslenmemesi, progenitor hücrelere iletişimi olmaması gibi sebeplerden dolayı kendini tamir etme yeteneği oldukça azdır.[96,97] Kıkırdak kısmında olan kısmi kalınlık hasarlarının kemik iliğindeki progenitor hücrelere erişimi olmadığından hemen iyileşmezler. Buna karşın tam kalınlık hasarları subkondral kemiğe penetre ederek kemik iliğine ulaşır, bu da progenitor hücrelerin infiltrasyonunu sağlayarak iyileşme işlemini başlatır. Ancak iyileşme, artiküler kıkırdak dokusu yerine zamanla dejenerasyona uğrayacak olan hiyalin kıkırdak ya da fibroz kıkırdak dokusu oluşturulmasıyla yapılır. [96,97] Yani son durumda tam iyileşme sağlanamamaktadır.



Şekil.2.5. Osteokondral dokunun ayrıntılı yapısı [98]



Şekil.2.6. Artiküler kıkırdak yapısı [99]

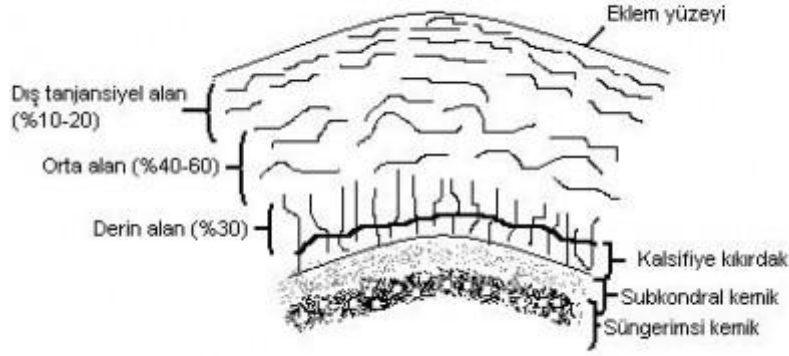
2.6. Osteokondral hasarlar

Bütünleyici ve fonksiyonel kıkırdak onarımı için osteokondral ara yüzeyin yenilenmesi gerekmektedir. Osteokondral ara yüzey kalsifiye edilmiş kıkırdak yüzey, tip 2 ve X kolajen matriks içerisinde gömülü kondrositler ve proteoglikanlardan oluşur. Kıkırdak kemik entegrasyonunu ve fiziksel bariyer olarak görev yaparak artiküler kıkırdağın işlevini yapmasını sağlamaktadır. Bu bariyerin ilerleyen zaman içinde tamir edilen kıkırdağın bütünlüğünü koruması için gerekli olduğu bilinmektedir.[100]

Osteokondral hasarlar en genel haliyle eklem yerlerindeki kıkırdak dokunun zarar görmesi olarak açıklanabilir. En sık diz ve ayak/ bilek eklemlerinde görülmektedir. Bu hasar gereken kıkırdak dokunun kısmen ya da tamamen kopması ya da zedelenmesi, ya da olan bir genetik hata sonucu doğuştan hiç olmaması şeklinde kendini gösterebilir. Osteokondral hasarlar osteokondral kırık, osteokondral alezyon, transkondral kırık, intra artiküler kırık olarak da isimlendirilmektedir.[101]

2.6.1. Osteoartirit

Dejeneratif artirit ya da dejeneratif eklem hastalığı olarak da geçen osteoartirit, eklemlerde bulunan artiküler kıkırdak ve subkondral kemiğin degradasyonu sonucu oluşmaktadır. Son verilere göre İngiltere’de 8 milyon, Amerika’da yaklaşık 27 milyon osteoartirit hastası bulunmaktadır. Semptomları eklem ağrıları, eklemlerde sertlik, hassaslık, efüzyon olarak sayılabilir. Kalıtsal, gelişimsel, metabolik ya da mekanik eksiklikler gibi birçok sebep yüzünden gelişebilir. Ancak asıl sebebinin mekanik stres(kemiklerin yanlış dizilimi, fazla kilo, yaralanma, eklemi destekleyen kasların zayıflaması, periferik sinirlerde zayıflık) ve eklemlerin kendiliğinden iyileşmesinin yetersiz kalmasından dolayı olduğu düşünülmektedir.(8) Hastalık zaman içinde kıkırdak dokusunun iyice yıpranması sonucu kemiğin zarar görmesine sebebiyet verebilir. Bu yüzden tedavisi mutlaka yapılmalıdır. Günümüzde ilaç, fizik tedavi, gerekli durumlarda ameliyat ile tedavi edilmektedir.



Şekil.2.7. Artiküler kıkırdığın 3 boyutlu şeması [102]

Osteoartrit yaşlanma ile alakalıdır, fakat yaşlanma yüzünden geliştiği söylenemez. Yaşlandıkça azalan proteoglikan içeriğinden dolayı kıkırdak dokudaki su oranı azalmaktadır, bu kıkırdığın esnekliğini kaybetmesine sebep olmaktadır. Esnekliğini kaybeden kıkırdak içerisine Gibbs-Donnan etkisi ve kıkırdak proteoglikanlarının yarattığı ozmotik basınç ile daha fazla su alır, ancak bu durum kıkırdığın mekanik özelliklerini bozarak dejenerasyona ve osteoartrite sebep olmaktadır. [103]

2.6.2. Osteokondral Hasarlarda Doku Mühendisliği Yaklaşımları

Kaybolan kıkırdak dokusunu yenilemeye yönelik çalışmalar uzun yıllardır devam etmektedir. Yumuşak dokulara fiziksel ve mekanik benzerliklerinden dolayı hidrojeller bilim adamlarının oldukça dikkat çekmektedir. [104] Örneğin yapılan bir çalışmada, poli(2-akrilamit-2-metilpropanesulfonik asit) ve poli(N,N0-dimetilakrilamit) den oluşan hidrojel osteokondral hasarın olduğu bölgeye yerleştirilmiş ve hiyalin kıkırdak dokusuna benzer özellikler gösteren bir yapının oluştuğu gösterilmiştir. [105] Bununla birlikte geliştirilen MPEG-PLGA/ kondrosit kompozitinin kıkırdak onarımına destek olduğu gösterilmiştir.

Kıkırdak dokusunu onarmak için doku iskeleleri tasarlamak adına biyolojik kökenli ya da sentetik birçok materyal araştırılmaktadır. Kolajen bazlı doku iskeleleri örneğin, tip I Kolajen jel ve tip I, tip 2 II kolajen süngerler, poliglikolik asit ve polilaktik asit, fibrin, aljinat, agaroz, polietilen oksit matrikslerin özellikle kondrosit çoğalması, fenotip ekspresyonu ve ECM üretimine etkileri araştırılmaktadır.[83]

Hidroksiapatit (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) kemik ve dişlerin temel mineral maddesidir. Biyo aktif özelliğinden dolayı çeşitli kemik greftlerinde ya da biyo uyumluluklarını arttırmak amacıyla implantlara kaplama malzemesi olarak da kullanılmaktadır. Osteo iletim özelliği olan HA termodinamik olarak çok kararlı bir yapıdadır. Bu yüzden ev sahibi doku ile bağ oluşturma kapasitesi çok yüksektir. Ayrıca HAp seramiklerinin hiçbir şekilde toksik etkisi bulunmadığı, bağışıklık yanıtı geliştirmedeği ve sert doku ve deri ve kas hücrelerine biyo uyumlu olduğu bilinmektedir.[106,107]

HAp bu özelliklerinden dolayı özellikle kemik doku çalışmalarında kullanılmaktadır. Herhangi bir biyo polimer matrikse eklenen HAP molekülleri mekanik destek sağlamakta ve matriksi kemik dokusu yapısına daha da yaklaştırmaktadır. Bu matriksler PLLA, PGLA gibi sentetik polimerlerden oluşabildiği gibi [108-111], nano hidroksi apatit ile birleştirilmiş doğal polimerler(kolajen, kitosan)[112-115] de olabilir. Eklenen HAP miktarının özellikle hücrelerin ilk yaşam evrelerinde(bağlanma ve çoğalma) daha etkili olduğu görülmüştür.[116] Örneğin, kitosan doku iskelesine eklenen hidroksi apatitin hücre proliferasyonunu ve morfolojisini olumlu yönde etkilediği bilinmektedir. Tang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada[117] hidroksi apatit ve kitosan kompozitlerinin biyo uyumluluklarını ve osteo iletim özelliklerini göstermiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda aljinat içerisine gömülen HA partiküllerinin kondrosit büyümesi, kolajen çökmesi ve hipertrofide olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir.[118] Jayabalan ve arkadaşları[119] da kalsine edilmiş HAp içeren nano kompozitlerin biyo uyumlu ve osteouyumlu olduğunu göstermiştir. Ayrıca Zhang ve arkadaşları tarafından HAP/kitosan nano kompozit nanofiberleri oluşturulmuştur ve başka bir çalışmada [120] oluşturulan kitosan/montmorillonit(MMT)/ HAp nanokompoziti de biyomedikal uygulamalar için umut vadetmektedir.

Osteokondral hasarlar için doku iskelesi tasarlanırken öncelikle hasarlı alanının boyu ve şekli göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca hasarlı bölgedeki hücre tipi, matriks oluşturulurken kullanılacak materyal ve oluşturulan doku iskelesinin fonksiyonelliği, nasıl uygulanacağı ve maliyeti de düşünölmelidir.[121]

Daha önce çalışılan doku iskeleleri:

Çizelge.2.3. Osteokondral hasarların tedavisi için alışılmış olan doku iskeleleri [121]

Kondral bileşen	Subkondral bileşen	Osteokondral gelişim için tasarlanan model sistem
Domuz artiküler kondrositleri	PLA ve kolajen/HA	Silindirik kompozit yapıların in vitro kültürü
Sığır artiküler kondrositleri	Gözenekli kalsiyum fosfat	Silindirik kompozit yapıların in vitro kültürü
Koyun artiküler kondrositleri	Gözenekli kalsiyum fosfat	Silindirik kompozit yapıların in vitro kültürü
PLA doku iskelesi üzerindeki mezenkimal kök hücreler	Osteojenikle indüklenmiş mezenkimal kök hücreler	Kübik kompozit yapıların in vitro kültürü
Agaroz jeli içerisinde sığır artiküler kondrositleri	Sığır trabekular kemiği	Silindirik kompozit yapıların in vitro kültürü
PGA/PLA yüzeyinde sığır artiküler kondrositleri	Doğal/ sentetik kalsiyum karbonat	Silindirik kompozit yapıların biyoreaktör sistemi içerisindeki in vitro kültürü
Jelatin doku iskelesinde kültür edilmiş domuz kondrositleri	Sığır kemiğinden üretilmiş kalsiyum fosfat	Silindirik kompozit yapıların biyoreaktör sistemi

		içerisindeki in vitro kültürü
--	--	-------------------------------

PGA ağı içerisinde kültür edilmiş tavşan artiküler kondrositleri	Kolajen/HA süngeri	Tavşana implante edilen kompozitler
PGA ağı içerisinde sığır artiküler kondrositleri	PLGA/PEG süngeri	Silindirik kompozit yapıların osteojenik ortam içerisindeki in vitro kültürü
Hyaluronik asit süngerine ekilmiş fare mezenkimal kök hücreleri	Mezenkimal kök hücre ekilmiş kalsiyum fosfat seramiği	Fareye implante edilen kompozitler

PLGA/TCP iskelesi	Gözenekli heterojen doku iskelesi	Silindirik kompozit yapıların in vitro kültürü
HA içerisine ekilmiş insan fibroblast hücreleri	PLA/ kompozit doku iskelesi	Fareye implante edilmiş silindirik kompozitler
PLGA doku iskelesi	Homojen/ heterojen doku iskelesi	Keçilere implante edilmiş silindirik kompozitler
PCL doku iskelesi içerisinde kültür	Homojen PCL doku iskelesi	Kompozit yapıların in vitro kültürü

edilmiş mezenkimal kök hücreler		
PEG hidrojeline gömülmüş mezenkimal kök hücreler	Hidrojel çözeltileri	Farelere implante edilmiş osteokondral kompozitler
HA kaplanmış polietilen fiber doku iskelesi	Homojen doku iskelesi	Tavşanlara implante edilmiş doku iskeleleri

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Fmoc-FF Hidrojellerinin Hazırlanması

40 mg tartılan Fmoc-FF dipeptidi (Bachem, Almanya) 3ml saf su ve 0.1M 1 ml NaOH çözeltisi içerisinde çözülmüştür ve yaklaşık 0.02 M konsantrasyona sahip çözelti elde edilmiştir. Çözünme işlemi için solüsyon çalkamalı su banyosunda 40°C sıcaklıkta, 125 karıştırma hızında 1 saat bekletilmiştir. Çözünmeyen Fmoc-FF dipeptidi filtre kâğıdıyla uzaklaştırılmıştır. Daha sonra çözeltiye 1ml'lik alikotlar halinde 4 mg (0.006 mmol) Glukono-d-lakton eklenmiştir. 10 saniye yapılan vorteks işleminden sonra 24 saat oda sıcaklığında beklemeye bırakılmıştır.

3.2 Fmoc-FF/HA'nın Hücre Kültürü Ortamında Jelleştirilmesi

40 mg tartılan Fmoc-FF dipeptidi, 0.1M 1 ml NaOH eklenmiş 4ml DMEM solüsyonu içerisinde çözülmüştür. Çözünme işlemi çalkamalı su banyosunda 40°C sıcaklıkta, 125 karıştırılma hızında, 1 saat bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Daha sonra çözelti 1 ml'lik alikotlara ayrılmıştır. Deney her tekrarlandığında alikotlardan üç tanesine 5 mg, 10 mg, 20 mg miktarlarında HA eklenmiş, bir örnek de HA eklenmeden bırakılmıştır. Bu işlemler vorteksenerek yapılmıştır. HA eklenmesinden sonra 4 mg GdL yine vorteksenerek eklenmiş, solüsyon sonrasında 24 saat inkübatörde bekletilmiştir.

3.3. Kondrosit Hücrelerinin Fmoc-FF Jelinde Enkapsülasyonu

Tasarlanan deney planına göre, HA'sız, 5mg HA içeren, 10mg HA içeren, 20 mg HA içeren 4 farklı örnek için 4 ml'lik stok Fmoc-FF solüsyonu yukarıda belirtilen metotla hazırlanmıştır. Sonrasında stok 1 ml'lik 4 tüp halinde bölünerek, tüplere sırasıyla 5, 10, 20 mg HA vorteksenerek eklenmiş, bir tanesi de HA içermeyen örnek olarak bırakılmıştır. HA eklenmesinden sonra; 7 gün flask içinde kültür edilmiş kondrositler, her tüpte 1×10^6 hücre olacak şekilde ılımlı karıştırılarak eklenmiştir. En son olarak her tüpe 4 mg GdL eklenmiş, well platede her well'de 1×10^5 hücre olacak şekilde bölündükten sonra jelleşmeye bırakılmıştır. Jelleşmeden sonra well'lere 150 µl besi yeri eklenmiş, kondrositler 5 gün jel içerisinde kültür edilmiştir.

3.4. Nanohidroksiapatit Sentezi

Distile suyun içerisinde 0.25M fosforik asit(H_3PO_4)(PA) solüsyonu hazırlanmıştır. Sonrasında amonyak eklenmiş, pH 10'da sabitleninceye kadar karıştırılmıştır. Double distile suda hazırlanmış olan 1M'lik kalsiyum nitrat tetrahidrat(CNT) çözeltisi PA-amonyak çözeltisine yavaşça eklenmiştir. Ayrıca gerekli durumlarda yine amonyak eklenerek çözeltinin pH' si 10'da sabit tutulmuştur. Çözelti 1 saat karıştırılmış ve 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir Bunun sonucunda elde edilen jel, 65°C'ye ısıtılmış fırında 24 saat kurutulmuştur. Kuruyan jelin tozları NH_4 ve NO_3 'ten kurtulmak amacıyla defalarca yıkanmıştır. Yıkanan tozlar daha sonra 200-800 °C arasında değişen sıcaklıklarla 30 dakika kalsine edilmiştir. [122]

3.5. Kondrosit Kültürü

Sığır kıkırdağından alınıp dondurulmuş olan primer kondrosit hücreleri %89 DMEM, %10 FBS ve %1 streptomisin içeren besi yerinde 7 gün kültür edilmiştir. Hücreler çoğalmaları için 2.gün pasajlanmış, 5.gün besi yerleri değiştirilmiştir.

