

**KORNEA DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN HİBRİT
BİYOMATERYAL GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF A HYBRID BIOMATERIAL FOR
CORNEAL TISSUE ENGINEERING**

MERVE UYANIKLAR

PROF. DR. HALİL MURAT AYDIN

Tez Danışmanı

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

2021

ÖZET

KORNEA DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN HİBRİT BİYOMATERYAL GELİŞTİRİLMESİ

Merve UYANIKLAR

Yüksek Lisans, Biyomühendislik A.B.D.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

Ocak 2021, 132 sayfa

Kornea gözün 1/6'sını kaplayan, konveks biçimli, ışığı odaklama ve gözü dış etkilerden koruma görevine sahip, görme işlevinde büyük rol oynayan transparan bir yapıdır. Korneal körlük; kornea travmaları, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, genetik rahatsızlıklar gibi sebeplerle dokunun hasar görmesine bağlı olarak ortaya çıkar. Özellikle ileri derecede travmalarda, dokunun uygun bir eşleniğiyle değiştirilmesi gerekebilir. Bu tarz cerrahi uygulamalar, allojenik kornea transplantasyonu veya yapay korneanın (keratoprotez) hasarlı dokuyla değiştirilmesi şeklinde yapılmaktadır. Araştırmacılar, doku mühendisliği uygulamalarının kazandırdığı yenilikçi bakış açılarıyla, patolojik kornea dokusunu hastadan uzaklaştırmak ve hasarlı bölgenin doku eşlenikleri ile transplantasyonu için doku eşdeğerlerini üretmeye çalışmaktadır. Son yıllarda, kornea doku mühendisliği korneal rahatsızlıklarının ve hasarlarının tedavisinde karşılaşılan sorunların çözümüne yönelik bazı stratejiler uygulamaktadır. Bu stratejiler; hidrojel tekniği, prefabrik matriksler ve hücreleştirilmiş korneal dokular gibi korneal doku eşlenikleri için biyomimetik matriks sistemlerinin tasarlanmasıdır. Ancak hidrojel sistemlerinin yetersiz mekanik mukavemeti ve sürdürülebilirliğinin zor olması gibi bazı sınırlamalar vardır. Deselülerize matriksler, uygun bir hidrojelle desteklenmeden, yetersiz mekanik dayanıma sahip olduklarından ötürü ideal bir kornea replasmanı görevi göremezler. Bu nedenle deselülerize matrikslerin mekanik dayanım ve transparanlık özelliklerini iyileştirecek bir polimerin kullanılması gerekmektedir. Bu

tez çalışması kapsamında, Jelatin Metakrilat (GelMA) polimeriyle desteklenen deselülerize matriksleri UV altında uygun süre ve enerjide çapraz bağlanmasıyla üstün mekanik dayanımda ve saydamlıkta olan hibrit matrikslerin üretimi amaçlanmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında, sığır kaynaklı kornea dokularının diseksiyonunu takiben Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) tabanlı bir deselülerizasyon protokolü uygulanmıştır. Deselülerizasyon işleminin başarısının tayini için karakterizasyon testleri yapılmıştır. Bunun için Taramalı Elektron Mikroskop analizi (SEM), Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi analizi (ATR-FTIR), deselülerize ve doğal dokunun yapısal özelliklerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi için kullanılmıştır. Deselülerizasyon başarısının tespiti için hematoksilen ve eozin (HE); artık nükleusların tespiti için DAPI boyama gibi histolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Deselülerizasyon işlemi sonrası dokuda kalan artık DNA miktarının sayısal olarak belirlenmesi için PicoGreen testi; dokuda kalan glikozaminoglikan miktarının sayısal olarak belirlenmesi amacıyla dimetil metilen mavisini testi (DMMB) yapıdaki kolajen miktarının tespiti için Hidroksiprolin testi gerçekleştirilmiştir. PicoGreen test sonucuna göre, doğal dokudan %70.1 DNA uzaklaştırılarak başarılı bir deselülerize matriks elde edilmiştir. DMMB test sonucuna göre, doğal kornea ile deselülerize kornea mukayese edildiğinde deselülerize korneanın doğal korneaya göre sGAG içeriğinde %40'luk bir azalmaya sahip olduğu görülmüştür. Hidroksiprolin test sonucuna göre, doğal dokunun ve deselülerize dokunun hidroksiprolin miktarı 0.65 ± 0.01 mg ve 0.74 ± 0.01 mg olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular, literatür bilgisi ile kıyaslandığında deselülerizasyon işleminin üstünlüğü ortaya konulmuştur.

Tezin ikinci aşamasında, deselülerize edilen kornealar ile %8 konsantrasyonda üretilen jelatin metakrilat polimeri (GelMA), UV altında farklı enerji ($3200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$, $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ve $6900 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) ve farklı sürelerde (hemen, 5 dakika ve 24 saat) çapraz bağlanmasıyla karakterize edilmiştir. Doğal korneanın ve elde edilen hibrit ve deselülerize korneaların çap ve kalınlıkları ölçülmüştür. Hibrit yapıların ve GelMA polimerinin kimyasal yapısının ayrıntılı incelenmesi amacıyla, FTIR analizi yapılmıştır. Hibrit matriks, deselülerize matriks ve doğal kornea yapısı; enzimatik degradasyon, su tutma kapasitesi ve fosfat tamponlu salin (PBS) içerisinde degradasyon oranı açısından test edilmiştir. Şişme testi sonuçlarına göre, doğal

korneanın su tutma kapasitesi 85.7 ± 0.22 bulunurken, deselülerize korneanın su tutma kapasitesi 85.2 ± 3.09 , hibrit matriksin su tutma kapasitesi ise 74.2 ± 1.03 olarak tespit edilmiştir. 28 gün boyunca sürdürülen PBS içerisinde degradasyon testinin sonuçlarına göre, doğal korneada 24.73 ± 6.55 , deselülerize korneada 51.37 ± 4.29 ve hibrit korneada 50.9 ± 10.34 oranında kütle kaybı görülmüştür. Kolajenaz A ile gerçekleştirilen enzimatik bozunma testinin sonuçlarına göre, dört saatin sonunda hibrit yapı 44.68 ± 5.99 , doğal kornea 15.56 ± 2.84 ve deselülerize doku 19.98 ± 2.56 oranlarında kütle kaybına uğramıştır. Mekanik teste tabi tutulan hibrit matriksler içerisinde 24 saat GelMA polimeri emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ enerji ile çapraz bağlanan grup, diğer gruplara kıyasla ön plana çıkmıştır.

Son olarak *in vitro* yöntemle, stromal keratosit hücreleri elde edilen hibrit matriksler içerisine, GelMA ile ışıkla çapraz bağlanarak enkapsüle edilmiş ve nihai olarak proliferasyon analizleri yapılmıştır. Ekim için kullanılan hücreler, primer kültür yöntemi ile sığır korneasından elde edilerek çoğaltılmıştır. Deney gruplarına, uygun sayılarda hücre ekilmiş ve bu grupların 14 günlük süreçte hücre kültüründeki davranışları incelenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında, hücre canlılık testleri yapılmıştır. Hücre kültürünün son aşamasında, DAPI boyama yöntemi ve canlı ölü testi kullanılarak hücreler incelenmiştir. Çalışma neticesinde, hem optik hem de mekanik özelliklerin iyileştirildiği yönünde sonuçlar elde edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında, geliştirilen hibrit matriks yapılarının, kornea nakillerinin başarılı bir şekilde geliştirilmesine yönelik, umut verici bir yaklaşım olarak önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: GelMA, deselülerizasyon, kornea doku mühendisliği, kimyasal deselülerizasyon yöntemi, fotopolimerizasyon, transparanlık

ABSTRACT

HYBRID BIOMATERIAL DEVELOPMENT FOR CORNEAL TISSUE ENGINEERING

Merve UYANIKLAR

Master of Science, Bioengineering A.B.D.