3.5.1. Kondrosit Hücrelerinin Açılması

Dondurulmuş olan kondrosit hücreleri falkon tüpe alınmıştır. 2500 devirde 2 dakika santrifüj edildikten sonra her bir flask için 3 ml besi yeri eklenerek 6 flask'a ayrılmıştır.

3.5.2. Kondrosit Hücrelerinin Çoğaltılması

6 flask'a aktarılmış olan hücreler 2.gün 0,5ml tripsin EDTA ile kaldırılmış, toplam flask sayısı 10'a çıkarılmıştır. 5.günde besi yerleri değiştirilmiş, 7.gün tekrar besi yerleri değiştirilerek dondurulmuştur.

3.6. Hücre Kültür Deneylerinin Değerlendirilmesi

3.6.1. İkili boyama(Double Staining) çalışmaları

3.6.1.1.Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

Ribonükleaz A'dan 1mL PBS'de 10 mg RNA olacak şekilde, Hoechst ise 1 mL PBS'de 200 mikrogram olacak şekilde hazırlanmıştır. Propidium Iodide 1mL PBS'de 100 mikrogram olacak şekilde hazırlanmıştır. Solüsyonlar kullanılana kadar – 20

°C'de saklanmıştır. 10 mL PBS içine RNAaz stoktan 100 mikrolitre, Hoechst stoktan 500 mikrolitre Propidium Iodide stoktan 100 mikrolitre ilave edilerek hazırlanmıştır.

3.6.1.2.İkili Boyama Metodu İle Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi

İkili boyama metodu çekirdeği boyamakta ve bu sayede apoptozu ve nekrozu göstermektedir. Ribonükleaz A kullanılmaktadır. – 20 °C'de saklanır (Sigma R-500). Ribonükleaz A RNA'yı boyamaz ve bu sayede sitoplazmik RNA'yı yok eder. Hoechst ise +4 °C'de saklanır (33342) ve apoptotik hücreleri boyar. Bu sayede gerçek apoptotik hücreler belirlenir. Propidium Iodide +4 °C'de saklanmakta ve DNA'yı ve RNA'yı boyamaktadır. Kırmızıya boyayarak sekonder nekrozu gösterir. İkili boyama için 48 well plate kullanılmıştır. Hücre sayımından sonra canlı hücre sayısına göre her well'de 20×10^3 hücre olacak şekilde hesaplama yapılmıştır. 48 well plate'de her kuyucuğa 200µl hücre koyulmuş ve 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.24 saat sonunda hücrelerin well plate yüzeyine tutunup tutunmadığı kontrol edilerek kuyucuklardaki medyum boşaltılmıştır. İlk kuyucuklar boş kalacak şekilde diğer kuyucuklara 100er µl medyum koyulmuştur. 1mg/ml'lik karışımlardan 6.25 ila 200 µg/ml konsantrasyonlarda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Kontrol grubuna sadece medyum eklenmiştir. 48 saat inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki medyum boşaltılarak her kuyucuğa 70 µl ikili çalışma solüsyonu(double staining çalışma solüsyonu)eklenmiştir. 48 well plate hiç ışık görmeyecek şekilde kapatılıp 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin ve FITC (480-520nm dalga boyunda) kullanılarak nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır.

3.6.2. Hematoksilen/Eozin Boyamaları

Hematoksilen alkali pH'da bir boya maddesi olup hücre çekirdeğini ve kalsiyum çöküntülerini kırmızıya boyamaktadır. Eozin ise sitoplazma, protein birikimi gibi yapıları pembeye boyamaktadır. Deneye başlanmadan hemotoksilen ve eozin boyaları 1:10 oranında seyreltilmiştir. Lamın üzerine alınan hücreler öncelikle soğuk asetonla sabitlenmiştir. Sonrasında sırasıyla %96 etanol, %80 etanol ve %70 etanolla yıkanmıştır. Daha sonra hematoksilen ve eozin boylarıyla boyanan hücreler, saf suyla yıkanarak aşırı boyadan arındırılmıştır. Son olarak tekrar soğuk asetonla sabitlendikten sonra floresan ataçmanlı ışık mikroskobu(Leica DM5000 B) altında görüntülenmiştir.

3.6.3. Toluidine Blue boyamaları

Bu boya sülfat gruplarını mavi renge boyamaktadır. Kondrositlerin GAG sentezini ayırt etmek için kullanılmıştır. GAG sentezleyebilen hücrelerin sitoplazmalarının etrafında daha koyu mavi renkte çember oluşması beklenmektedir. Hematoksilen/eozin boyamasındaki gibi olduğu gibi hücreler ilk olarak soğuk asetonla sabitlendikten sonra sırasıyla %96 etanol, %80 etanol ve %70 etanolle yıkanmıştır. Daha sonra toluidine blue boyasıyla boyanan hücreler, saf suyla yıkanarak aşırı boyadan arındırılmıştır. Tekrar soğuk aseton sabitlenmesi yapılmadan, floresan ataçmanlı ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir. Görüntüleme sırasında istatistiksel çalışma olarak skorlama yapılmış, her örnekten 200-300 hücre sayılmıştır.

3.6.4. Toksikite deneyleri

Toksikite deneyi için WST kiti(Roche, Almanya) kullanılmıştır. Hücre sayımından sonra canlı hücre sayısına göre her well'de 20×10^3 hücre olacak şekilde hesaplama yapılmıştır. 48 well plate'de her kuyucuğa 200µl hücre koyularak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda hücrelerin well plate yüzeyine tutunup tutunmadığı kontrol edilmiştir. İnkübasyon sonunda well platelerdeki medyum boşaltılmış, Fenol red içermeyen DMEM kullanılarak hazırlanan DMEM/F-12 medyundan 200 µl kuyucuklara koyularak, üzerine 10 µl WST-1 çözeltisi ilave edilmiştir. 37 °C'de 4 saat inkübe edildikten sonra hücre yaşayabilirliğinin tespiti için 48 kuyucuklu plate'in absorbans yoğunluk değerleri ELİSA plate kuyucuda 420-480 nm'de okunmuştur. WST-1 toksikite testinde yaşayan hücreler sarı renk oluştururken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmemektedir.

3.7. Alkalin Fosfataz Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Alkalin fosfataz (ALP) aktiviteleri Sensolyte, Anaspec (ABD) firmasından temin edilen kit ile tayin edilmiştir. Analiz öncesinde dondurulup, ısıtılarak membranları parçalanmış hücre-jel karışımlarına 300 µl liziz ortamı (0,5% v/v Triton X-100, 50 mM Tris (pH 7,6) ve 1 mM MgCl₂) eklenmiştir. Eppendorf tüplere alınan lizatlar 10000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatandan alınan 50 µl'lik miktar 50 p-nitrofenil fosfat reaktifıyla 96 kuyucuklu kaplarda etkileştirilmiştir. Karanlıkta ve 37 °C'de 30 dakikalık

bekleme sonucunda örnekler 405 nm dalga boyunda analiz edilmiş ve elde edilen absorbanlar kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklem yardımıyla ng/ml birimine çevrilmiştir.

3.8. Jellerin Reolojik karakterizasyonu

Reolojik ölçümler Thermo-Haake (MARS)(Modular Advanced Rheometer System) reometre cihazı ve koni-plaka geometrisi (34 mm çap, 4°) kullanılarak 25°C'de, denge şişme seviyesine ulaşmış jellerle gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMALAR

4.1.Fmoc-FF-OH hidrojelinin karakterizasyonu

Fmoc-FF dipeptidinin farklı konsantrasyonları ve değişen miktarlarda GdL kullanılmasıyla oluşturulan jel yapıları Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Fmoc-FF-OH hidrojelinin konsantrasyon ve GdL miktarı optimizasyonu

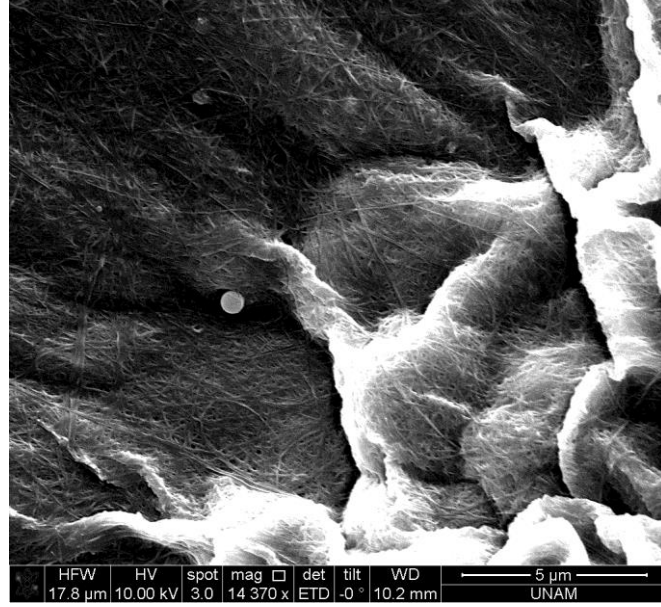
	2mg GdL	3mg GdL	4mg GdL	5mg GdL	10mg GdL
20mg Fmoc	Jel olmadı.	Jel olmadı.	Jel olmadı.	Jel olmadı.	Parçalı jel
30mg Fmoc	Jel olmadı.	Jel, kararlı değil.	Jel, kararlı değil.	Jel, kararlı.	Parçalı jel
40mg Fmoc	Jel olmadı.	Jel, kararlı.	Jel, kararlı.	Jel, kararlı.	Parçalı jel
45mg Fmoc	Jel olmadı.	Jel, kararlı.	Jel, kararlı.	Jel, kararlı.	Parçalı jel
50mg Fmoc	Jel olmadı.	Jel, kararlı.	Jel, kararlı.	Parçalı jel	Parçalı jel
60mg Fmoc	Jel olmadı.	Jel olmadı.	Jel olmadı.	Parçalı jel	Parçalı jel

Yapılan optimizasyon çalışması sonucu, en uygun hidrojel için 40 mg Fmoc-FF ve 4mg GdL kullanılarak yapılmış olduğu sonucuna varılmıştır. 3mg'dan fazla kullanılan GdL pH'yi gerekenden fazla ve istenenden hızlı bir şekilde düşürmüştür, bu da jelin oluşup parçalanmasına ya da jelin en başından oluşmasına engel olmuştur denebilir. 3mg'den az eklenen GdL miktarı ise pH'yi istenilen kadar düşürmediğinden jel oluşmamıştır. Genel itibariyle 3mg GdL ve 4mg GdL miktarlarının pH'ye etkisi aynı olmakla beraber, deneyler sırasında 4mg GdL eklenerek yapılan jellerin 3mg 'ye göre daha homojen jeller oluşturduğu gözlemlendiğinden 4mg GdL kullanılarak yapılan hidrojel tercih edilmiştir.

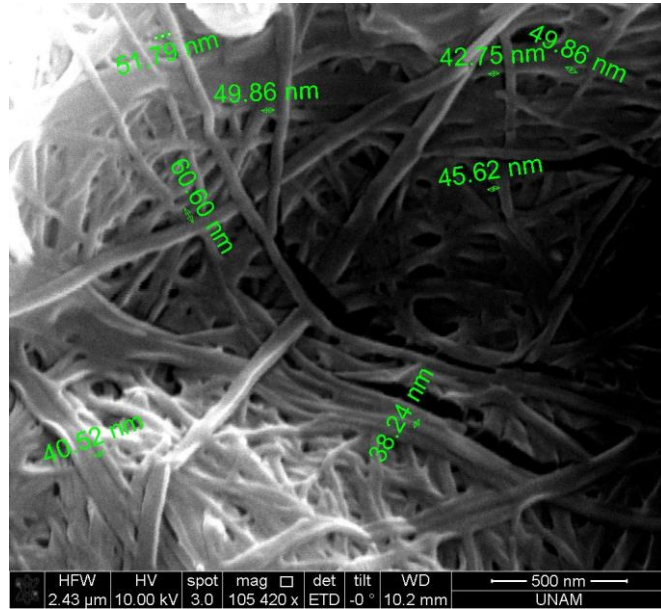
Farklı konsantrasyonlarda ise, GdL miktarı değişmediği sürece, SEM fotoğraflarından da anlaşılacağı üzere fazla bir fark görülmemektedir. Yalnızca konsantrasyon arttıkça fiber yoğunluğunun arttığı yorumu yapılabilir. Hidrojel

içerisinde hücre kültürü uygulaması yapılacağı göz önünde bulundurularak 40 mg konsantrasyonda karar kılınmıştır.

30 mg çözülerek, 4 mg GdL eklenerek hazırlanan Fmoc-FF hidrojelinin SEM görüntüleri:

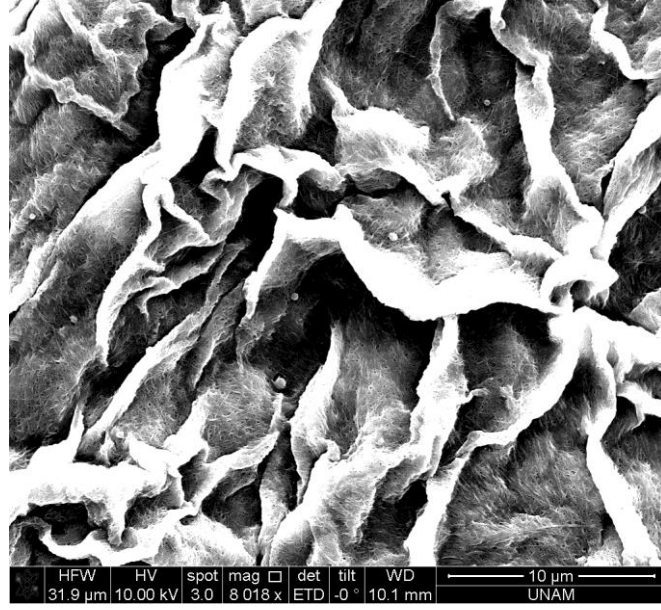


Şekil.4.1. 30 mg Fmoc-FF hidrojelinin SEM görüntüsü (1)

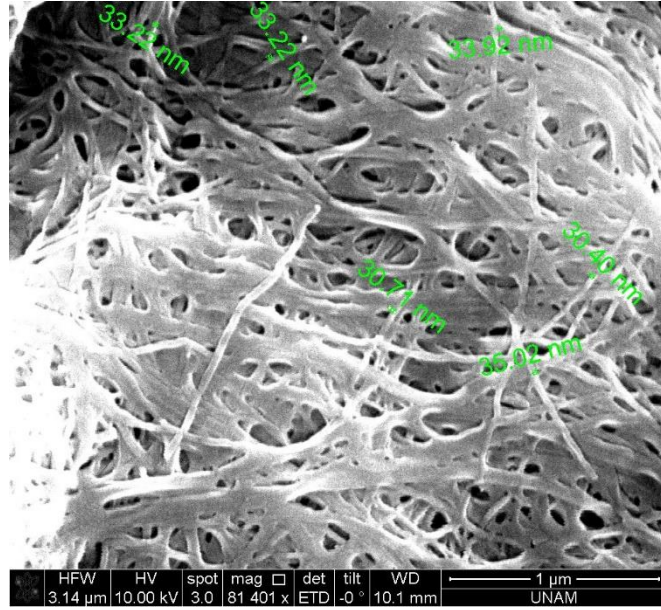


Şekil 4.2. 30 mg Fmoc-FF hidrojelinin SEM görüntüsü (2)