Thesis Advisor: Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

Ocak 2021, 132 pages

The cornea is a transparent structure that covers 1/6 of the eye, has a convex shape, has the task of focusing light and protecting the eye from external influences, and has a major role in vision. Corneal blindness; It occurs due to damage to the tissue due to corneal traumas, bacterial and viral infections, genetic disorders. Especially in severe trauma, the tissue may need to be replaced with a suitable equivalent. Such surgical applications are performed in the form of allogeneic cornea transplantation or replacement of the artificial cornea (keratoprosthesis) with damaged tissue. Researchers are trying to produce tissue equivalents for removing pathological corneal tissue from the patient and transplanting the damaged area with tissue conjugates, with innovative perspectives provided by tissue engineering applications. In recent years, corneal tissue engineering has been applying some strategies to solve the problems encountered in the treatment of corneal ailments and injuries. These strategies are to design biomimetic matrix systems for corneal tissue conjugates such as hydrogel technique, prefabricated matrices and decellularized corneal tissues. However, there are some limitations such as insufficient mechanical strength of hydrogel systems and difficulty of sustainability. Decellularized matrices cannot serve as an ideal corneal replacement without being supported with a suitable hydrogel, due to their insufficient mechanical strength. For this reason, it is necessary to use a polymer that will improve the mechanical strength and transparency properties of the decellularized matrix.

Within the scope of this thesis, it is aimed to produce hybrid matrixes with superior mechanical strength and transparency by crosslinking deselularized matrices supported with Gelatin Methacrylate (GelMA) polymer at appropriate time and energy under UV. In the first stage of the study, a Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) based decelularization protocol was applied following dissection of bovine corneal tissues. Characterization tests were performed to determine the success of the decellularization process. For this, Scanning Electron Microscopy analysis (SEM), Total Reflectance Reduced Fourier Transform Infrared Spectrophotometer analysis (ATR-FTIR) were used to comparatively study the structural properties of decelularized and natural tissue. Hematoxylin and eosin (HE) for the determination of decellularization success; Histological analyzes such as DAPI staining were performed to detect residual nuclei. PicoGreen test to numerically determine the amount of residual DNA remaining in the tissue after the decellularization process; dimethyl methylene blue test (DMMB) to numerically determine the amount of glycosaminoglycan remaining in tissue; Hydroxyproline test was performed to determine the amount of collagen in the structure. According to the PicoGreen test result, a successful decellularized matrix was obtained by removing 70.1% DNA from natural tissue. According to the DMMB test result, when compared with the natural cornea and the decellularized cornea was found to have a 40% decrease in sGAG content compared to the natural cornea. According to the hydroxyproline test result, the amount of hydroxyproline of natural tissue and decellularized tissue was determined as 0.65 ± 0.01 mg and 0.74 ± 0.01 mg. Comparing the findings with the literature knowledge, the superiority of the decelularization process has been revealed.

In the second stage of the thesis, gelatin methacrylate polymer (GelMA) produced at 8% concentration with decellularized corneas, different energy under UV ($3200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$, $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ and $6900 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) and at different times (immediately, 5 minutes and 24 hours) is characterized by cross-linking. The diameter and thickness of the natural cornea and the hybrid and decellularized corneas obtained were measured FTIR was performed in order to examine the chemical structure of hybrid structures and GelMA polymer in detail. Hybrid matrix, decellularized matrix and natural corneal structure; tested for enzymatic degradation, water holding capacity and rate of degradation in phosphate buffer saline (PBS). According to

the results of the swelling test, the water holding capacity of the natural cornea was found to be $85.7 \pm 0.22\%$, while the water holding capacity of the decellularized cornea was $85.2 \pm 3.09\%$, and the water holding capacity of the hybrid matrix was found to be $74.2 \pm 1.03\%$. According to the results of the degradation test in PBS, which was maintained for 28 days, mass loss was $24.73 \pm 6.55\%$ in the natural cornea, $51.37 \pm 4.29\%$ in the decellularized cornea, and $50.9 \pm 10.34\%$ in the hybrid cornea. According to the results of the enzymatic degradation test performed with collagenase A, at the end of four hours, the hybrid structure lost $44.68 \pm 5.99\%$, natural cornea $15.56 \pm 2.84\%$ and decelularized tissue $19.98 \pm 2.56\%$ mass. In the hybrid matrices subjected to mechanical testing, the group that was cross-linked with an energy of $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ after 24 hours after impregnation of GelMA polymer came to the fore compared to the other groups.

Finally, by the in vitro method, stromal keratocyte cells were encapsulated into the hybrid matrix obtained by cross-linking with GelMA, and finally proliferation analyzes were performed. Cells used for sowing were reproduced from bovine cornea by primary culture method. Appropriate number of cells were sowed in the experimental groups and the behavior of these groups in cell culture was observed over a period of 14 days. Cell viability tests were performed in cell culture studies. At the last stage of cell culture, cells were examined using the DAPI staining method and the living dead test. As a result of the study, results were obtained that both optical and mechanical properties were improved.

Within the scope of the thesis, it is recommended as a promising approach for the successful development of hybrid matrix structures and corneal transplants.

Keywords: GelMA, decellularization, corneal tissue engineering, chemical decellularization method, photopolymerization, transparency transparency

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmal Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FBB-2018-16688 numaralı Bilimsel Başarı Desteği ile desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitimimi kendisiyle yapabilme şansına ulaşabildiğim, çalışmalarımın başından sonuna kadar beni destekleyen, henüz yolun başında olduğum akademik hayatımda örnek aldığım ve bundan sonra da almaya devam edeceğim değerli bilim insanı, saygı değer hocam Pof. Dr. Halil Murat Aydın'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda büyük katkıları olan BMT Group Ailesi'ne, özellikle de Levent Mete Özgürbüz'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca stresli zamanlarımı paylaşan ve çalışmalarım esnasında yardımlarıyla yükümü hafifleten ve arkadaşlıklarını esirgemeyen sevgili Laboratuvar arkadaşlarım; Gülçin Günal Karataş, Pezhman Hosseinian, Pelin Deniz, Selcen Güler, Atakan Tevlek, Bengisu Topuz ve Safa Kararmaz'a ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Liseden beri hayatımda iyi ki var dediğim biricik dostum güzel insan Damla Kurul'a teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında ilgi ve desteklerini hissettiğim, tüm kararlarımda yanımda olan, bana güvenmenin, doğru insan olmanın, çalışmanın ve emek vermenin ne demek olduğunu öğreten, hayattaki en büyük şansım olan aileme, özellikle Canım Babam Kadir Cicioğlu'na Sevgili Annem Emine Cicioğlu'na ve kardeşim Orhan Cicioğlu'na teşekkür ederim.

Emeklerinin karşılıklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim Cicioğlu ve Uyanıklar ailelerine, gösterdikleri destek ve sergiledikleri sabır için teşekkür ederim.

Ve yol arkadaşım, birlikte büyük hayaller kurup, hayat mücadelesinde mücadele verdiğim, en zor zamanlarımda bana destek olan, beni anlayan, vazgeçtiğim zamanlarda yeniden başlamamı sağlayan, umut olan, sabretmeyi öğreten, pusulam, kuzey yıldızım ve ne şartta olursak olalım beraber çiçek açtığım biricik eşim İbrahim Uyanıklar'a varlığı, desteği ve anlayışı için sonsuz teşekkür ederim. Onsuz çok daha güç olurdu.

Ve benim biricik bal oğlum Ömer Mete'm, varlığın için sana sonsuz teşekkür ederim.

Merve Uyanıklar,
Ocak 2021, Ankara

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2

2.1. Kornea ve Korneanın Yapı.....	3
2.1.1. Kornea Embriyolojisi	3
2.1.2. Kornea Anatomisi.....	4
2.1.1.3. Kornea Histolojisi	5
2.1.4. Kornea İnervasyonu.....	9
2.1.5. Kornea Metabolizması	9
2.1.6. Korneanın Optik Özellikleri	10
2.1.7. Korneanın İşlevi	10
2.1.8. Korneanın İyileşme Potansiyeli	12
2.1.9. Korneal Hastalıklar ve Tedavileri	13
2.1.10. Kornea Hastalıklarının Güncel Tedavi Yöntemleri	15
2.2. Doku Mühendisliği.....	19
2.2.1.Deselüerizasyon.....	21
2.3.Kornea Doku Mühendisliği.....	24
2.3.1. Kornea Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler	26
2.3.2. Kornea Doku Mühendisliğinde Kullanılan Doku İskeleleri ve Malzemeler	27
2.4. Jelatin Metakrilat (GelMA).....	29
3. DENEYSEL KISIM.....	32
3.1. Deselüerize Sığır Korneasının Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	32
3.1.1. Sığır Kornealarının Diseksiyonu.....	32
3.1.2. Deselüerize Matrislerin Eldesi	33
3.1.3. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi.....	33
3.1.4. Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi (ATR-FTIR) Analizi.....	34
3.1.5. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) Nükleik Asit Boyama.....	34
3.1.6. Hematoksilen & Eozin Boyaması	34
3.1.7. Deselüerize Matriste Artık Genomik DNA Miktarının Tayini	35
3.1.8. Deselüerize Matriste Sülfatlı Glikozaminoglikan (sGAG) Miktarının Tayini	36
3.1.9. Kolajenin Kantitatif Tayini.....	36
3.2. GelMA'nın Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu.....	37
3.3.Hibrit Korneaların Eldesi.....	37
3.4. Hibrit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu.....	38