40 mg Fmoc-FF çözümlere ve 4 mg GdL eklenerek hazırlanan hidrojel SEM görüntüleri:

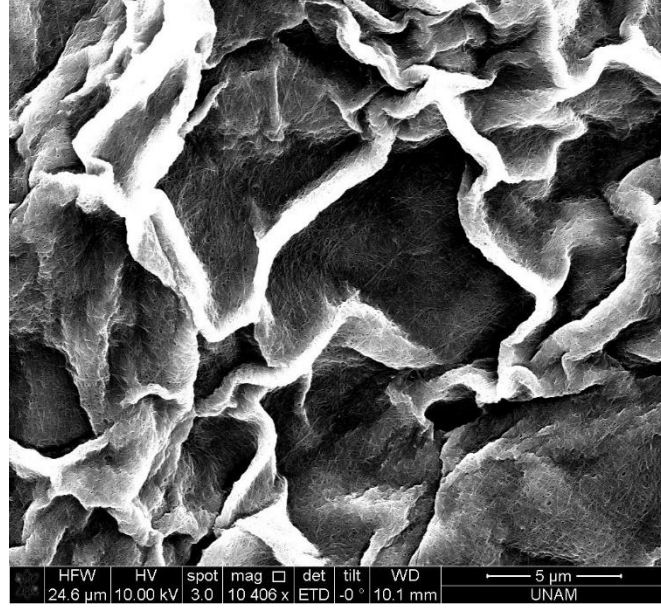


Şekil 4.3. 40 mg Fmoc-FF hidrojelinin SEM görüntüsü(1)

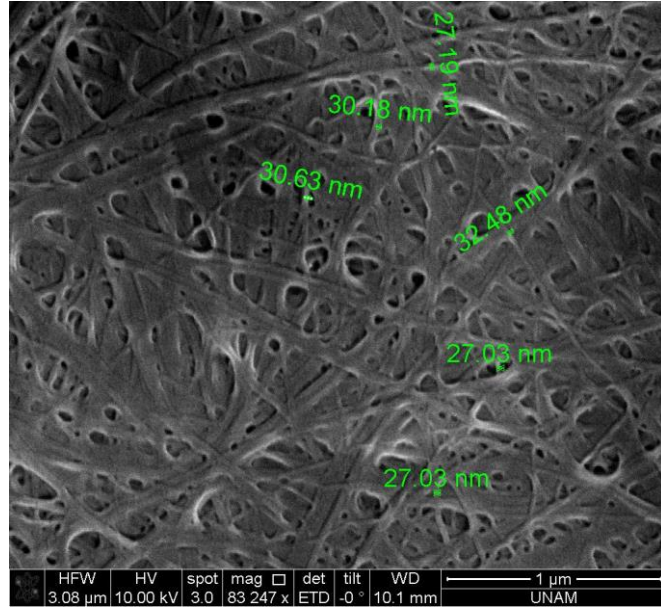


Şekil 4.4. 40 mg Fmoc-FF hidrojelinin SEM görüntüsü

50 mg Fmoc-FF çözümlenerek ve 4 mg GdL eklenerek hazırlanan hidrojel SEM görüntüleri:



Şekil 4.5. 50 mg Fmoc-FF hidrojelinin SEM görüntüsü(1)



Şekil 4.6. 50 mg Fmoc-FF hidrojelinin SEM görüntüsü(2)

Ayrıca GdL miktarlarının zamana bağlı pH değişimine etkisi de kontrol edilmiştir.

Çizelge 4.2. GdL miktarının pH üzerindeki zamana bağlı etkisi:

Süre(dakika)	2mg GdL	3mg GdL	4mg GdL	5mg GdL
1	pH: 9.55	pH: 9.20	pH: 8.94	pH: 7.95
2,5	pH: 9.36	pH: 8.55	pH: 8.50	pH: 7.78
5	pH: 9.18	pH: 8.33	pH: 8.20	pH: 7.63
10	pH: 8.43	pH: 8.20	pH: 8.06	pH: 7.50
20	pH: 8.12	pH: 8.04	pH: 7.98	pH: 7.32
30	pH: 8.04	pH: 7.93	pH: 7.84	pH: ölçüm yapılamadı.
45	pH: 8.08	pH: ölçüm yapılamadı.	pH: ölçüm yapılamadı.	pH: ölçüm yapılamadı.

Çizelge 4.2.'den de anlaşıldığı üzere 2mg GdL miktarı pH'yi düşürmeye yetmemiş, 5mg GdL miktarı ise istenilenden fazla düşürerek kristalizasyona sebep olmuştur. Ölçüm yapılamadı verileri jelleşmenin başladığını göstermektedir. Görüldüğü üzere 3mg ve 4mg jelleşme için uygun pH'yi sağlamıştır. Ancak 4mg GdL miktarının fizyolojik pH'ye daha erken ulaştırması göz önünde bulundurularak deneylerde 4mg GdL miktarının kullanılmasına karar verilmiştir.

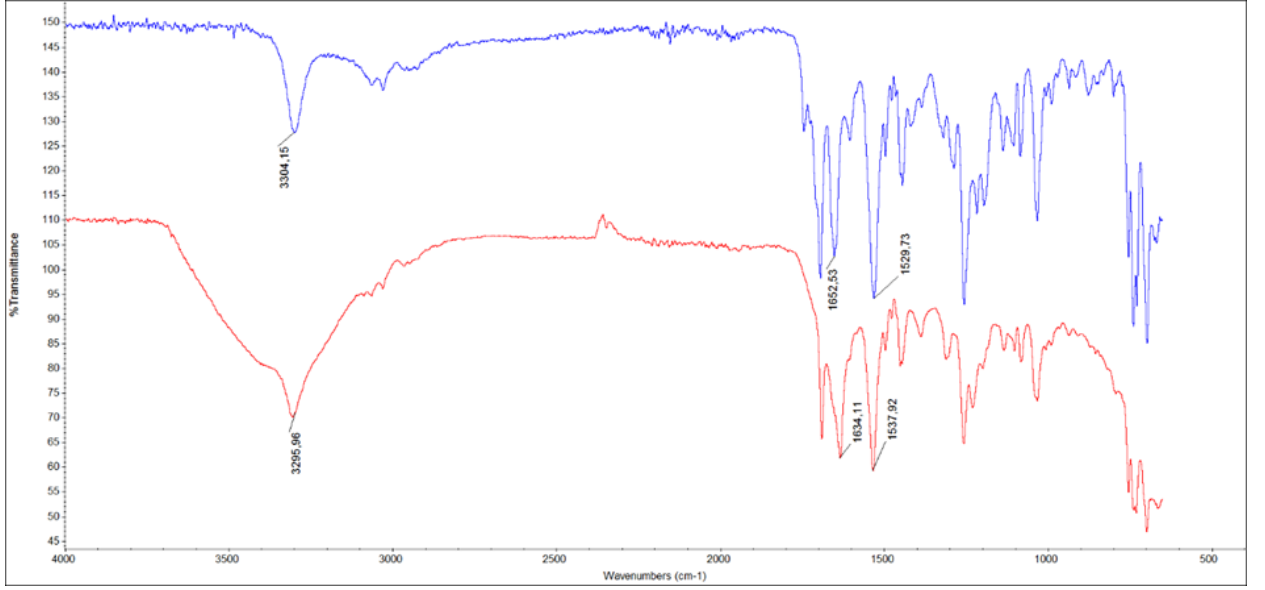
Fmoc-FF konsantrasyonlarında ise, çizelgede görüldüğü üzere, 20mg ve 60mg Fmoc-FF dipeptit miktarları jel oluşturamamıştır. 20mg Fmoc-FF beta yaprak yapısı oluşturarak jelleşmeye yetmezken, 60mg Fmoc-FF miktarı ise hidrojel oluşumu için çok fazla gelmiş, jelden çok agregat oluşumuna sebebiyet vermiştir. Yapılan deneyler ve SEM fotoğraflarının değerlendirilmesi sonucu 40mg kullanılan Fmoc-FF dipeptidinin oluşturduğu jelin en optimal özellikte olduğu sonucuna varılmıştır.



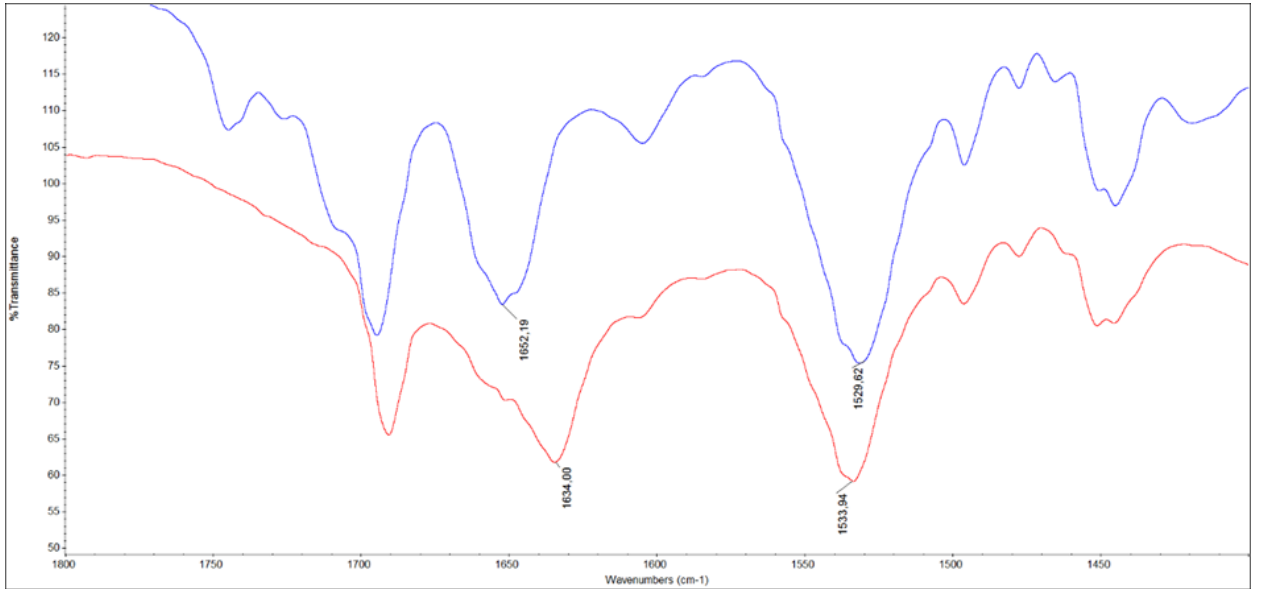
Şekil 4.7. 40 mg Fmoc-FF ve 4 mg GdL kullanılarak yapılan hidrojin fotoğrafı

Sulu ortamdaki jelleşmiş bileşenlerin moleküller arası etkileşimlerinin anlaşılması için jelleşme öncesi ve sonrası FTIR spektrumları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Jelleşme öncesi (i) ve sonrası (ii) Fmoc-Phe-Phe-OH moleküllerinin spektrumları aşağıda verilmiştir. Buna göre jelleşmenin varlığına dair kanıt sunan 3 ana pik hakkında bazı yorumlar yapılabilir. Bu pikler 3310-3290 cm^{-1} dolaylarındaki N-H gerilme (amit A) ; 1650-1630 cm^{-1} arası $>\text{C}=\text{O}$ gerilmesi (amit I) ve 1530 – 1540 cm^{-1} arası N-H eğilmesi (amit II) olarak tanımlanabilir.

Jel oluşumundan sonra amit A pikinin 3304 cm^{-1} 'den 3295 cm^{-1} 'e ; amit I'in 1652 cm^{-1} 'den 1634 cm^{-1} ' e ve amit II pikinin de 1529 cm^{-1} 'den 1537 cm^{-1} 'e kayması hidrojel oluşumunun bir göstergesidir (şekil 4.8) [48]. İlk iki banttaki (amit A ve amit I) kırmızıya kayma ve amit II bandındaki maviye kayma yapıda hidrojen bağı sonucu bir yapılanma olduğunun göstergesidir. Amit I ve amit II bantlarındaki bu kaymaların bir diğer açıklaması da yapıda meydana gelen β -tabakalarının oluşumudur (şekil 4.9.).



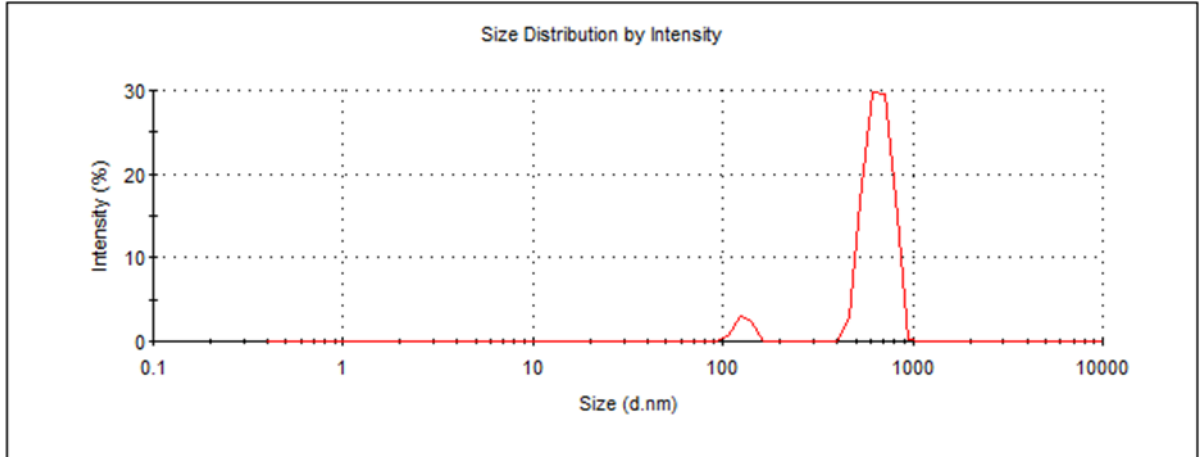
Şekil 4.8 Fmoc-FF ve nanoHA katkılı Fmoc-FF hidrojenlerin FTIR spektrumu.



Şekil 4.9. Fmoc-FF ve nanoHA katkılı Fmoc-FF hidrojenlerin 1200-2000 cm⁻¹ arası FTIR spektrumu

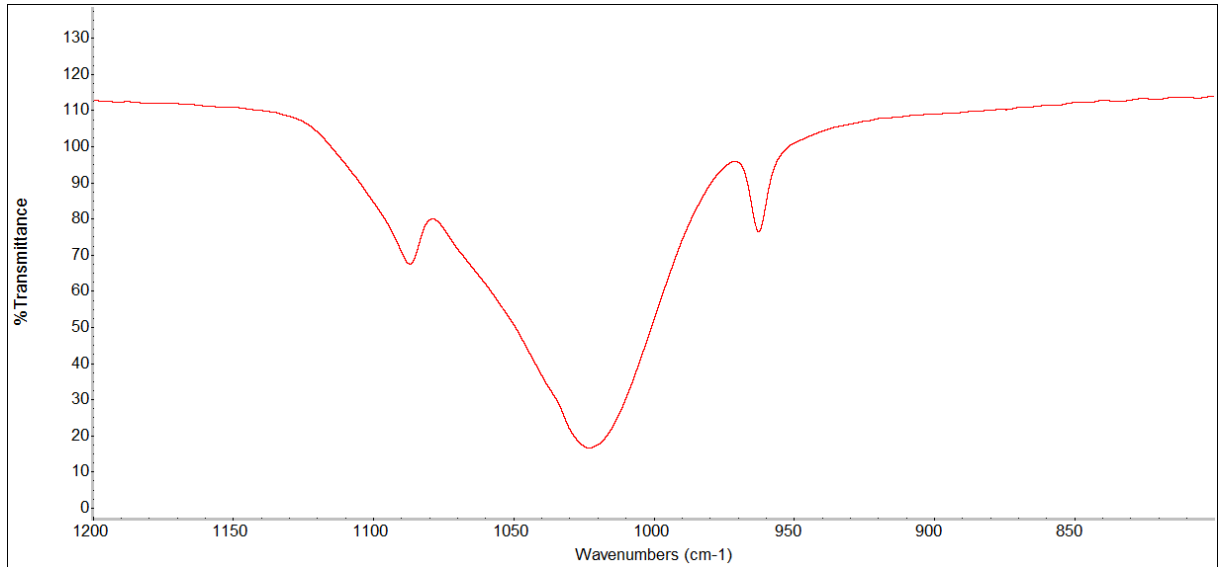
4.2.NanoHA karakterizasyonu

Oluşturulan hidroksiapatitlerin Zeta sizer cihazında boyutları kontrol edilmiştir.