3.4.1.Çap ve Kalınlık Tayini	38
3.4.2. Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi (ATR-FTIR) Analizi.....	39
3.4.3. Su Tutma Kapasitesi Tayini	39
3.4.4. Enzimatik Degradasyon Testi	39
3.4.5. PBS İçerisinde Degradasyon Testi	40
3.4.6. Işık Geçirgenliği ve Saydamlık Testi	40
3.4.7.Mekanik Testler.....	41
3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	41
3.5.1. Sterilizasyon ve Hücre Kaynağının Eldesi	41
3.5.2. Hibrit Matrikslere Hücre Ekimi Çalışmaları.....	42
3.5.3. Hücre Yapışma ve Çoğalmasının Belirlenmesi	43
3.5.3.1. Alamar Blue Analizi	43
3.5.3.2. Canlı/Ölü Boyama Analizi	43
3.5.3.3. Reselülerizasyon	44
3.6. İstatistiksel Analiz.....	44
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	44
4.1. Deselülerize Matriksin Karakterizasyonu.....	44
4.1.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM).....	44
4.1.2. Hematoksilen Eozin ile Histolojik Boyama	46
4.1.2. DAPI Boyama	47
4.1.3. DNA Miktarının Hesaplanması.....	49
4.1.4. Sülfatlanmış Glikozaminoglikan (sGAG) Miktarının Tayini.....	51
4.1.4. Kolajen Miktarının Kantitatif Tayini.....	52
4.1.2.Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi (ATR-FTIR) Analizi.....	54
4.2. Hibrit Matrikslerin Eldesi.....	56
4.2.1. Çap ve Kalınlık Tayini	56
4.1.2. Işık Geçirgenliği ve Saydamlık Analizi	57
4.1.4. Su Tutma Kapasitesi Tayini	63
4.1.5. Enzimatik Degradasyon Testi	64
4.1.6.PBS İçinde Degradasyon Testi	66
4.1.7. Mekanik Testler.....	67
4.2.2. Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi (ATR-FTIR) Analizi.....	72

4.3. In Vitro Çalışmalar	74
4.3.1. Deselülerize Matrikslere Hücre Ekimi	74
4.3.2. Canlı / Ölü Analizi	75
4.3.3. Reselüllerizasyon	76
5. GENEL SONUÇ VE ÖNERİLER	78
KAYNAKLAR	82
EKLER	93
EK 1 Kolajen Miktarı Tayini için Kullanılan Kalibrasyon Grafiği	93
EK 2 sGAG Miktarı Tayini için Kullanılan Kalibrasyon Grafiği	94
EK 3 DNA Kalibrasyon Grafiği	95
EK 4 Tezden Türetilmiş Yayın	96
EK 5 Tez Çalışması Orijinallik Raporu	Error! Bookmark not defined.
ÖZGEÇMİŞ	109

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Literatürde yaygın kullanılan deselülerizasyon çalışmalarına örnekler	29
Çizelge 3.1. GelMA karakterizasyonunda optimal koşulların belirlenmesi amacıyla test edilen parametreler	38

Çizelge 4.1. Doku iskelelerine ait kalınlık ve çap ölçümleri.	56
Çizelge 4.2. 700 nm de hibrit doku iskelelerinin ışık geçirgenlik değeri.	61
Çizelge 4.3. Doğal, deselülerize ve hibrit matrikslerin sıkıştırma modülü (MPa) ..	72

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Kornea Embriyolojisi ([12]' den uyarlanmıştır)	4
Şekil 2.2. Kornea Anatomisi ([17] 'den uyarlanmıştır).....	5
Şekil 2.3. Epitel tabakanın şematik gösterimi ([15]'ten uyarlanmıştır.)	7

Şekil 2.4. Stromal keratosit hücrelerin (20µm) [13].....	8
Şekil 4.1. Doğal korneanın boyuna kesiti Şekil A, doğal korneanın enine kesiti Şekil B, stroma katmanlarını gösteren SEM görüntüleri (100µm).....	45
Şekil 4.2. Deselülerize korneanın enine kesiti Şekil A, deselülerize korneanın boyuna kesiti Şekil B, stroma katmanlarını gösteren SEM görüntüleri (100µm)...	45
Şekil 4.3. Kornea doku kesitlerinin hematoksilin eozin boyaması Şekil A, doğal kornea Şekil B, deselülerize kornea (B) 200 µm.....	47
Şekil 4.4. İşlem görmemiş kornea Şekil A, DAPI boyaması Deselülerize matriks Şekil B, DAPI boyaması	48
Şekil 4.5. Doğal ve deselülerize matrikste artık DNA miktarı (n=3 ve *** p < 0.001).	50
Şekil 4.6. Doğal ve deselülerize dokudaki sGAG miktarı (n=3 ve *** p < 0.001).	52
Şekil 4.7. Doğal ve deselülerize korneada kolajen miktarının karşılaştırılması (n=3 ve *** p < 0.01).	53
Şekil 4.8. Doğal ve deselülerize korneanın FTIR spektrumları	55
Şekil 4.9. Farklı sürelerde GelMA emdirildikten sonra 3200 µJ/cm ² enerji yoğunluğunda çapraz bağlanan hibrit matrikslerin ışık geçirgenlik analizi (n=3) ..	58
Şekil 4.10. Farklı sürelerde GelMA emdirildikten sonra 6210 µJ/cm ² enerji yoğunluğunda çapraz bağlanan hibrit matrikslerin ışık geçirgenlik analizi (n=3) ..	59
Şekil 4.11. Farklı sürelerde GelMA emdirildikten sonra 6900 µJ/cm ² enerji yoğunluğunda çapraz bağlanan hibrit matrikslerin ışık geçirgenlik analizi (n=3) ..	60
Şekil 4.12. Doğal, deselülerize ve B3 hibrit kornea yapılarının ışık geçirgenlik değerlerinin karşılaştırılması (n=3)	60
Şekil 4.13. Farklı enerji yoğunlukları ile farklı sürelerde GelMA ile emdirilen hibrit matrikslerin şeffaflık üzerindeki etkilerini gösteren görüntüler. Gruplar 3200 µJ/cm ² , 6210 µJ/cm ² ve 6900 µJ/cm ² UV ışığına (365 nm) maruz bırakılmıştır. 200 µL GelMA polimeri üzerine emdirildikten hemen sonra çapraz bağlanmış yapılar (A), 5 dakika sonra (B), 24 saat sonra GelMA emdirilmiş hibrit matriksler (C)	63
Şekil 4.14. Doğal, deselülerize ve hibrit matrikslerin stromal yapılarının su tutma kapasitelerinin karşılaştırılması (n=3 ve ****p < 0.0001).....	64
Şekil 4.15. Doğal, deselülerize ve B3 (24 saat GelMA emdirildikten sonra 6210 µJ/cm ² UV enerjisi ile çapraz bağlanan grup) hibrit yapısının kolajenaz A enzimi ile degradasyon testi (n=3).....	65

Şekil 4.16. Doğal kornea, deselülerize matriks ve hibrit matriksin (24 saat GelMA emdirildikten sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjide çapraz bağlanan grup) PBS içinde bozunma davranışının karşılaştırılması (n=3 ve p < 0.0001).....	67
Şekil 4.17. Farklı sürelerde (hemen, 5 dakika, 24 saat) GelMA emdirildikten sonra 3200 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjisi çapraz bağlanan hibrit matrikslerin gerilim- gerinim grafiği	68
Şekil 4.18. Farklı sürelerde (hemen, 5 dakika, 24 saat) GelMA emdirildikten sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjisi çapraz bağlanan hibrit matrikslerin gerilim- gerinim grafiği	69
Şekil 4.19. Farklı sürelerde (hemen, 5 dakika, 24 saat) GelMA emdirildikten sonra 6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjisi çapraz bağlanan hibrit matrikslerin gerilim- gerinim grafiği	70
Şekil 4.20. Doğal kornea deselülerize kornea ve B3 (24 saat GelMA emdirildikten sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjisi ile çapraz bağlanan grup) hibrit matriksine ait gerilim- gerinim grafiği	71
Şekil 4.21. Deselülerize kornea, GelMA polimeri ve 24 saat GelMA emdirildikten sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV'de çapraz bağlanan hibrit matriks grubunun kimyasal yapısının FTIR grafiği	73
Şekil 4.25. 7 günlük kültürlenmiş hibrit yapılarda hücre çekirdeği dağılımının belirlenmesi. (A) 200, (B) 100 μm . [195].....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

kV	Kilo volt
cm	Santimetre
mm	Milimetre
μm	Mikrometre
nm	Nanometre
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
g	Gram
mg	Miligram
ng	Nanogram
M	Molar
mM	Milimolar
psi	İnç kare başına pound
CO ₂	Karbondioksit
DDiyoptri