Şekil 4.10. nanoHA'ların zeta sizer karakterizasyonu

Şekil 4.10'daki grafikte görüldüğü gibi üretilen nanoHA 2 pik vermiştir. Yaklaşık boyutları 100-120nm olmakla birlikte, görülen daha yüksek piklerin agregasyon sonucu geliştiği düşünülmektedir.



Şekil 4.11 Sentezlenen hidroksiapatit tozunun FTIR spektrumu

Spektrumda P-O (gerilme ve eğilme) bandı belirgin biçimde gözlenmiştir. 1100 – 1100 – 950 cm-1 aralığında gözlenen pikler PO₄³⁻ gruplarına ait P-O eğilme frekanslarından kaynaklanmaktadır.

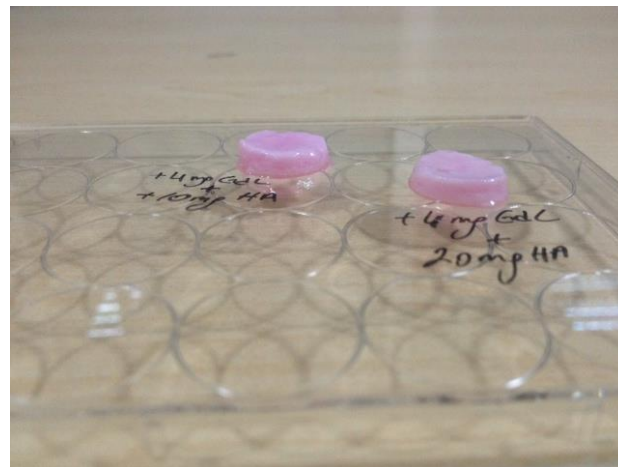
4.3.NanoHA katkılı Fmoc-FF-OH jellerin karakterizasyonu

Yapılmış olan optimizasyon sonucu 40 mg Fmoc-FF-OH çözünmesi ve 4 mg GdL ile pH'nin düşürülmesiyle oluşan hidrojelün en kararlı yapıda olduğu görülmüştür. Aynı formül Fmoc-FF dipeptidinin DMEM hücre besiyeri ortamında çözünmesiyle denenmiştir. Oluşturulan jelün fotoğrafları aşağıda görülmektedir.



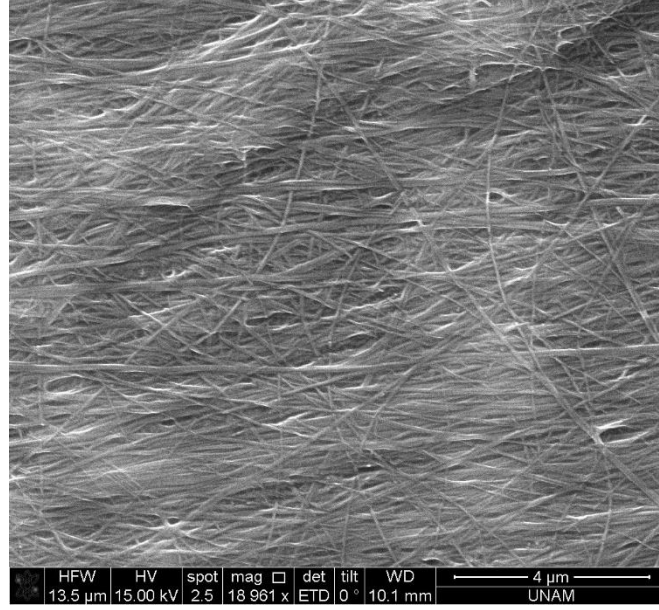
Şekil 4.12. Fmoc-FF/ besiyeri hidrojelünün fotoğrafı

Bir sonraki aşamada denenilen, 5 mg, 10 mg ve 20 mg HA eklenmesiyle oluşturulan jeller de başarılı olmuştur.

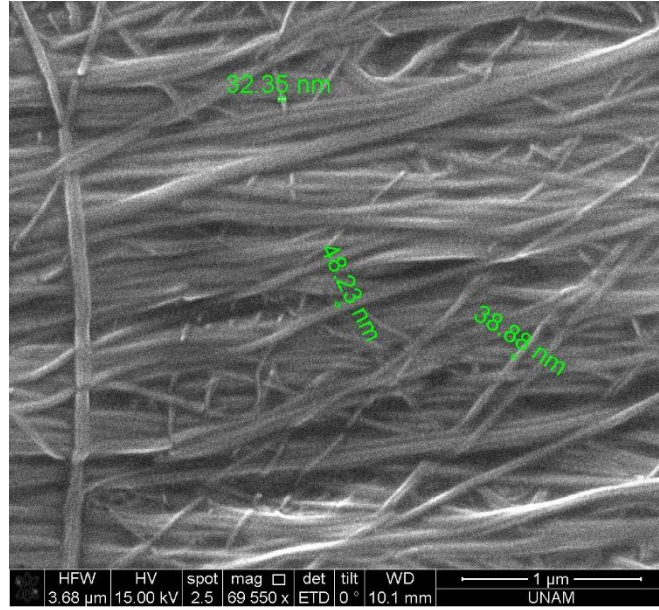


Şekil 4.13. HA eklenmiş Fmoc-FF/ besiyeri hidrojelünün fotoğrafı

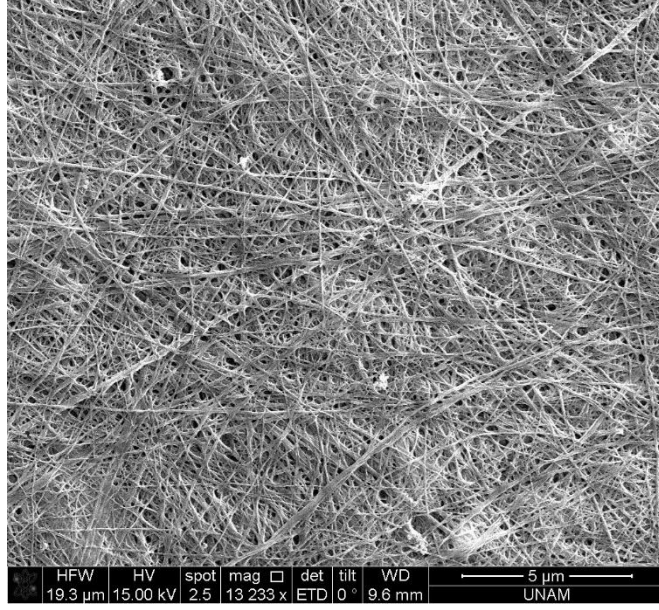
Bu jellerin SEM fotoğrafları aşağıda gösterilmiştir.



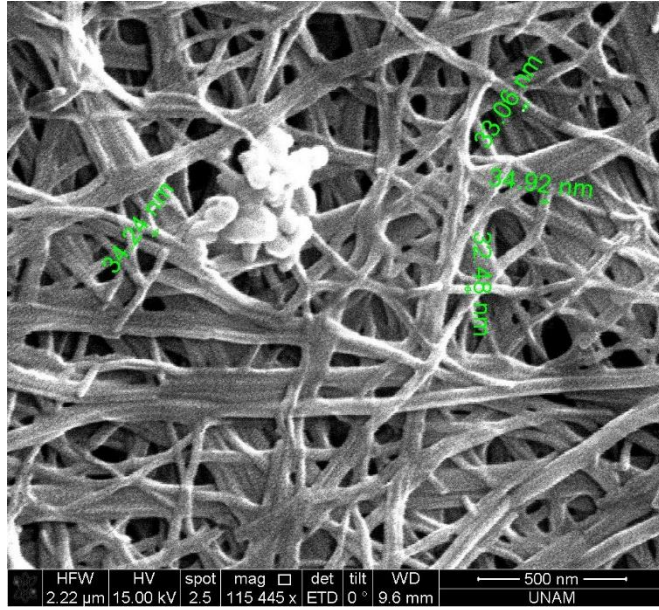
Şekil 4.14. HA eklenmemiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin SEM görüntüsü(1)



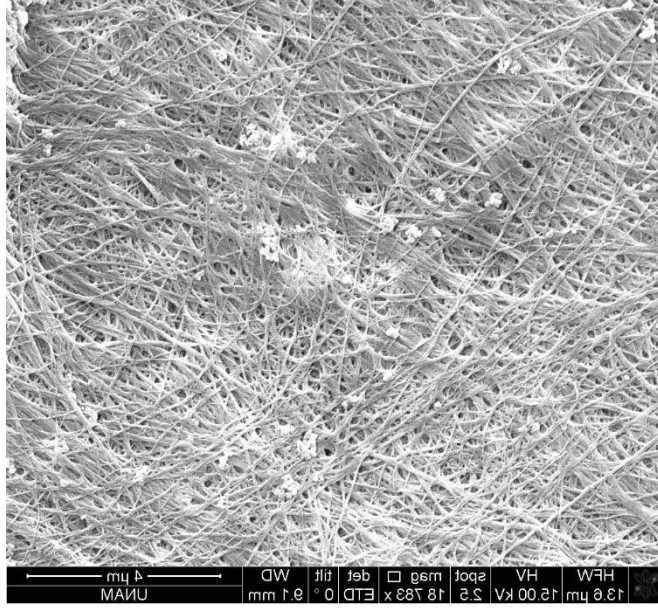
Şekil 4.15. HA eklenmemiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin SEM görüntüsü(2)



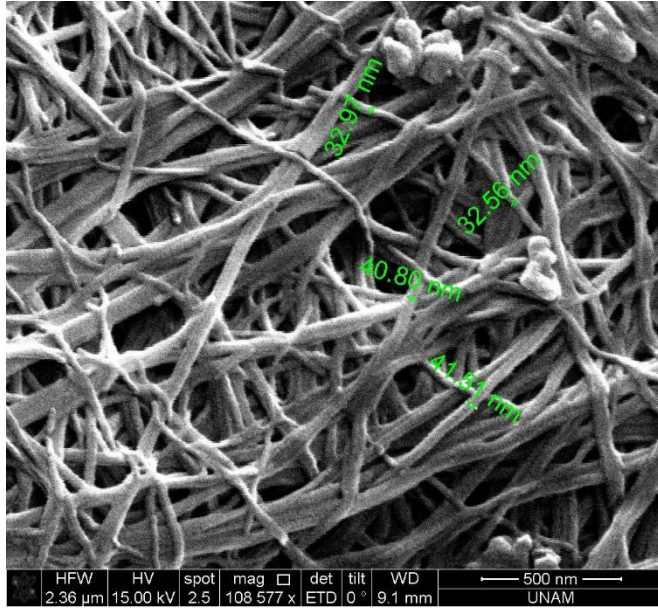
Şekil 4.16. 5 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin SEM görüntüsü(1)



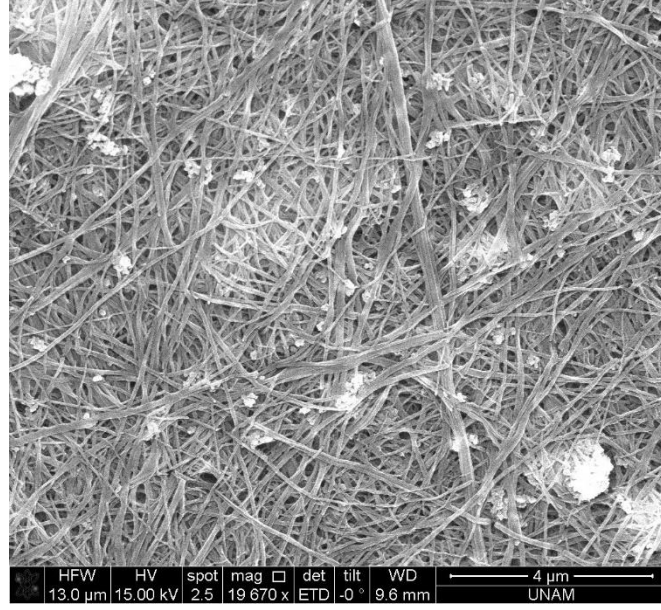
Şekil 4.17. 5 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin SEM görüntüsü(2)



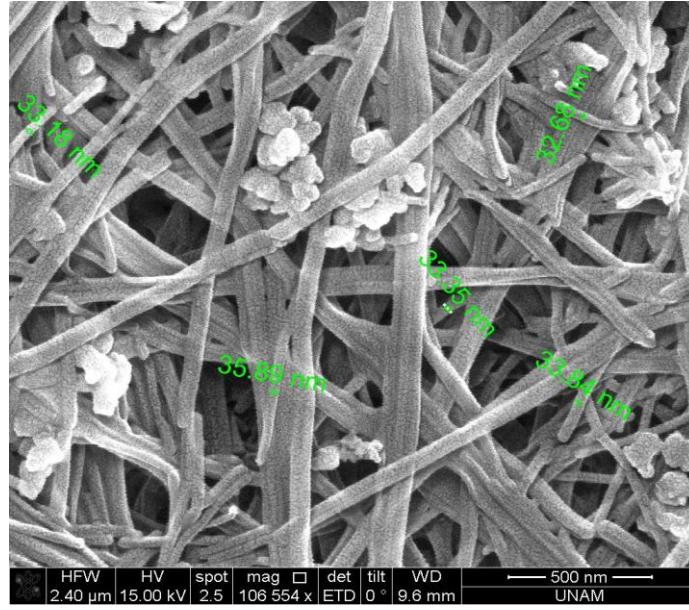
Şekil 4.18. 10 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin SEM görüntüsü(1)



Şekil 4.19. 10 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelinin SEM görüntüsü(2)



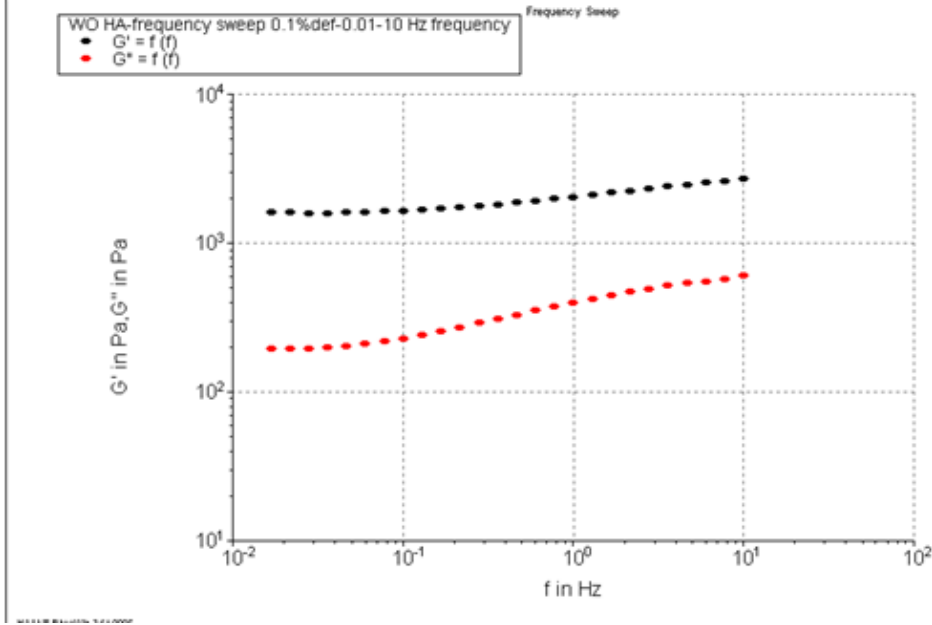
Şekil 4.20. 20 mg HA eklenmiş 40 mg Fmoc-FF hidrojelinin SEM görüntüsü(1)



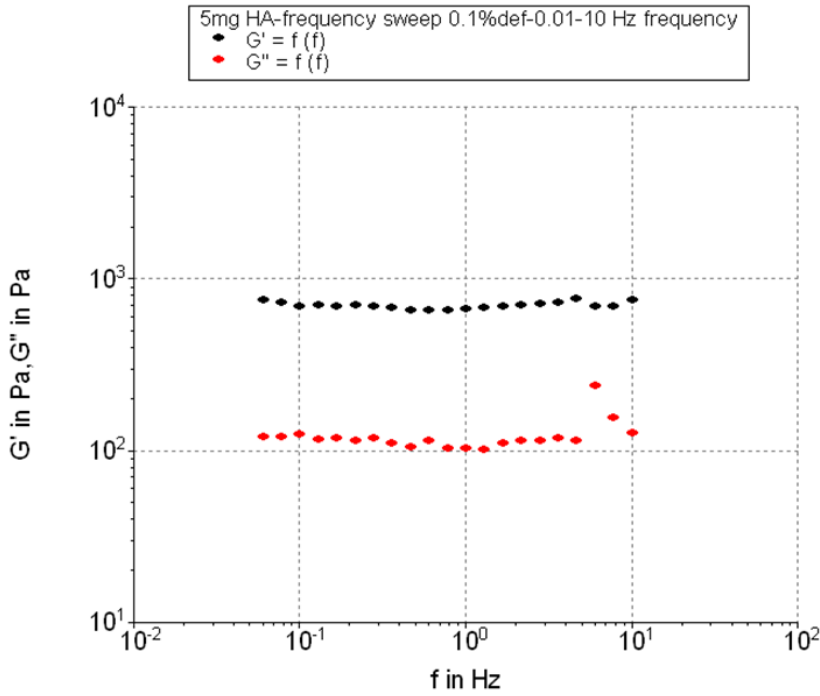
Şekil 4.21. 20 mg HA eklenmiş 40 mg Fmoc-FF hidrojelinin SEM görüntüsü(2)

4.4. Fmoc-FF-OH ve NanoHA katkılı Fmoc-FF-OH jellerin Reolojik değerlendirmeleri

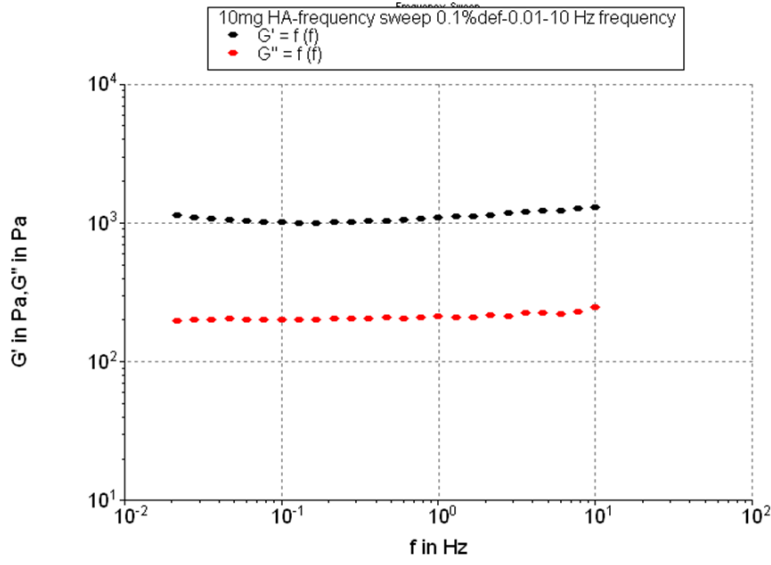
Aşağıdaki grafikler %0.1' lik deformasyon oranında 0.01-10 Hz frekans aralığındaki frekans-sweep taraması sonucu elde edilmiştir. Siyah G' , kırmızı G'' verilerini göstermektedir.



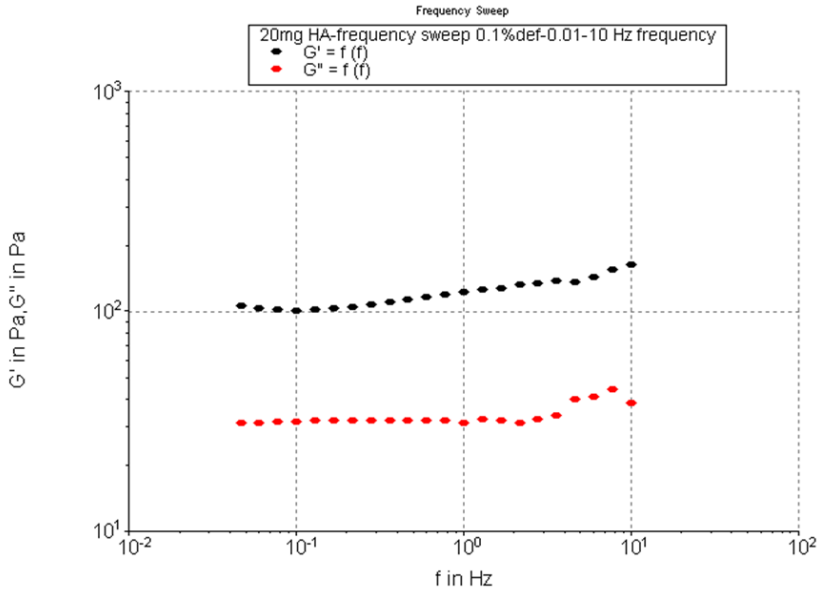
Şekil 4.22. HA içermeyen Fmoc-FF/DMEM hidrojelinin viskoelastisite grafiği



Şekil 4.23. 5 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/DMEM hidrojelinin viskoelastisite grafiği



Şekil 4.24. 10 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/DMEM hidrojelinin viskoelastisite grafiği

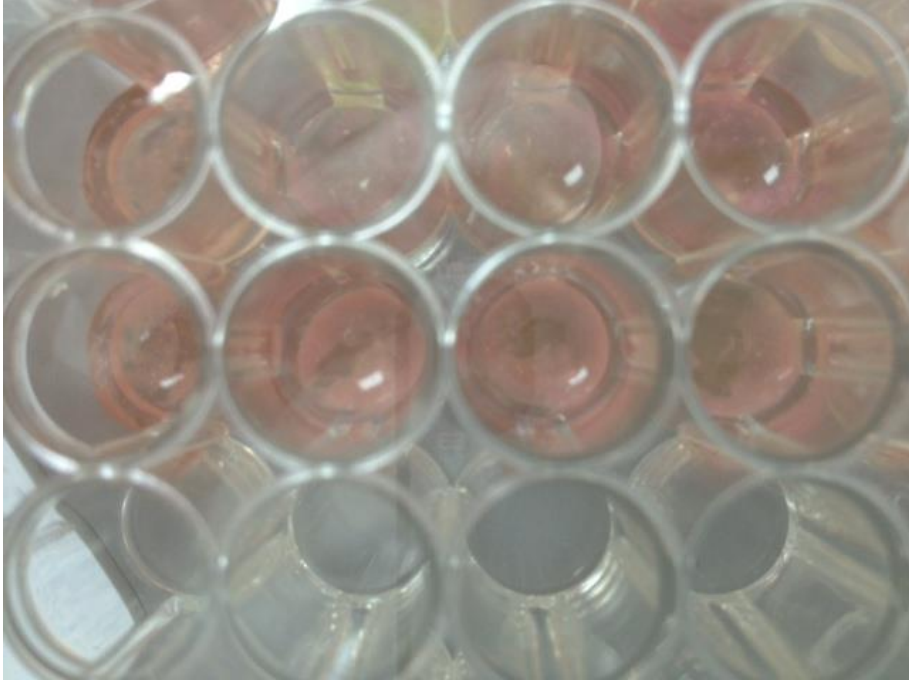


Şekil 4.25. 20 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/DMEM hidrojelinin viskoelastisite grafiği

G' değeri elastik modulus, G'' değeri ise viskositeyi göstermektedir. Hidrojellerin reolojik değerlendirmelerinden beklenen G' değerlerinin G'' değerlerinden yüksek olmasıdır.[51] Yukarıda Şekil 4.22, 4.23, 4.24 ve 4.25'te görüldüğü üzere tüm hidrojellerin G' değerleri beklenildiği gibi G'' değerlerinden yüksektir, jellerin elastik yapıda olduklarını göstermektedir.

4.5.NanoHA katkılı Fmoc-FF-OH hidrojellerin 3 boyutlu hücre kültüründe kondrosit uygulamaları

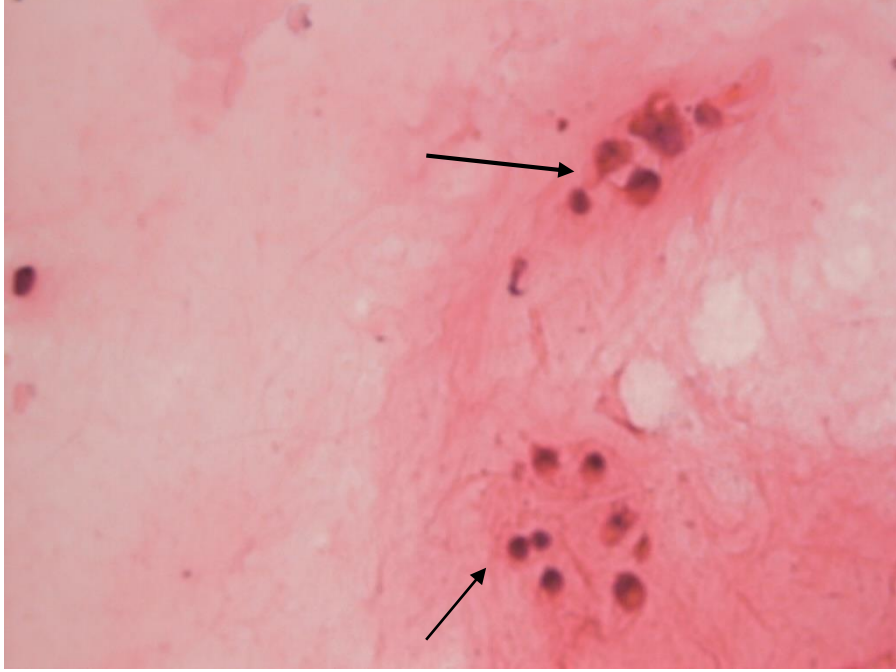
Kondrositler DMEM besi yeri ortamından hazırlanan Fmoc-FF-OH hidrojellerinin içerisine metotta anlatıldığı gibi hapsedilmiştir.



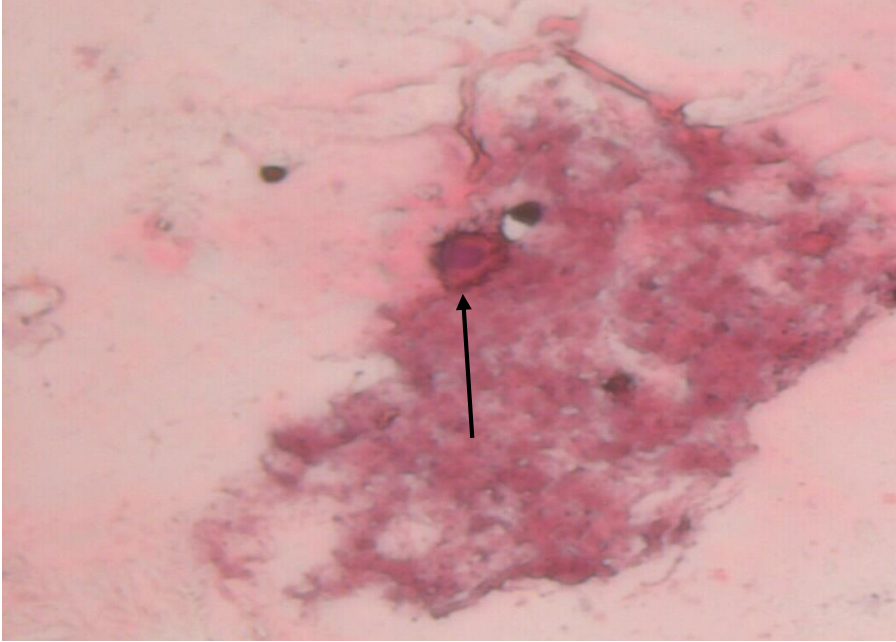
Şekil 4.26. Hidrojel içerisine hapsedilmiş kondrositler

4.5.1.Hematoksilen/ eozin boyamaları

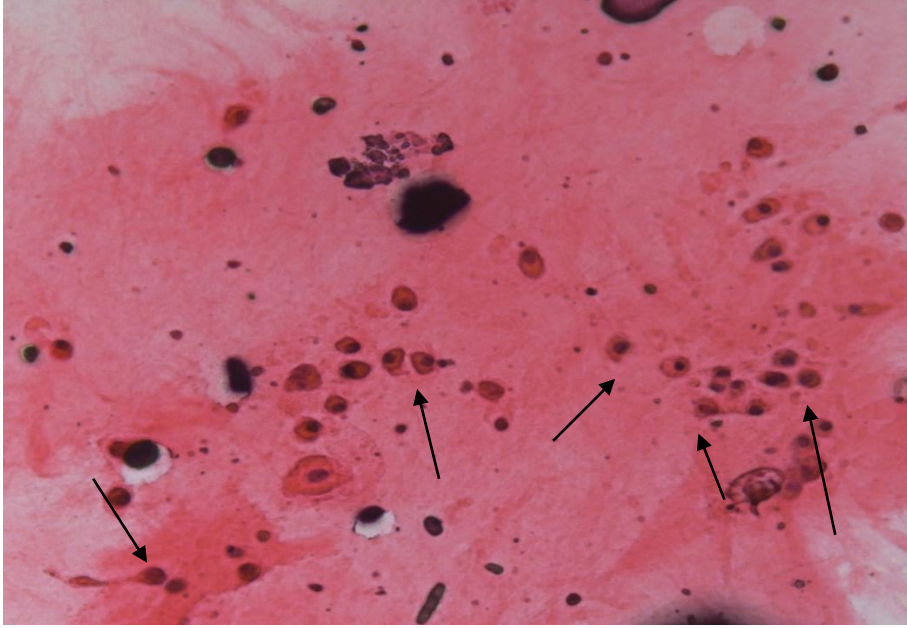
Jel içerisinde hapsedilen hücrelerin hematoksilen/ eozin ile boyandıktan sonra floresan ataçmanlı ışık mikroskopunda çekilen fotoğrafları aşağıda gösterilmiştir.