Kısaltmalar

GAG: Glikozaminoglikan

ECM: Ekstraselüler Matriks

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

UV: Ultraviyole

DMEM: Dulbecco Modified Eagle's Medium

FBS: Fetal Sığır Serumumu

AA: Antibiyotik

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik asit

PBS: Fosfat Tampon Çözeltisi

DCM: Diklorometan

DMF: Dimetil formamid

EDC: 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]

NHS: N- hidroksisülfosuksinimid

GelMA: Jelatin Metakrilat

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

FTIR: Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi

H&E: Hematoksilen & Eozin

MA: Metakrilik Anhidrit

1.GİRİŞ

Kornea göz küresinin en dış katmanı olarak kabul edilen konveks biçimli ışığı odaklama ve gözü dış etkilerden koruma görevine sahip, görme işlevinde büyük rolü olan transparan bir yapıdır. Optik ortamlar arasında kırıcılığı en fazla olan kornea dokusunun saydamlığının bozulması ile görme fonksiyonu önemli derecede etkilenir. Korneal körlük, korneanın travmaları, bakteriyel ve viral enfeksiyonları ve genetik rahatsızlıkları gibi sebeplerle dokunun hasar görmesine bağlı olarak ortaya çıkar. Kornea bozuklukları dünya çapında önemli bir sorundur ve yaklaşık 10 milyon insan görme kaybından muzdariptir. Özellikle ileri derecede travmalarda dokunun uygun bir eşleniğiyle değiştirilmesi gerekebilir [1]. Bu cerrahi uygulamalar allojenik kornea transplantasyonu veya yapay korneanın (keratoprotez) hasarlı dokuyla değiştirilmesi şeklinde yapılmaktadır.

Allojenik materyaller keratoplasti operasyonlarında sıklıkla kullanılmakla beraber immün red ve donör sayısının kısıtlı olması gibi temel dezavantajlara sahiptir. Özellikle nakil işleminin ilk yılından sonra immün reddin yaşanma ihtimali %10' dan fazladır [2]. Bu nedenle araştırmacılar, kornea transplantasyonlarının kronik problemleriyle başa çıkmak için patolojik kornea dokularının yerini alacak kornea replasmanları üretmeye çalışmaktadır [3]. Bu amaca yönelik olarak son yıllarda kornea doku mühendisliği ile korneal rahatsızlıklarının ve hasarlarının tedavisinde karşılaşılan sorunların çözümüne yönelik bazı stratejiler uygulanmaktadır. Bu stratejiler, hidrojel tekniği [4], prefabrik matriksler [5], hücreleştirilmiş korneal dokular [6] gibi korneal doku eşlenikleri için biyomimetik matriks sistemlerinin tasarlanmasıdır. Ancak özellikle hidrojel sistemlerinin yetersiz mekanik mukavemete sahip olması ve sürdürülebilirliğinin zorluğu gibi bazı sınırlamaları vardır. Deselüerize matriksler ise tek başına kullanıldıkları taktirde yetersiz mekanik dayanıma sahip olacaklarından ötürü kornea doku mühendisliğinde ideal bir biyomalzeme olarak işlev göremezler [7]. Bu tez kapsamında deselüerize sığır kornealarına GelMA polimerinin farklı enerji ve sürelerde çapraz bağlanması sağlanarak hibrit matriksler üretilmiştir. Tezin ilk aşamasında deselüerize matriksler üretilerek karakterizasyonları yapılmıştır. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), hematoksilen eozin boyama (HE) ve 4',6-Diamidino-2-Fenilindol (DAPI)

boyama gibi görüntüleme teknikleri kullanılmıştır. Hücre dışı matriksteki sülfatlanmış glikozaminoglikan (sGAG) miktarının değişimi dimetil metilen mavisi (DMMB) analizi ile sayısal olarak ölçülmüş, artık DNA miktarının belirlenmesi için PicoGreen test kiti kullanılmıştır. Kolajen miktarının tayini ise Hidroksiprolin kalorimetrik test kiti ile belirlenmiştir.

Tezin ikinci basamağında jelatin metakrilat (GelMA) polimeri üretilerek deselülerize matriksle farklı UV enerjilerinde ve farklı sürelerde çapraz bağlanarak hibrit matriksler üretilmiştir. Hibrit matriks ve deselülerize matriks karşılaştırmalı olarak çap ve kalınlık tayini, ışık geçirgenliği ve saydamlık analizi, degradasyon testleri, mekanik testler, FTIR analizi gibi karakterizasyon testlerine tabii tutulmuştur. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde saydamlık ve mekanik özellikler yönünden doğal korneaya en yakın deney grubu 24 saat GelMA emdirildikten sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ enerji ile çapraz bağlanan hibrit matriks grubu olarak tespit edilmiştir.

Tezin son basamağı hücre kültürü çalışmalarını içermektedir. Elde edilen doku iskeleleri *in vitro* şartlarda incelenmiştir. Ekim için kullanılan hücreler primer kültür yöntemi ile sığır korneasından elde edilmiştir. Hücrelerin doku iskelelerine tutunma, yayılma ve canlılık başarıları incelenmiştir. Hibrit matriks yapılarına uygun sayılarda hücre ekilmiş ve 14 günlük süreçte hücre kültüründeki davranışları incelenmiştir. Bu çalışmalar neticesinde 24 saat boyunca GelMA emdirildikten sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ ve 6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ enerjide çapraz bağlanan grupların hücre yapışması ve çoğalmasında başarılı olduğu görülmüştür. 24 saat boyunca GelMA emdirildikten sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ enerjide çapraz bağlanan grubun reselülerizasyon başarısının tespiti için gerçekleştirilen DAPI boyama ile hücrelerin canlı olduğu kanıtlanmıştır.

Sunulan bu tez çalışması kapsamında, üretilen hibrit matriksler başarılı bir şekilde araştırılmış ve elde edilen en ideal hibrit yapılar kornea doku mühendisliğinde kullanılmak üzere önerilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