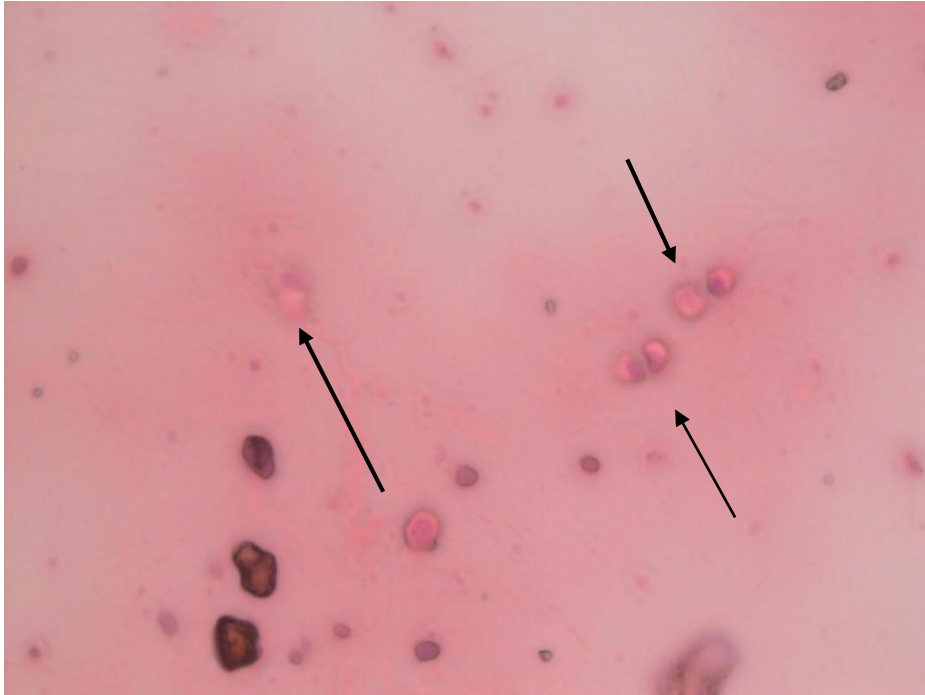
Şekil 4.27. HA eklenmemiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojeli içerisindeki kondrositlerin boyamaları(20X)



Şekil 4.28. 5 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojeli içerisindeki kondrositlerin boyamaları(40X)



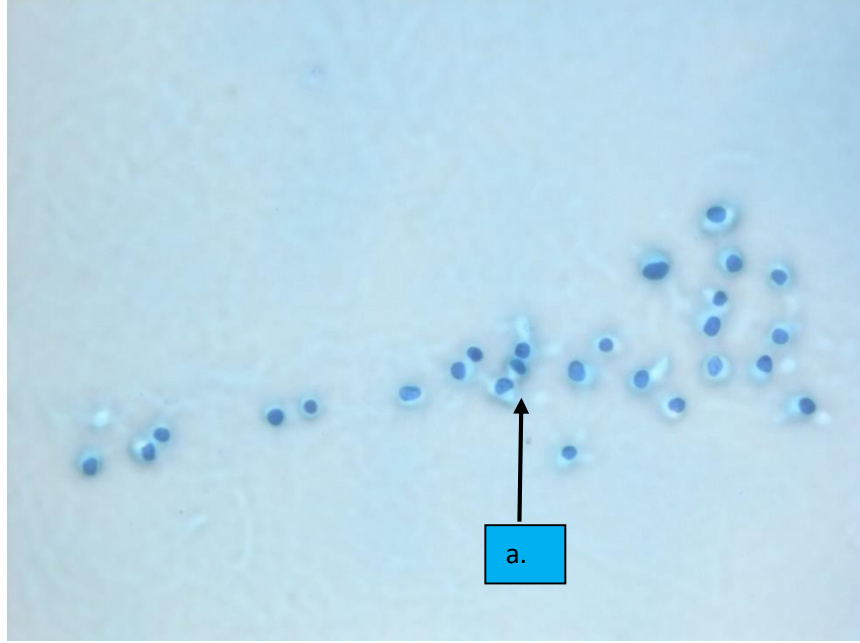
Şekil 4.29. 10 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojeli içerisindeki kondrositlerin boyamaları(20X)



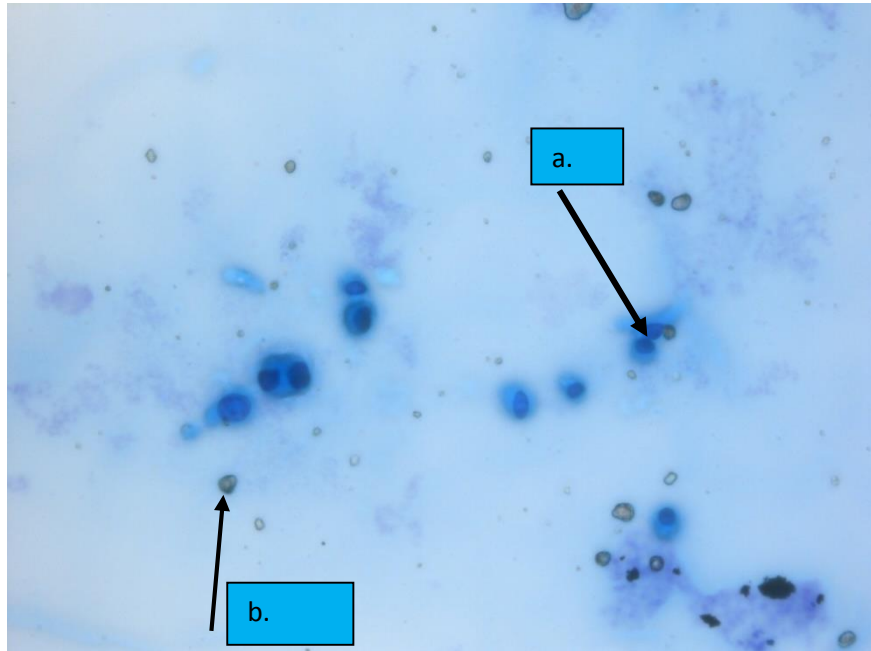
Şekil 4.30. 20 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojeli içerisindeki kondrositlerin boyamaları(40X)

4.5.2. Toluidien Blue boyamaları

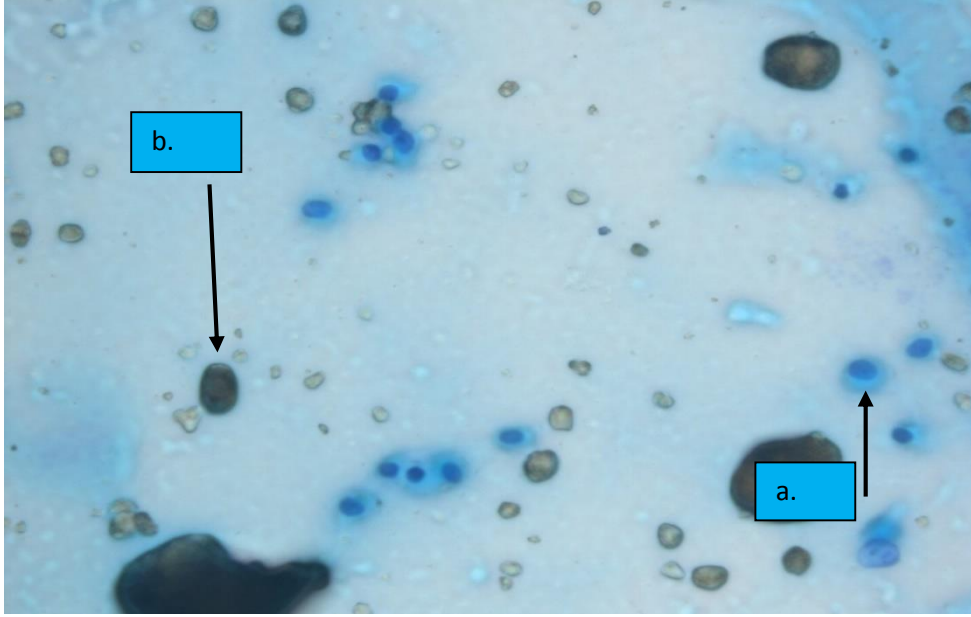
Hidrojeller içerisinde hapsedilen kondrositlerin GAG sentezlerini ve mitotik aktivitelerini belirlemek adına toluden blue boyaması yapılmıştır.



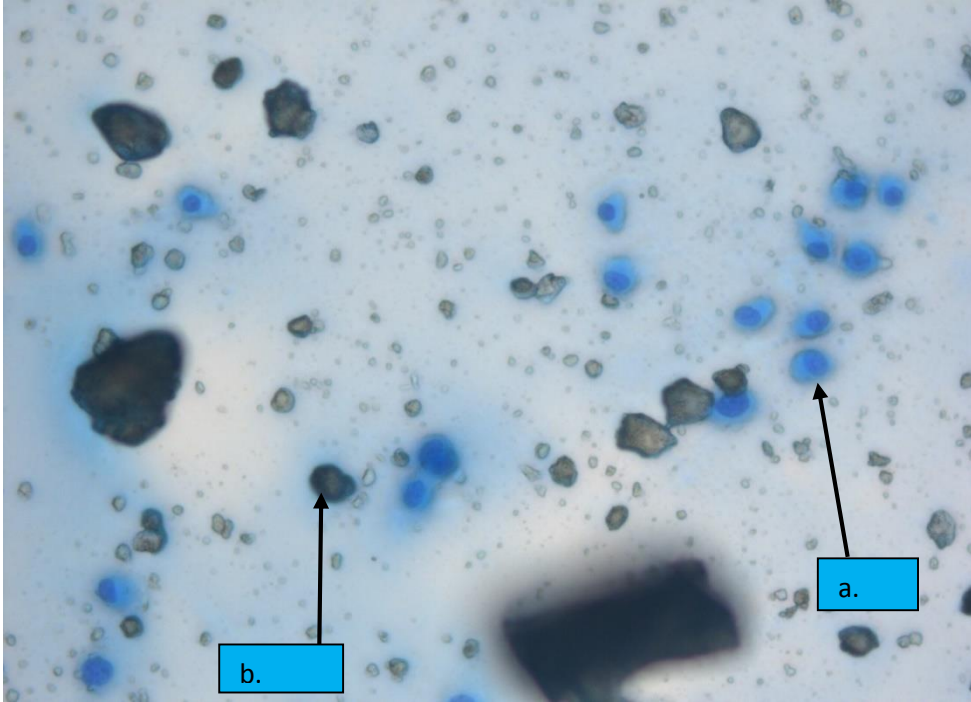
Şekil 4.31. HA eklenmemiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelindeki kondrositlerin toluidien blue boyamaları(10X)



Şekil 4.32. 5 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelindeki kondrositlerin toluden blue boyamaları(20X)



Şekil 4.33.10 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelindeki kondrositlerin toluidien blue boyamaları(20X)



Şekil 4.34.20 mg HA eklenmiş Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelindeki kondrositlerin toluidien blue boyamaları(20X)

(Resimlerde a.kondrosit hücrelerini, b.Hidroksi apatitleri göstermektedir.)

4.5.3. Apoptoz/nekroz oranları

Fmoc-FF/ besi yeri doku iskelesindeki kondrositlerin 5.günde apoptoz/ nekroz oranları aşağıda gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Hidrojel içerisinde 5 gün kültür edilmiş kondrositlerin apoptoz/nekroz oranları:

	HA eklenmemiş hidrojelde	5 mg HA eklenmiş hidrojelde	10 mg HA eklenmiş hidrojelde	20 mg HA eklenmiş hidrojelde
Apoptoz	2 ± 1	3 ± 1	6 ± 2	8 ± 1
Nekroz	1 ± 1	4 ± 2	10 ± 4	14 ± 5

Kondrositlerin 5 gün hidrojeller içerisinde kültür edilmelerinden sonra yapılan ikili boyama çalışmaları sonucu hesaplanan apoptoz/nekroz verileri, 100 hücre sayılarak hesaplanmıştır. Yani örneğin 10 mg HA eklenmiş hidrojel içerisindeki 100 hücreden 6±2 tanesi apoptoz geçirmiş, 10±4 tanesi ise nekroza uğramıştır. Bu verilerden HA eklenmesinin hücrelerdeki hem apoptoz hem nekroz oranını arttırdığı görülmektedir. HA eklenmemiş hidrojel içerisindeki kondrositler neredeyse hiç nekroz yaşamazken, 20 mg HA eklenmiş hidrojel içerisindeki hücrelerin neredeyse %15'i nekroz geçirmiştir. Bu veriler ışığında HA eklenmesinin ve artışının kondrosit canlılığına olumsuz etkide bulunduğunu söylemek mümkündür.

4.5.4.WST sonuçları

Fmoc-FF/ besi yeri hidrojelleri içerisindeki kondrositlerin 5.günde canlılık oranları hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4. Hidrojel içerisinde 5 gün kültür edilmiş kondrositlerin toksisite sonuçları:

	HA eklenmemiş hidrojelde	5 mg HA eklenmiş hidrojelde	10 mg HA eklenmiş hidrojelde	20 mg HA eklenmiş hidrojelde
Canlılık	%97 ± 1,5	%92 ± 3,2	%84 ± 3,8	%76 ± 4,6

Yukarıda verilen Çizelge 4.4. WST deney sonuçlarını göstermektedir. Görüldüğü üzere, ikili boyama (double staining) sonuçlarında olduğu gibi jeller içerisindeki HA miktarı arttıkça toksisite artmakta, canlılık azalmaktadır.

4.5.5. Hücrelerin mitotik aktivite ve GAG sentezi skorlamaları

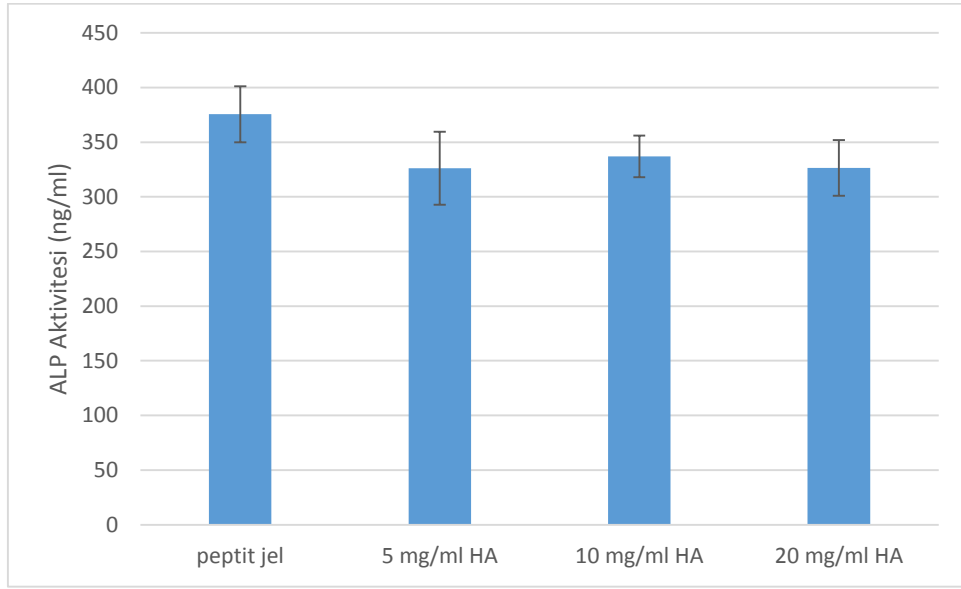
Çizelge 4.5. Hidrojel içerisinde 5 gün kültür edilmiş kondrositlerin mitotik aktivite ve GAG sentezi skorları:

	Mitotik aktivite	GAG sentezi
HA içermeyen hidrojelde	%42 ± 3,4	%40 ± 2,3
5 mg HA eklenmiş hidrojelde	%27 ± 2,3	%36 ± 1,7
10 mg HA eklenmiş hidrojelde	%24 ± 1,8	%32 ± 2,5
20 mg HA eklenmiş hidrojelde	%15 ± 2,6	%20 ± 2,1

Toluidin Blue boyamalarından sonra ışık mikroskopuyla görüntülenen hücreler skorlanmıştır. Görüldüğü üzere diğer histolojik deneylerde olduğu gibi, HA artışı hem mitotik aktivitede hem GAG sentezinde azalmaya sebebiyet vermiştir. GAG sentezi kondrositlerin matrikse tutunma eğilimlerini göstermektedir. Çizelge 4.5'te görüldüğü üzere, HA olmayan ortamda hücreler yüksek miktarda GAG sentezleyerek matriks oluşturma eğilimindeyken, 20 mg HA içeren hidrojel içerisinde bu oran %20'lere kadar azalmıştır. Aynı şekilde mitotik aktivite skorlarında da HA eklendikçe düşüş görülmektedir.

Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'ten de çıkarılabileceği gibi HA artışının kondrositlerin büyümeleri ve çoğalmalarında olumlu etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

4.6. Alkalen Fosfataz Aktivitesinin Değerlendirilmesi



Şekil 4.35. Alkalen Fosfataz Aktiviteleri

ALP testleri sonucunda elde edilen grafikte görüldüğü gibi hidroksiapatit eklenmiş peptit jel içindeki hücrelerin ALP aktiviteleri eklenmemiş peptit jele göre bir düşüş göstermiştir; ancak görülen bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber, hidroksiapatit yüzdelerinin arasında da bir fark saptanmamıştır.

5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sunulan tez çalışmaları kapsamında kendiliğinden düzenlenen Fmoc-FF-OH peptidinin jelleşme potansiyelleri araştırılarak optimize edilmiş, daha sonra bu jellerin hücre kültürüne uygunlukları kontrol edilmiştir.

Buna göre,

- Yapılan optimizasyon çalışmalarıyla, suda çözünen Fmoc-FF-OH dipeptidinin denenen 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg ve 60 mg'lik konsantrasyonlardan en uygun olanın 40 mg Fmoc-FF-OH miktarı olduğu görülmüştür.
- 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg ve 10 mg GdL miktarları denendikten sonra, Fmoc-FF-OH dipeptidinin jelleşmesi için en uygun pH ortamını 4 mg GdL'nin sağladığı gösterilmiştir.
- Su içerisinde kendiliğinden birleşen Fmoc-FF-OH dipeptidinin jelleşerek nano boyutta fiberler oluşturduğu SEM görüntüleriyle gösterilmiştir.
- Fmoc-FF-OH dipeptidinin hücre besi yeri ortamında kendiliğinden düzenlenme potansiyelleri kontrol edilmiş, DMEM içerisinde jelleşme sağlandığı görülmüştür.
- DMEM hücre kültür ortamında Fmoc-FF-OH hidrojellerin oluştuğu ve fiber yapısı oluşturduğu SEM görüntüleriyle gösterilmiştir.
- Hücre kültürü ortamında oluşturulan Fmoc-FF-OH hidrojellerinin oluşturduğu beta yaprak yapısı FTIR spektrumlarıyla gösterilmiştir.
- Nano boyutta hidroksi apatit sentezlenmiş ve bu hidroksi apatitlerin FTIR ve ZETA potansiyelleri gösterilmiştir.
- 5 mg, 10 mg, 20 mg HA katkılı Fmoc-FF-OH/ DMEM hidrojellerinin oluşabilirlikleri test edilmiş, oluşan hidrojellerin özellikleri SEM görüntüleriyle ve FTIR sonuçlarıyla analiz edilmiştir.
- Hidrojellerin reoloji deneyleri yapılmış, elastik yapıda oldukları gösterilmiştir.
- Fmoc-FF-OH/ DMEM hidrojellerinin üç boyutlu hücre kültürüne uygunluklarını test etmek için kondrosit hücreleriyle histolojik deneyler gerçekleştirilmiştir.

- Yapılan hematoksilen/eozin boyamaları kondrositlerin tüm Fmoc-FF-OH/ DMEM hidrojellerinin içerisinde hapsedildiğini, jel içerisine girebildiğini göstermiştir.
- Toluidien boyamaları sonucunda kondrositlerin hidrojeller içerisinde çoğalmaya başladığı, GAG sentezine başlayarak kendi matrikslerini oluşturmaya başladıkları görülmüştür. Ancak yapılan skorlama çalışmalarında görüldüğü üzere, HA miktarı arttıkça GAG sentezi ve mitotik aktivite değişmiştir.
- Kondrositlerin hidrojeller içerisindeki yaşayabilirliklerinin kontrolü amacıyla ikili boyama testleri yapılmış, apoptoz/nekroz oranlarının artan HA miktarıyla az da olsa arttığı sonucuna ulaşılmıştır.
- ALP testi yapılarak, farklı hidrojeller içerisine hapsedilmiş kondrositlerin ALP aktivitelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı sonucuna varılmıştır.
- Toksikite kontrolleri WST metoduyla gerçekleştirilmiştir. Yapılan deney sonucunda canlılık oranlarının HA miktarı arttıkça değiştiği görülmüştür.
- Yapılmış olan bu yenilikçi çalışma sonucu, Fmoc-FF-OH dipeptitlerinin DMEM hücre kültür ortamında fiber yapısı oluşturarak jelleştikleri gösterilmiştir. Bu jeller içerisinde gerçekleştirilen 3 boyutlu hücre kültürü deneyleri başarıyla sonuçlanmış, toksisite oranlarının oldukça düşük ve yaşayabilirlik, mitotik aktivite ve GAG sentezi oranlarının oldukça yüksek olduğu görülmüştür. HA katkılı Fmoc-FF-OH/ DMEM hidrojelleriyle gerçekleştirilen histolojik çalışmalarla HA'nın kondrositler üzerindeki etkisi test edilmiş ve yaşamsal bulguların HA miktarı arttıkça değiştiği gözlemlenmiştir. Ancak değişimlerin istatistiksel anlamı olmadığı düşünülmektedir. Sonraki çalışmalar daha uzun süre yapılacak hücre kültürü çalışmalarıyla şekillendirilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Whitesides, G.M., Mathias, J.P., Seto, C.T., Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures, *Science*, 254:1312– 9, **1991**
- [2] Zhang, S., Holmes, T.C., DiPersio, C.M., Hynes, R.O., Su, X., Rich, A., Self-complementary oligopeptide matrices support mammalian cell attachment, *Biomaterials*, 16, 1385–93, **1995**
- [3] Caplan, M., Moore, P., Zhang, S., Kamm, R.D., Lauffenburger, D.A., Control of self-assembling oligopeptide matrix formation through systematic variation of amino acid sequence, *Biomacromolecules*, 4, 627– 31, **2001**
- [4] Zhang, S., Emerging biological materials through molecular self-assembly, *Biotechnology Advances*, 20, 321–339, **2002**
- [5] Marini, D., Hwang, W., Lauffenburger, D.A., Zhang, S., Kamm, D., Left-handed helical ribbon intermediates in the self-assembly of a β -sheet peptide, *Nano Letters*, 2, 295 – 9, **2002**
- [6] Santoso, S., Hwang, W., Hartman, H., Zhang, S., Self-assembly of surfactant-like peptides with variable glycine tails to form nanotubes and nanovesicles, *Nano Letters*, 2, 687–91, **2002**
- [7] Schwartz, J., Zhang, S., Peptide-mediate cellular delivery, *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2, 162 – 7, **2000**
- [8] Hartgerink, J.D., Beniash, E., Stupp, S.I., Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers, *Science*, 294,1684–8, **2001**
- [9] Abdallah, D.J., Lu, L., Weiss, R.G., Thermoreversible organogels from alkane gelators with one heteroatom, *Chemistry of Materials*, 11, 2907–2911, **1999**
- [10] Jung, J.H., John, G., Masuda, M., Yoshida, K., Shinkai, S., Shimizu, T., Self-Assembly of a Sugar-Based Gelator in Water: Its Remarkable Diversity in Gelation Ability and Aggregate Structure, *Langmuir*, 17, 7229–7232, **2001**
- [11] Jing, P., Rudra, J.S., Herr, A.B., Collier, J.H., Self-assembling peptide polymers designed from the coiled coil region of fibrin, *Biomacromolecules*, 9, 2438–2446, **2008**
- [12] Suzuki, M., Owa, S., Kimura, M., Kurose, A., Shirai, H., Supramolecular hydrogels and organogels based on novel l-valine and l-isoleucine amphiphiles, *Tetrahedron Letters*, 46, 303–306, **2005**
- [13] Van der Laan, S., Feringa, B.L., Kellogg, R.M., Remarkable Polymorphism in Gels of New Azobenzene Bis-urea Gelators , *Langmuir*, 18, 7136–7140, **2002**

- [14] Yoshikawa, I., Yanagi, S., Yamaji, Y., Araki, K., Nucleoside-based organogelators: gelation by the G–G base pair formation of alkylsilylated guanosine derivatives, *Tetrahedron Letters*, 63, 7474–7481, **2007**
- [15] Geiger, C., Stanescu, M., Chen, L., Whitten, D.G., Unusual Folded Structures for a Tethered Squaraine-Cholesterol Derivative in Langmuir–Blodgett Films, *Langmuir*, 15, 2241–2245, **1999**
- [16] Moffat, J.R., Smith, D.K., Controlled self-sorting in the assembly of ‘multi-gelator’ gels, *Chemical Communications*, 316–318, **2009**
- [17] Koutsopoulos, S., Unsworth, L.D., Nagaia, Y., Zhang, S., Controlled release of functional proteins through designer self-assembling peptide nanofiber hydrogel scaffold, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106:12, 4623–4628, **2009**
- [18] Loos, M., Feringa, B.L., Van Esch, J.H., Design and Application of Self-Assembled Low Molecular Weight Hydrogels, *European Journal of Organic Chemistry*, 3615–3631, **2001**
- [19] Estroff, L., Hamilton, D., Water Gelation by Small Organic Molecules, *Chemical Reviews*, 104:3, 1201-1216, **2004**
- [20] Kunitake, T., Okahata, Y., Shimomura, M., Yasunami, S., Takarabe, K., Synthetic Molecular Membranes and their Functions, *Journal of American Chemical Society*, 103, 5401, **1981**
- [21] Fuhrhop, J.H., Schnieder, P., Rosenberg, J., Boekema, E., The Chiral Bilayer Effect Stabilizes Micellar Fibers, *Journal of American Chemical Society*, 109, 3387, **1987**
- [22] Suzuki, M., Yumoto, M., Kimura, M., Shirai, H., Hanabusa, K., A Family of Low-Molecular-Weight Hydrogelators Based on L-Lysine Derivatives with a Positively Charged Terminal Group, *New Journal of Chemistry*, 26, 817, **2002**
- [23] Nakashima, T., Kimizuka, N., Light-Harvesting Supramolecular Hydrogels Assembled from Short-Legged Cationic L-Glutamate Derivatives and Anionic Fluorophores, *Advanced Materials*, 14, 1113, **2002**
- [24] Pang, S.F., Zhu, D.B., Pronounced hydrogel formation by the self-assembled aggregate of semifluorinated fatty acid., *Chemical Physics Letters*, 358, 479, **2002**
- [25] Iwaura, R., Yoshida, K., Masuda, M., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M., Shimizu, T., Oligonucleotide-Templated Self-Assembly of Nucleotide Bolaamphiphiles: DNA-like Nanofibers Edged by Double-Helical Arrangement of A-T Base Pairs, *Angewandte Chemie International Edition*, 42, 1009, **2003**

- [26] Iwaura, R., Yoshida, K., Masuda, M., Yase, K., Shimizu, T., Spontaneous Fiber Formation and Hydrogelation of Nucleotide Bolaamphiphiles , *Chemistry of Materials*, 14, 3047, **2002**
- [27] Shimizu, T., Iwaura, R., Masuda, M., Hanada, T., Yase, K., Internucleobase-interaction-directed self-assembly of nanofibers from homo-and heteroditopic 1,omega-nucleobase bolaamphiphiles., *Journal of American Chemical Society* , 123, 5947, **2001**
- [28] Franceschi, S., de Viguerie, N., Riviere, M., Lattes, A., Synthesis and aggregation of two-headed surfactants bearing amino acid moieties, *New Journal of Chemistry*, 23, 447, **1999**
- [29] Makarevic, J., Jokic, M., Peric, B., Tomisic, V., Kojic-Prodic, B., Zinic, M., ... Bis(Amino Acid) Oxalyl Amides as Ambidextrous Gelators of Water and Organic Solvents: Supramolecular Gels with Temperature Dependent Assembly/Dissolution Equilibrium, *Chemistry - A European Journal*, 7, 3328, **2001**
- [30] Menger, F.M., Seredyuk, V.A., Apkarian, R.P., Wright, E.R., Colloidal Assemblies of Branched Geminis Studied by Cryo-etch-HRSEM, *Journal of American Chemical Society*, 124, 12408, **2002**
- [31] Oda, R., Huc, I., Homo, J.C., Heinrich, B., Schmutz, M., Candau, S., Elongated Aggregates Formed by Cationic Gemini Surfactant, *Langmuir*, 15, 2384, **1999**
- [32] Berthier, D., Buffeteau, T., Leger, J.M., Oda, R., Huc, I., From Chiral Counterions to Twisted Membranes, *Journal of American Chemical Society*, 124, 13486, **2002**
- [33] Gronwald, O., Shinkai, S., Sugar-integrated gelators of organic solvents., *Chemistry - A European Journal*, 7, 4328, **2001**
- [34] Jung, J.H., John, G., Masuda, M., Yoshida, K., Shinkai, S., Shimizu, T., Self-Assembly of a Sugar-Based Gelator in Water: Its Remarkable Diversity in Gelation Ability and Aggregate Structure, *Langmuir* , 17, 7229, **2001**
- [35] Bhattacharya, S., Acharya, S.N.G., Impressive Gelation in Organic Solvents by Synthetic, Low Molecular Mass, Self-Organizing Urethane Amides of L-Phenylalanine, *Chemistry of Materials*, 11, 3504, **1999**
- [36] Newkome, G.R., Baker, G.R., Arai, S., Saunders, M.J., Russo, P.S., Theriot, K.J., Moorefield, C.N., Rogers, L.E., Miller, J.E., Lieux, T.R., Murray, M.E., Phillips, B., Pascal, L., Synthesis and Characterization of Two-directional Cascade Polymers, *Journal of American Chemical Society*, 112, 8458, **1990**
- [37] Hanabusa, K., Hirata, T., Inoue, D., Kimura, I., Shirai, H., Formation of physical hydrogels with terpyridine-containing carboxylic acids, *Colloids and Surfaces-A*, 169, 307, **2000**

- [38] Menger, F.M., Caran, K.L., *Anatomy of a Gel. Amino Acid Derivatives That Rigidify Water at Submillimolar Concentrations*, *Journal of American Chemical Society*, 122, 11679, **2000**
- [39] Estroff, L.A., Hamilton, A.D., Effective gelation of water using a series of bis-urea dicarboxylic acids, *Angewandte Chemie International Edition*, 39, 3447, **2000**
- [40] Johnson E.K., Adams D.J., Cameron P.J., Peptide based low molecular weight gelators, *Journal of Material Chemistry*, 21, 2024–2027, **2011**
- [41] Johnson E.K., Adams D.J., Cameron P.J., Directed self-assembly of dipeptides to form ultrathin hydrogel membranes, *Journal of American Chemical Society*, 132, 5130–5136, **2010**
- [42] Adams D.J., Morris K., Chen L., Serpell L.C., Bacsá J., The delicate balance between gelation and crystallisation: structural and computational investigations, *Soft Matter*, 6, 4144–4156, **2010**
- [43] Holmes T., Novel peptide-based biomaterial scaffolds for tissue engineering, *Trends in Biotechnology*, 20, 1, 16-21, **2002**
- [44] Ghadiri, M.R., Granja, J.R., Milligan, R.A., McRee, D.E., Khazanovich, N., Self-assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture , *Nature*, 366, 324, **1993**
- [45] Silva, G.A., Czeisler, C., Niece, K.L., Beniash, E., Harrington, D.A., Kessler, J.A., Stupp, S.I., Elective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers , *Science*, 303, 1352, **2004**
- [46] Aggeli, A., Bell, M., Boden, N., Keen, J.N., Knowles, P.F., McLeish, T.C.B., Pitkeathly, M., Radford, S.E., Responsive gels formed by the spontaneous self-assembly of peptides into polymeric beta-sheet tapes., *Nature*, 386, 259, **1997**
- [47] Tang C., Ulijn R.V., Saiani A., Effect of Glycine Substitution on Fmoc Diphenylalanine Self-Assembly and Gelation Properties, *Langmuir*, 27, 14438–14449, **2011**
- [48] Adams, D.J., Mullen, L.M., Berta, M., Chen, L., Frith, W.J., Relationship between molecular structure, gelation behaviour and gel properties of Fmoc-dipeptides, *Soft Matter*, 6, 1971–1980, **2010**
- [49] Zhang, Y., Gu, H., Yang, Z., Xu, B., Supramolecular Hydrogels Respond to Ligand-Receptor Interaction, *Journal of American Chemical Society*, 125, 13680–13681, **2003**
- [50] Tang, C., Smith, A.M., Collins, R.F., Ulijn, R.V., Saiani, A., Fmoc-Diphenylalanine self-assembly mechanism induces apparent pKa shifts, *Langmuir*, 25, 9447–9453, **2009**