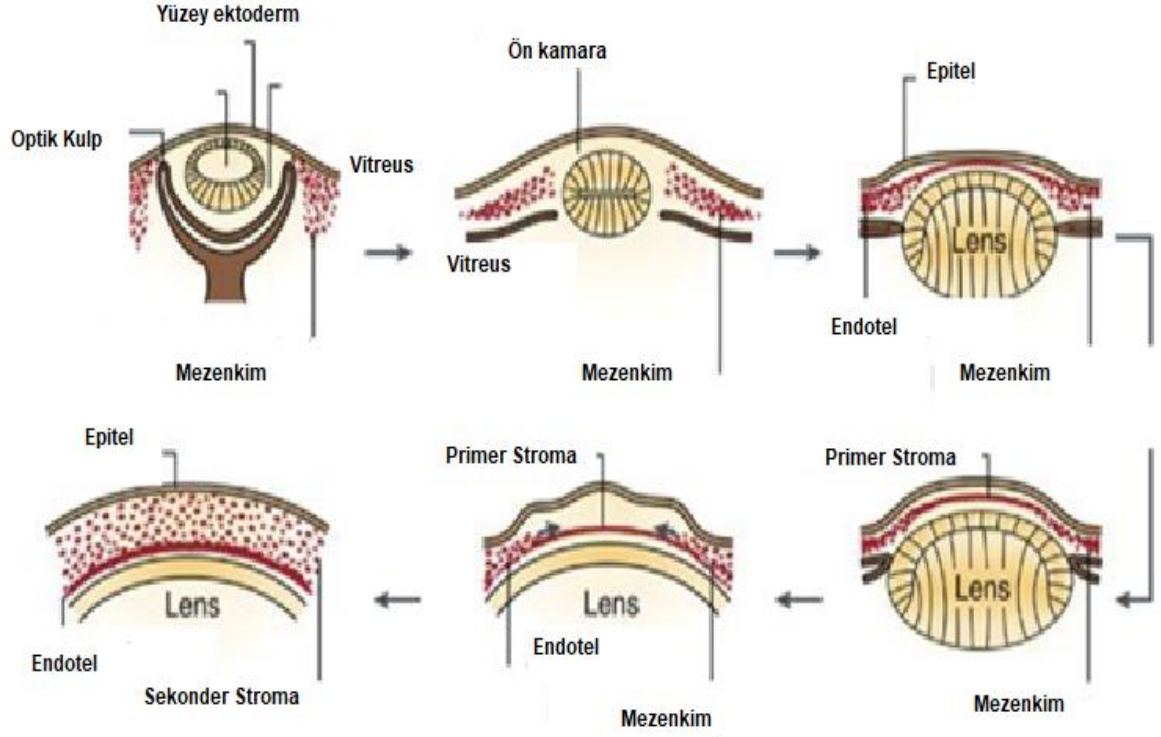
2.1. Kornea ve Korneanın Yapısı

2.1.1. Kornea Embriyolojisi

Kornea, göz küresinin altında birini oluşturan konveks biçimli saydam ve avasküler bir yapıdır [8, 9]. Korneanın gelişimi, çeşitli ektodermal türevli dokular arasındaki hücrel etkileşimleri içeren çok basamaklı bir işlemdir [10]. Temel olarak glob yapısı nöroektoderm, yüzeyel ektoderm ve mezenşim olmak üzere üç farklı embriyolojik kökenden oluşur [11]. Nöroektoderm tabakası; retina ve irisi, yüzey ektoderm tabakası kornea ve lens epitel katını son olarak mezenşim de kornea stromasını meydana getirir. Kornea endoteli ise nöroektoderm kökenli optik çanağın kristası orjinli fibroblastlardan meydana gelir.

Lens vezikülünün yaklaşık 6. haftada yüzey ektoderminden ayrılmasıyla bu katman rejenere olur. Ardından bu bölgedeki ektoderm tabakasından kornea epiteli meydana gelir. Korneanın diğer katları ve göz küresi ise ön segmenti yüzeyel ektoderm ile lens vezikülü arasına dalgalar halinde gelecek hücrelerden oluşur. Toplamda üç dalga halinde gelen mezenşim hücrelerinden sekizinci haftada gelen ilk dalgayla beraber kornea endoteli ve descemet membranı oluşur. İkinci dalgayla gelen mezenşim hücreleri kornea stromasını oluşturur [12]. İleriki gestasyonel süreçte oluşan bu hücrelere keratosit adı verilmektedir. 7. haftada 4-5 tabaka şeklinde olup hücreler arası birkaç kolajen fibril taşır.

Bu sürecin ilerlemesiyle kornea epiteli 2-3 kat hücreden oluşurken stroma 25-30 kat keratositten oluşan düzenli bir yapı haline gelir. Descemet membranı en arkadaki keratositlerle tek tabakalı endotel arasında uzanarak oluşur. 5.ayda kornea epiteli altında bulunan stroma yüzeyinin yoğunlaşmasıyla Bowman katı gelişir. 3'üncü ayda korneaya gelen duyu sinirleri kornea stromasına, 5'inci ayda ise epitel katına ulaşır [10].



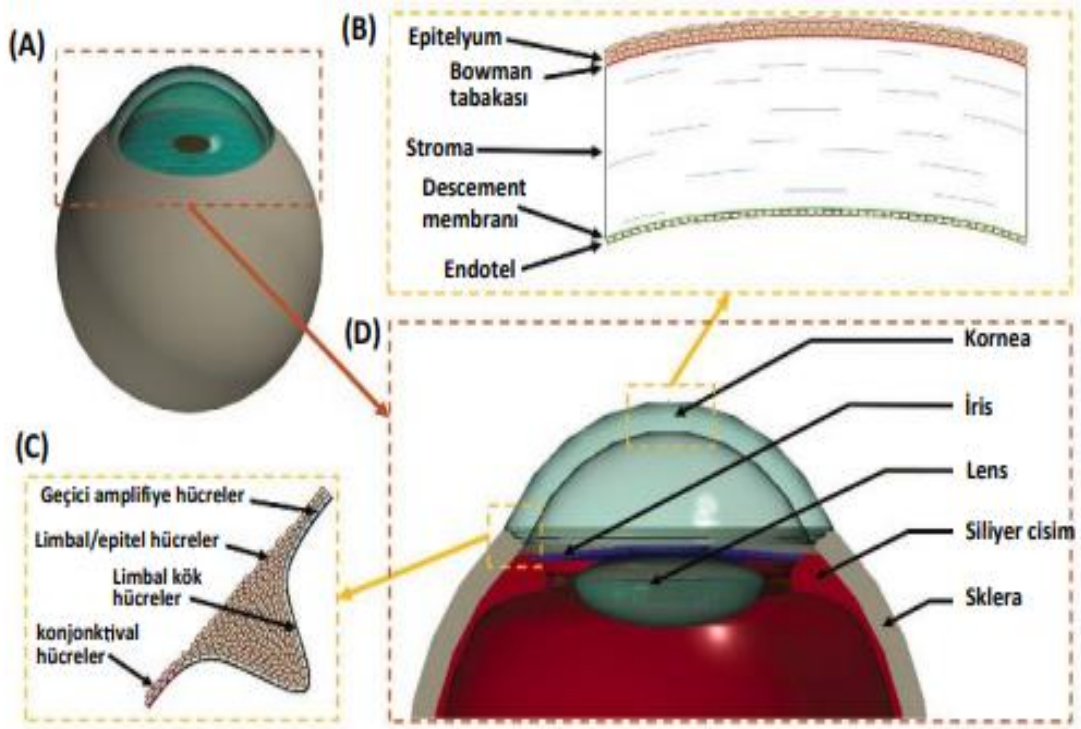
Şekil 2.1. Kornea Embriyolojisi ([13]' ten uyarlanmıştır)

2.1.2. Kornea Anatomisi

Korneanın oküler sistem ve görme yeteneği için önemi oldukça fazladır. Göz küresinin ön kısmında yer alan kornea, tüm kürenin %7'sini oluşturan saydam, avasküler tabakadır [14]. Dış çevreden gelen hasar verici etkilerden gözü korumaya yararken aynı zamanda görme yeteneğinin sağlanmasında gerekli olan kırılma gücünün %75'ini sağlar [15].

Anatomik olarak incelendiğinde kornea, gözün dış tabaka alanının büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Ortalama olarak yetişkinlerde, korneanın yatay çapı 11.5 ile 12.0 mm olup [8, 16] vertikal meridyende ise 11.7 mm'dir. Kalınlığı 535 µm olup 473 ile 596 µm arasında değişmektedir. Merkezden çevreye %23 oranında veya yaklaşık 100 µm kadar kalınlaşır ve merkezi olarak daha dik ve çevresel olarak daha yassıdır [17]. Ön yüzeyinin kırma gücü 48 diyoptri (D), arka yüzeyinin kırma gücü -5.8 diyoptri, net kırma gücü ise 43 diyoptridir. Kornea anatomik olarak 6 tabakadan oluşmaktadır. Bunlar;

- Epitel
- Bowma
- Stroma
- Descemet membranı
- Endotel tabaka
- Dua Tabakası



Şekil 2.2. Kornea Anatomisi ([18] 'den uyarlanmıştır.)

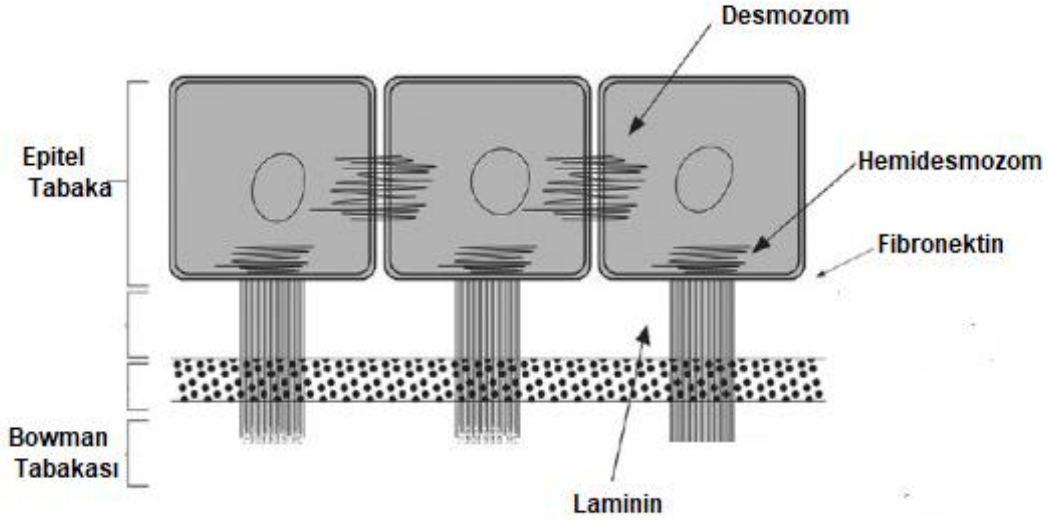
2.1.1.3. Kornea Histolojisi

İnsan korneası histolojik olarak incelendiğinde 6 katmandan oluşur. Bu tabakalar; Epitel tabakası, Bowman tabakası, Stroma tabakası, Dua tabakası, Descemet membranı ve Endotel tabakadır.

Epitel tabaka: 5 ile 7 arası hücre katmanının sıralı bir şekilde bir araya gelmesiyle oluşan kornea epiteli yaklaşık olarak 50 μm kalınlığında olup korneanın %10'una karşılık gelmektedir. Kornea epiteli ve üstündeki gözyaşı filmi hem anatomik hem de fizyolojik olarak simbiyotik bir ilişkiye sahiptir [8]. Epitel hücreler gözyaşı filminden koruyucu bir tabaka oluşturur. Bunu sağlamak için de antienflamatuar ve

antimikrobiyal faktörler salgılar [16]. Epitel tabaka; bazal kolumnar hücreler, kanatsız hücreler ve yüzeyel hücreler olmak üzere 3 tip hücreden meydana gelmektedir.

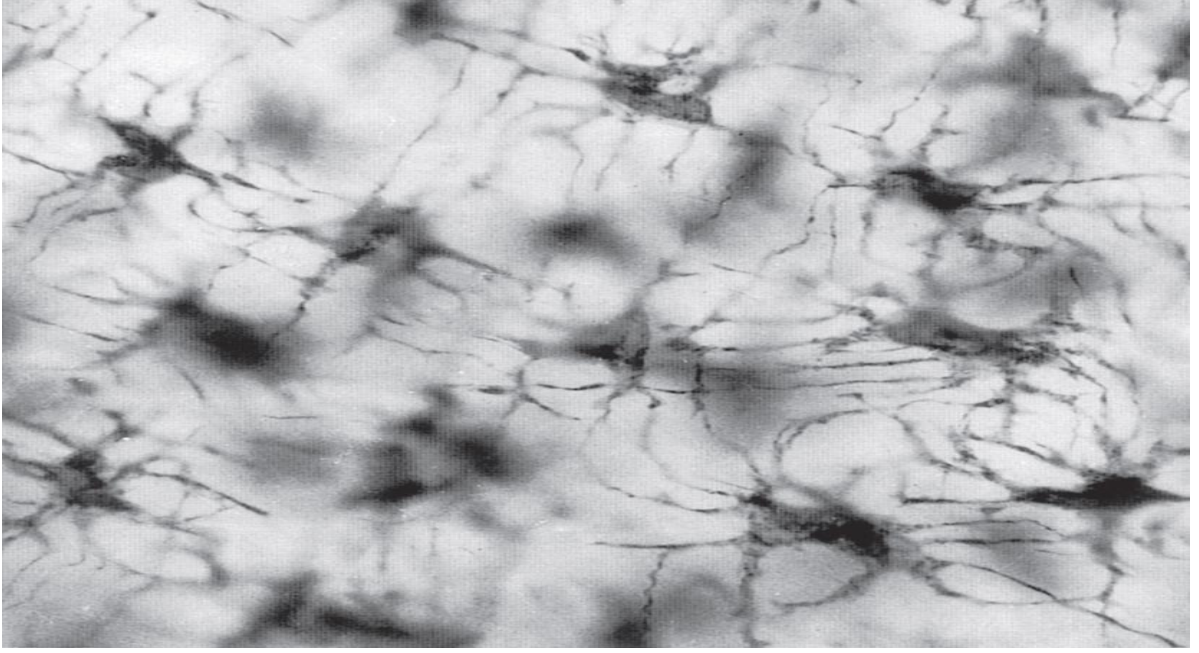
- **Bazal hücreler:** Tek tabakadan oluşan bu hücreler epitelyum bazal membranına hemidesmozomlarla yapışır. Bu bağlantı epitel tabakasının korneaya tutunmasındaki en önemli yapıdır. Bol miktarda organelle sahip ve mitotik olarak aktif olan bazal kolumnar hücreleri yaklaşık olarak 12-20 µm kalınlıktadır ve hücre yoğunluğu 6000 hücre/mm²'dir [16].
- **Kanatsız hücreler:** 2-3 sıradan oluşan bu hücrelerin ince kanat benzeri uzantıları vardır ve birbirlerine sıkı bir şekilde bağlıdır.
- **Yüzeyel hücreler:** Çapları 40-60 µm, kalınlığı 2-6 µm ve 2-3 sıra uzun ve ince poligonal hücrelerden oluşur. Bu hücrelerin aralarındaki sıkı bağlantı zonula okludenslerle sağlanır. Apikal yüzlerinde bulunan mikrovillus ve mikropikatalar sayesinde yüzey alanı artar. Ayrıca yüzeyde bulunan glikokaliks sayesinde gözyaşı stabilitesi ve kornea yüzey ıslaklığını sağlar. Yüzeyin hücrelerin bir diğer görevi ise korneal enfeksiyonlara neden olan patojenlerin tutunma yeri olmaları böylece de korneayı dış etkenlere karşı korumalarıdır. Bununla birlikte göz tarafından ihtiyaç duyulan sodyum, glikoz, O₂ ve CO₂ gibi bileşiklerin emilimini sağlar [19]. Limbal kök hücreler bazal hücrelerin çoğalmasını ve yüzeye doğru hücrelerin ilerlemesini sağlayarak yüzeysel bir tabaka oluşturur. Yüzeyel hücreler mikrovilluslar ile kaplanarak olgunlaşır ve daha sonra dökülür [20].



Şekil 2.3. Epitel tabakanın şematik gösterimi ([16]'dan uyarlanmıştır.)

Bowman Tabakası: Stroma tabakasının yüzeyel kısmını Bowman tabakası oluşturur. Kornea periferinde daha kalın olmak üzere 8-12 μm kalınlığındadır. Bu tabaka ince, şeffaf bir kolajen katmanından oluşur. Tip I ve V kolajeninden oluşan sert doku niteliğinde olan bu katman, sinir sonlanmaları dışında asellüler bir yapıdadır. Korneanın şekline katkıda bulunur. Keratosit veya fibroblast bulunmadığından dolayı travma veya yaralanma neticesinde rejenerere olamaz. Sonuç olarak hasarın konumuna ve derecesine bağlı olarak görüşü bozan yara izi oluşabilir [19, 21].

Stroma Tabakası: Korneanın en kalın tabakası olarak kabul edilen stroma; fibroblast kökenli keratositler, kolajen fibriller ve ekstraselüler matriks tarafından oluşturulmaktadır. Düzenli olarak lameller içinde paketlenmiş olan ve ön stromada daha yoğun bir organizasyon içeren kolajen fibrillerinin dağılımı arasında uzanan keratositlerden oluşur [22, 23]. Stroma yaklaşık 500 μm kalınlığındadır ve kornea toplam kalınlığının %80 ile %85'ini meydana getirir [19]. %78 oranında su ve kolajenden oluşan stroma ışığın göze uygun şekilde geçişi ve kırılması için hayati önem taşıyan korneanın küresel şeklinin korunmasında önemlidir.



Şekil 2.4. Stromal keratosit hücrelerin (20µm) [14]

Descemet Membranı: Descemet zarı, ince kolajen fibrillerden oluşan stroma ile endotel tabaka arasındaki ince tabakadır. Progresif olarak yaşla birlikte kalınlaşan bu membran ağırlıklı olarak kolajen tip IV'ten oluşup içeriğinde fibronektin ve laminin barındırır [22, 24]. Descemet membranı yaralanmayı takiben kendisini kolay bir şekilde onarabilir.