- [51] Adams D.J., Topham P.D., Peptide conjugate hydrogelators, *Soft Matter*, 6, 3707–3721, **2010**
- [52] Yang, Z.M., Liang, G.L., Ma, M.L., Gao, Y., Xu, B., Conjugates of naphthalene and dipeptides produce molecular hydrogelators with high efficiency of hydrogelation and superhelical nanofibers., *Journal of Material Chemistry*, 17, 850–854, **2007**
- [53] Liebmann, T., Rydholm, S., Akpe, V., Brismar, H., Self-assembling Fmoc dipeptide hydrogel for in situ 3D cell culturing, *BMC Biotechnology*, 7, 88–89, **2007**
- [54] Mahler, A., Reches, M., Rechter, M., Cohen S., Gazit, E., Self-Assembled Hydrogel Composed of a Modified Aromatic Dipeptid, *Advanced Materials*, 18, 1365–1370, **2006**
- [55] Yang, Z.M., Gu, H.W., Fu, D.G., Gao, P., Lam, J.K., Xu, B., Enzymatic Formation of Supramolecular Hydrogels, *Advanced Materials*, 16, 1440–1444, **2004**
- [56] Channon, K.J., Devlin, G.L., Magennis, S.W., Finlayson, C.E., Tickler, A.K., Silva, C., MacPhee, C.E., Modification of fluorophore photophysics through peptide-driven self-assembly, *Journal of American Chemical Society*, 130, 5487–5491, **2008**
- [57] Tiller, J.C., Increasing the Local Concentration of Drugs by Hydrogel Formation, *Angewandte Chemie International Edition*, 42, 3072–3075, **2003**
- [58] Williams, R.J., Mart, R.J., Ulijn, R.V., Exploiting Biocatalysis in Peptide Self Assembly, *Biopolymers*, 94, 1, 107-117, **2009**
- [59] Wichterle, O., Lim, D., Hydrophilic gels in biologic use, *Nature*, 185, 117, **1960**
- [60] Campoccia, D., Doherty, P., Radice, M., Brun, P., Abatangelo, G., Williams, D.F., Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification, *Biomaterials* 19, 2101–2127, **1998**
- [61] Frkanec, L., Jokic, M., Makarevic, J., Wolsperger, K., Bis(PheOH) Maleic Acid Amide–Fumaric Acid Amide Photoisomerization Induces Microsphere-to-Gel Fiber Morphological Transition: The Photoinduced Gelation System, *Journal of American Chemical Society*, 124, 9716–9717, **2002**
- [62] Kiyonaka, S., Sugiyasu, K., Shinkai, S., Hamachi, I., First Thermally Responsive Supramolecular Polymer Based on Glycosylated Amino Acid, *Journal of American Chemical Society*, 124, 10954–10955, **2003**
- [63] Hoffman A., Hydrogels for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 18–23, **2012**

- [64] Lim, F., Sun, A.M., Microencapsulated islets as bioartificial pancreas, *Science*, 210, 908–910, **1980**
- [65] Yannas, I.V., Lee, E., Orgill, D.P., Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86, 933–937, **1989**
- [66] Lutolf, M.P., Raeber, G.P., Zisch, A.H., Tirelli, N., Hubbell, J.A., Cell-Responsive Synthetic Hydrogels, *Advanced Materials*, 15, 888, **2003**
- [67] Aimetti, A.A., Tibbitt, M.W., Anseth, K.S., Human neutrophil elastase responsive delivery from poly(ethylene glycol) hydrogels, *Biomacromolecules*, 10, 1484, **2009**
- [68] Xing, B., Yu, C.W., Chow, K.H., Ho, P.L., Fu, D., Xu, B., Hydrophobic Interaction and Hydrogen Bonding Cooperatively Confer A Vancomycin Hydrogel: A Potential Candidate for Biomaterials, *Journal of American Chemical Society*, 124, 14846, **2002**
- [69] Adams, D.J., Dipeptide- and Tripeptide-Conjugates ? Low Molecular Weight Hydrogelators, *Macromolecular Bioscience*, , 11, 160–173, **2011**
- [70] Zhang, S., Biological surface engineering: a simple system for cell pattern formation. *Biomaterials* 20, 1213–1220, **1999**
- [71] Jayawarna, V., Ali, M., Jowitt, T.A., Miller, A.F., Saiani, A., Gough, J.E., Ulijn, R.V., Nanostructured hydrogels for three-dimensional cell culture through self-assembly of fluorenylmethoxycarbonyl-dipeptides, *Advanced Materials*, 18, 611–614, **2006**
- [72] Cheng, G., Castelletto, V., Moulton, C.M., Newby, G.E., Hamley, I.W., Hydrogelation and self-assembly of Fmoc-tripeptides: unexpected influence of sequence on self-assembled fibril structure, and hydrogel modulus and anisotropy., *Langmuir*, 26, 4990–4998, **2010**
- [73] Yang, Z.M., Wang, L., Wang, J.Y., Gao, P., Xu, B., Phenyl groups in supramolecular nanofibers confer hydrogels with high elasticity and rapid recovery, *Journal of Materials Chemistry*, 20, 2128–2132, **2010**
- [74] Gieni, R.S., Hendzel, M.J., Mechanotransduction from the ECM to the genome: Are the pieces now in Place, *Journal of Cellular Biochemistry*, 104(6):1964–1987, **2008**
- [75] Petersen, O.W., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A.R., Bissell, M.J., Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89, 9064-8, **1992**

- [76] Lee, K.Y., Mooney, D.J., Hydrogels for tissue engineering, *Chemical Reviews*, 101(7):1869–1880, **2001**
- [77] Teixeira, S., Yang, L., Dijkstra, P.J., Ferraz, M.P., Monteiro, F.J., Heparinized hydroxyapatite/collagen three-dimensional scaffolds for tissue engineering, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, 2385–2392, **2010**
- [78] Tibbitt, M.W., Anseth, K.S., Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture, *Biotechnology and Bioengineering*, 103(4), 655–663, **2009**
- [79] Lutolf, M.P., Lauer-Fields, J.L., Schmoekel, H.G., Metters, A.T., Weber, F.E., Fields, G.B., Hubbell, J.A., Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: Engineering cell-invasion characteristics, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), 5413–5418, **2013**
- [80] Baharvand, H., Hashemi, S.M., Kazemi Ashtiani, S., Farrokhi, A., Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro, *The International Journal of Developmental Biology*, 50, 645-52, **2006**
- [81] Tanaka, H., Murphy, C.L., Murphy, C., Kimura, M., Kawai, S., Polak, J.M., Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells: effects of culture conditions and dexamethasone, *Journal of Cellular Biochemistry*, 93, 454-62, **2004**
- [82] Levenberg, S., Huang, N.F., Lavik, E., Rogers, A.B., Itskovitz-Eldor, J., Langer R. Differentiation of human embryonic stem cells on threedimensional polymer scaffolds, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 12741-6, **2003**
- [83] Kisiday, J., Jin, M., Kurz, B., Hung, H., Semino, C., Zhang, S., Grodzinsky, A.J., Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: Implications for cartilage tissue repair, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 :15, 9996–10001, **2002**
- [84] Genove, E., Shen, C., Zhang, S., Semino, C.E., The effect of functionalized self-assembling peptide scaffolds on human aortic endothelial cell function, *Biomaterials*, 26, 3341, **2005**
- [85] Liebmann, T., Rydholm, S., Akpe, V., Brismar, H., Self-assembling Fmoc dipeptide hydrogel for in situ 3D cell culturing, *BMC Biotechnology* , 7, 88, **2007**
- [86] Sharma, B., Elisseeff, J.H., Engineering structurally organized cartilage and bone tissues, *Annals of Biomedical Engineering*, 32, 148-159, **2004**

- [87] Quinn, T.M., Hunziker, E.B., Hauselmann, H.J., Variation of cell and matrix morphologies in articular cartilage among locations in the adult human knee, *Osteoarthritis Cartilage*,13, 672-678, **2005**
- [88] Buckwalter, J.A., Articular cartilage: overview. In: Goldberg VM, Caplan AI, editors. Orthopedic tissue engineering: basic science and practices. New York, Marcel Dekker, **2004**
- [89] www.eorthopod.com
- [90] Darling, E.M., Hu, J.C., Athanasiou, K.A., Zonal and topographical differences in articular cartilage gene expression, *Journal of Orthopaedic Research*, 22, 1182-1187, **2004**
- [91] Holland, T.A., Mikos, A.G., Advances in drug delivery for articular cartilage. *Journal of Control Release*, 86, 1-14, **2003**
- [92] Stockwell, R.G., Biology of cartilage cells. New York: Cambridge University Press, **1979**
- [93] Hunziker, E.B., Quinn, T.M., Hauselmann, H.J., Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage, *Osteoarthritis Cartilage*, 10, 564-572, **2002**
- [94] Aydelotte, M.B., Greenhill, R.R., Kuettner, K.E., Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism, *Connective Tissue Research*, 18, 223-234, **1988**
- [95] Aydelotte, M.B., Kuettner, K.E., Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production, *Connective Tissue Research*,18, 205-222, **1988**
- [96] Redman, S.N., Oldfield, S.F., Archer, C.W., Current strategies for articular cartilage repair, *European Cells and Materials*, 9, 23-32, **2005**
- [97] Mano, J.F., Reis, R.L., Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1, 261-273, **2007**
- [98] Setton L., Polymer therapeutics: Reservoir drugs, *Nature Materials*, 7, 172 – 174, **2008**
- [99] *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*,2: 192–201, **1994**
- [100] Khanarian N.T., Haney N.M., Burga R.A., Lu H., A functional agarose-hydroxyapatite scaffold for osteochondral interface regeneration, *Biomaterials*, 33, 5247-5258, **2012**
- [101] http://footandankleresource.com/Osteochondral_Defects.html)

- [102] <http://sbsam.org/tip-ii-kollajen-kikirdak-dokusu-ve-osteoartrit/>
- [103] (<http://en.wikipedia.org/wiki/Osteoarthritis>)
- [104] Yasuda, K., Kitamura, N., Gong, J.P., Arakaki, K., Kwon, H.J., Onodera, S., Chen, Y.M., Kurokawa, T., Kanaya, F., Ohmiya, Y., Osada, Y., A Novel Double-Network Hydrogel Induces Spontaneous Articular Cartilage Regeneration in vivo in a Large Osteochondral Defect, *Macromolecular Biosciences*, 9, 307–316, **2009**
- [105] Lind, M., Larsen, A., Clausen, C., Osther, K., Everland, H., Cartilage repair with chondrocytes in fibrin hydrogel and MPEG polylactide scaffold: an in vivo study in goats, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 16, 690–698, **2008**
- [106] Shigeru, K., Oku, T., Takagi, S., Hydraulic property of hydroxyapatite thermal decomposition product and its application as a biomaterial, *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 97, 96–101, **1989**
- [107] Chang, B.S., Lee, C.K., Hong, K.S., Youn, H.J., Ryu, H.S., Chung, S.S., Park, K.W., Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations, *Biomaterials*, 21, 1291–1298, **2000**
- [108] Hong, Z., Zhang, P., He, C., Qiu, X., Liu, A., Chen, L., Nanocomposite of poly(L-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: mechanical properties and biocompatibility, *Biomaterials*, 26(32), 6296–304, **2005**
- [109] Ignjatovic, N., Tomic, S., Dakic, M., Miljkovic, M., Plavsic, M., Uskokovic, D., Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-Llactide composite biomaterials, *Biomaterials*, 20(9), 809–16, **1999**
- [110] Kothapalli, C.R., Shaw, M.T., Wei, M., Biodegradable HA-PLA 3-D porous scaffolds: effect of nano-sized filler content on scaffold properties, *Acta Biomaterials*, 1(6), 653–62, **2005**
- [111] Liao, S., Wang, W., Uo, M., Ohkawa, S., Akasaka, T., Tamura, K., A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration, *Biomaterials*, 26(36), 7564–7, **2005**
- [112] Kong, L., Gao, Y., Cao, W., Gong, Y., Zhao, N., Zhang, X., Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research*, 75(2), 275–82, **2005**
- [113] Li, X.M., Feng, Q.L., Cui, F.Z., In vitro degradation of porous nanohydroxyapatite/ collagen/PLLA scaffold reinforced by chitin fibres, *Materials Science and Engineering: c-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 26(4), 716–20, **2006**

- [114] Sachlos, E., Gotor, D., Czernuszka, J.T., Collagen scaffolds reinforced with biomimetic composite nano-sized carbonate-substituted hydroxyapatite crystals and shaped by rapid prototyping to contain internal microchannels, *Tissue Engineering*, 12(9), 2479–87, **2006**
- [115] Zhu, X., Eibl, O., Scheideler, L., Geis-Gerstorfer, J., Characterization of nano hydroxyapatite/collagen surfaces and cellular behaviors. *Journal of Biomedical Materials Research*. 79(1), 114–27, **2006**
- [116] Ngiam, M., Liao, S., Patil, A.J., Cheng, Z., Chan, C.K., Ramakrishna, S., *Bone*, 45, 4–16, **2009**
- [117] Tang, X.J., Gui, L., Lii, X.Y., *Biomedical Materials*, 3, 44115, **2008**
- [118] Khanarian, N.T., Jiang, J., Wan, L.Q., Mow, V.C., Lu, H.H., A hydrogel-mineral composite scaffold for osteochondral interface tissue engineering, *Tissue Engineering Part A*, 18, 533-545, **2012**
- [119] M. Jayabalan, K.T. Shalumon, M.K. Mitha, K. Ganesan, M. Epple, Injectable biomaterials for minimally invasive orthopedic treatments, *Acta Biomaterials.*, 20(6):1379-87, **2009**
- [120] Katti, K.S., Katti, D.R., Dash, R., Synthesis and characterization of a novel chitosan/montmorillonite/hydroxyapatite nanocomposite for bone tissue engineering, *Biomedical Materials*, 3, **2008**
- [121] Martin, I., Miot, S., Barbero, A., Jakob, M., Wendt, D., Osteochondral tissue engineering, *Journal of Biomechanics*, 40, 750–765, **2007**
- [122] Sanosh K.P., Chu M., Balakrishnan A., Kim T.N., Cho S., Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite powder using sol-gel technique, *Bulletin of Materials Science*, 32:5,465-470, **2009**

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri:

Adı Soyadı: Ekin Çelik

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Bekar

E-posta: ekince10@hacettepe.edu.tr

Adresi: 4.cadde 115/2 Emek- Çankaya, Ankara, Türkiye

Eğitim:

Lise: Gazi Anadolu Lisesi, Ankara

Lisans: Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ankara

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Ana Bilim Dalı, Ankara

Yabancı Dil ve Düzeyi: İngilizce, Çok iyi

İş Deneyimi: -

Deneyim Alanları: -

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi: -

Tezden Üretilmiş Yayınlar: -

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar: -