Dua Tabakası: 2013 yılında Dua H.S. ve arkadaşları “Dua tabakası” adını verdikleri, korneanın arka stroması ve Descemet membranı arasında yer alan, $10.15 \pm 3.6 \mu\text{m}$ kalınlığında, asellüler, ağırlıklı olarak tip I kolajen liflerinin oluşturduğu, 5–8 lamelladan meydana gelen, dayanıklı ve düzgün sınırlı, altıncı bir kornea tabakası tarif etmişlerdir. Bu tabakanın tanımlanmasının, arka kornea cerrahisine ve korneal biyomekaniklerin, akut hidrops, desmatosel, pre-Descemet distrofilerin anlaşılmasına katkısı olabileceği düşünülmektedir [25].

Endotel Tabaka: Korneanın en iç tabakası olan endotel tabaka; tek sıralı 400.000-500.000 civarı hücreden oluşur [24]. Endotel tabakası yüksek hücre sayısına bağlı olarak fonksiyonel bir rezerve sahip olduğundan buradaki hücrelerin zarar görmesi kalıcı fonksiyon kaybına neden olur [19, 24]. Bu nedenle endotel

hücrelerinin sayısı yaşa yada cerrahi travmaya bağlı olarak azaldığında, komşu hücreler genişleyerek boşluğu doldurur. Herhangi bir sebeple endotel hücre sayısı 300-500 hücre/mm²'ye düşerse endotelial transport mekanizması bozulur ve kronik korneal ödem gelişir. Bu tabakanın asıl görevi kornea şeffaflığını korumaktır [21]. Saydamlığın sağlanması ise endotel sayısının yeterli olmasına ve hücre morfolojilerine bağlıdır [11]. Endotel hücrelerinin iç tabakalarında sodyum potasyum adenintrifosfataz (Na-K ATPaz) pompaları yer alır. Descemet membranına bakan kısmında ise hemidesmozomlar bulunur. Endotel tabakası korneaya sıvı geçişine karşı mekanik bariyer oluşturur ve stromada birikmiş sıvının dışarı pompalanmasını sağlar [8]. Doğumda endotel tabaka kalınlığı yaklaşık olarak 10 µm iken zaman içerisinde yaş ilerledikçe 4 µm kalınlığa düşer ve sabit kalır [26].

2.1.4. Kornea İnervasyonu

Korneadaki sinir uçlarının yoğunluğu ciltten 300-400 kat daha fazladır. Bu da korneayı vücuttaki en hassas ve yoğun doku yapmaktadır [27]. Oftalmik daldan gelen arka silyer sinirler ön ve arka dala ayrılarak korneaya girer. Lifler korneaya ulaştıkları andan itibaren miyelin kılıflarını kaybederler. Korneanın ön kısmına giden sinirler epitel bazal membranı ve bazal hücreler seviyesinde sonlanır. Endotel tabakada ve descemet membranında ise sinir lifleri yoktur. Santralde ise sensivite periferden daha fazladır. Memeli korneal inervasyonunun anatomisi ve fizyolojisinin tanımları literatürde oldukça fazladır. Buna rağmen kornea sinir mimarisi ve fonksiyonunun birçok yönü tam olarak anlaşılammıştır. Korneal inervasyon, modern refraktif cerrahi işlemlerden sonra veya bazı kornea hastalıklarını takiben kornea sinirlerinin rutin olarak yaralandığını gözlemlemesi nedeniyle son yıllarda artan bir önem kazanmıştır [28].

2.1.5. Kornea Metabolizması

Kornea; damarsız ve lenfatik drenajı olmayan bir dokudur. Korneanın saydamlığının sağlanması ve dehidrasyonunun uygun oranda korunması için enerji ihtiyacı şarttır [29]. Korneanın yetersiz oksijen alımı neticesinde oluşan hipoksi; korneanın saydamlığının kaybolması, epitelyal keratit, mikrokistler, limbal hiperemi, neovaskülarizasyon gibi pek çok hastalığa yol açmaktadır [29-31].

Bahsedilen hipoksik etkilerden korunmak için korneanın yeterli derecede oksijenlenmesi gerekmektedir. Korneaya oksijen 3 yolla sağlanır. Bunlar gözyaşı tabakası, kapak damar yapısı ve hümör aközdür.

Epitel hücreleri, stromal keratositler ve endotel için birincil metabolik madde glikozdur. Epitel tabakası yapısında büyük miktarda ATP, glikojen ve oksidatif enzimler bulundurmaktadır. Glikozu stromadan pasif difüzyonla alan epitel glikojen olarak depolama görevi görür. Glikozu birincil olarak hümör aközden alan stroma bu görevi endotelden geçen taşıyıcı aracılı transport ile yerine getirir. Gözyaşı tabakası ve limbal damarlar glikozun elde edilmesi için temin edilen glikozun yaklaşık %10'unu temin etmekle görevlidir. Bu oran oldukça az olmasına rağmen elde edilen glikoz, korneada trikarboksilik asit siklusu, anaerobik glikoliz ve heksoz monofosfat yolu olmak üzere üç farklı şekilde metabolize edilir. Epitel ve endotelde ise heksoz monofosfat yolu ile glikozun %35-65'i yıkılır.

2.1.6. Korneanın Optik Özellikleri

Kornea, gözün ışığı kırma gücünün yaklaşık üçte ikisini oluşturmaktadır. Bu yapının tüm katmanları transparan yapıda olmak zorundadır. Şeffaflığın sağlanmasında bütün katmanların kırıcılık indislerinin katkısı vardır [32]. Özellikle korneanın sahip olduğu ön yüzeyin düzgünlüğü ışığın gözyaşı-hava yüzeyinde kırılmaya uğradığı şartlarda yaklaşık +4325 diyoptrilik güce sahip bir mercek görevi görmektedir. Kornea ön yüzünün kırma gücü +48 diyoptri (D), arka yüzünün kırma gücü -5,8 D'dir. Korneanın refraktif indeksi ise 1.376'dır. Kırıcılık oranı santralden perifere doğru azalmaktadır. Ayrıca yeni doğan bir bireyde kırıcılık +51 D iken ilerleyen yaşla beraber bu oran azalmaktadır [33].

2.1.7. Korneanın İşlevi

Kornea 4 temel göreve sahiptir. Bunlar; ışık kırıcılığı, saydamlığı, dehidratasyonu ve ilaç geçirgenliğidir [34]. Korneanın saydamlığı pek çok araştırmacı için ilgi çekici bir konudur. Hem saydamlığının sağlanması hem de korunması birçok parametreye bağlı olduğundan dolayı bu konu, kornea doku mühendisliği alanında en sık araştırılan konulardan biridir. Saydamlığın tam olarak sağlanabilmesi için

korneanın avasküler yapısının yanında hücreler arası ortamın kırılcılık indislerinin aynı olması ve su içeriğinin ideal olması gerekmektedir. Anatomik yapının saydamlığa etkisi, fibrillerin düzenli ve eşit mesafede olmasıyla net bir şekilde görülmektedir. Hatta eşit mesafede olmayan fibriller ışığın farklı dağılmasının bir sonucu olarak korneada bulanıklığa neden olmaktadır. Saydamlığa etki eden bir diğer faktör ise sıvı basıncıdır. Ani göz içi basıncının artmasıyla beraber korneanın saydamlığını azaltmaktadır [27-32].

Stroma tabakasında bol miktarda bulunan kolajen ve GAG yapıları nedeniyle kornea kendi ağırlığının %75–80'i kadar su tutmaktadır. Korneanın içeriğindeki su miktarını ise 5 faktör belirlemektedir. Bunlar:

1. Aktif pompanın düzgün bir şekilde çalışması korneada gerçekleşen metabolik olayları doğrudan etkileyecektir. Bu da korneada su tutumuna neden olmaktadır.
2. Endotel ve epitel tabakalarının anatomik bütünlüğü ve mekanik yapısı herhangi bir nedenden dolayı bozulursa su dengesi de bozularak korneal ödemin oluşmasına yol açar. Bu tabakalardan epitel hücreleri gözyaşına karşı, endotel hücreleri ise hem aköz hümöre karşı hem de aktif bir pompa gibi çalışarak dehidratasyona yardımcı olur.
3. Göz yüzeyinden gerçekleşen buharlaşma gözyaşının osmolaritesini artırır. Bu durumun sonucunda oluşan korneal dehidrasyon nedeniyle hipertonic gözyaşı korneadan su çeker.
4. Kornea stroması glikozaminoglikan yapıya sahiptir. Bu hidrofilik özelliğinden dolayı stromaya doğru su akımı vardır. Endotel hücreleri stromada tutulan su ve elektrolitleri aköz hümöre pompalamada görevli oldukları için gözyaşı ve aköz hümörün ozmotik yükü kornea dehidratasyonuna doğrudan etki eder.
5. Kornea dış ortamdan oksijen ve glikozu endotel tabaka sayesinde aköz hümöre iletebilir. Stromanın hidrofilik yapıda olması nedeniyle penetrasyon suda eriyen maddeler için daha kolay gerçekleşmektedir. Lipofilik maddelerin geçişinde ise endotel düzeyinde lipofilik yapı belirginleştiği için stromadan aköz hümöre difüzyon zor bir şekilde gerçekleşir. Korneanın bu özelliği sayesinde hidrofilik ilaçların kullanılması son derece faydalıdır. Maddenin molekül ağırlığı ve konsantrasyonu,

pH düzeyi ve osmolaritesi, yüzey gerilimi gibi faktörlerde korneanın geçirgenliğine etki eden diğer parametreler arasındadır [34].

2.1.8. Korneanın İyileşme Potansiyeli

Kornea, hem anatomik ve fizyolojik yapısı hem de mekanik özellikleri itibariyle benzersiz bir doku olup gözün en güçlü odaklama elmanı olarak kabul edilmektedir. Tüm bu özellikler korneanın kompleks bir yapı olmasına neden olurken bu hiyerarşide gerçekleşecek olan herhangi bir bozulma veya aksama ciddi görme bozukluklarına neden olabilir. Hatta bu hastalıkların neticesinde tıbbi müdahale yapılsa dahi görme kaybı bile gerçekleşebilir. Hasar görmüş korneaya müdahale edecek olan hekimler, tedavi için korneanın ya mekanik gücünden ya da şeffaflık parametrelerinden yararlanır. Üretilcek olan kornea doku mühendisliği ürünleri ise yine bu iki parametrenin esas alınmasından doğan ürünlerdir.

Kornea sahip olduğu mekanik gücü yapısında ihtiva ettiği kolajen lamellerden almaktadır. Saydamlık özelliği ise birden fazla parametreye sahip olup saydamlığın sağlanması ve korunması tedavilerde immün ve anjiyojenik ayrıcalığı ön plana getirmektedir. Özellikle anjiyojenik imtiyaz, yara iyileşmesinden sonra proanjiyogenik faktörlerin gelişmiş üretimini telafi etmek için anti-anjiyojenik faktörlerin üretildiği birkaç aktif kaskad içermektedir. Böylece iyileşme belli oranda hızlanmaktadır [35]. Korneanın iyileşmesi söz konusu olduğunda hücre dışı matriks (ECM), zarar görmüş alanı çevreleyen hücrelerin özelliklerini değiştirerek bu hücreleri, spesifik sinyal iletim araçlarının integrin bağımlı aktivasyonu yoluyla yaranın iyileşmesini teşvik etmek için hızla değişmektedir [36]. Bu nedenle korneanın iyileşme potansiyelini anlamak için sinyal iletim yollarını ve bunların ilişkilerini çok iyi anlamak gerekmektedir. Hücre ölümünden başlayarak, göç, çoğalma, farklılaşma ve hücre dışı matriks yeniden yapılanmasını içeren geniş bir yelpazede cereyan eden bu kompleks süreç, katmanlar arasında benzer özellik gösterebilir.

Korneal epitelinin iyileşmesi büyük ölçüde limbal kök hücrelere ve bazal membranın yeniden şekillenmesine bağlıdır. Stromal iyileşme ise büyük oranda

dönüştürücü büyüme faktörü- β sisteminin aktivasyonu nedeniyle hareketli ve kasılma miyofibroblastlara dönüşmesine bağlıdır. Endotel hücrelerinin iyileşmesi ise çoğunlukla göç ve yayılma yoluyla gerçekleşir, hücre çoğalması ise ikincil bir rol oynar [37]. Epitel ve Bowman zarını ciddi şekilde hasar almasına neden olan yaralanmalar stromada kalıcı hasara neden olabilir. Stromanın en çok hasara uğradığı yaralanmaların nedenleri ise genellikle kimyasal, termal veya mekanik aşınma gibi travmalardan hatta enflamatuar ve bulaşıcı hastalıklardan kaynaklanmaktadır [38].

2.1.9. Korneal Hastalıklar ve Tedavileri

Kornea hastalıkları dünya çapında körlüğün önemli bir nedenidir. Kornea körlüğü, katarakt ve glokomdan sonra dünya çapında üçüncü körlük nedeni olup 10 milyon kişiden biri korneal körlükten muzdariptir [39]. Korneal hastalıkların birden çok nedeni olabileceği gibi herhangi bir kaza, kimyasal maddeye maruz kalma, enfeksiyonlar, besin eksikliği, kalıtsal hastalıklar, dejeneratif hastalıklar ve travmalar gibi nedenlerden dolayı da görme kaybı yaşanabilir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2018 yılı verilerine göre dünya genelinde en az 2.2 milyar insanın görme bozukluğu veya körlüğü olduğu tahmin edilmektedir. Bu hastaların en az 1 milyarı önlenemeyecek veya henüz ele alınmamış bir görme bozukluğuna sahiptir [40].

Korneanın anatomik olarak incelenmesi optik sistemin herhangi bir bölümünde meydana gelecek olan hasarı anlamak ve tedavi etmek için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle araştırmacılar her anatomik katman için farklı çalışmalara odaklanmıştır. Kornea kaynaklı hastalıklardan bazıları şunlardır:

Kuru göz sendromu, dünya çapında son yirmi yılda tedavisi başarı ile sonuçlansa da en yaygın oküler yüzey hastalığıdır [41]. Multifaktöriyel bir hastalık olarak kabul edilen bu hastalığın tedavisinde yapay gözyaşı başta olmak üzere, antiinflamatuar ajanlar, tetrasiklinler, sekretogoglar, serum, kontakt lens, sistemik immünosupresifler ve son olarak da cerrahi müdahale tercih edilmektedir [42].

Keratit, oküler yüzeyin savunma mekanizmalarının bozulması sonucunda oluşan ve dünyadaki oküler morbiditenin önemli bir nedeni olarak kabul edilen bir hastalıktır [43]. Pek çok nedeni olabileceği gibi en sık görülen çeşidi bakteriyel keratittir. Bakteriyel keratit; ağrı, azalmış görme, göz yaşarması, kızarıklık, ışık hassasiyeti ve akıntıya neden olan bir kornea enfeksiyonudur [44]. 24-48 saat arasında hızlı bir şekilde ilerleyen bu hastalık müdahale edilmemesi durumunda körlüğe neden olmaktadır. Hastalığın tedavisinde bakterinin direnç kazanmasını önlemek için öncelikle ne tür bir bakteri olduğunun tespitinden sonra antibiyotik tedavisine başlanılır.

Korneal distrofileri; genellikle iki taraflı, simetrik, yavaş ilerleyen, çevresel veya sistemik faktörlerle ilgili olmayan, hücreleri, dokuları ve organları etkileyen otozomal dominant ve resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır [45]. Korneada bulunduğu yere bağlı olarak; ön bazal membran distrofisi (ABMD) ve Meesman'ın epitel distrofisi, stromal distrofiler arasında ise Reis-Bueckler distrofisi, kafes distrofisi, Thiel-Behnke distrofisi, granüler distrofi, Avellino distrofisi, maküler distrofi, Schnyder kristalin distrofisi, Fleck distrofisi ve konjenital kalıtsal stromal distrofi çeşitleri vardır [46].

Keratokonus; enflamatuar kökenli olmadığı halde korneanın incelmeye neden olan progresif bir hastalıktır [47]. Bu hastalık neticesinde kornea şekli bozularak öne doğru sivrilir ve koni şeklinde çıkıntı yapar.

Korneal ülser; korneal epitel ve bazal membran kaybı olarak tanımlanan bir hastalıktır. Ülserler kornea stromasına kadar uzanabildiği gibi descemet zarında oluşabilecek derin bir hasar, göz küresinin bütünlüğünü tehlikeye sokarak korneal perforasyon veya yırtılma ile sonuçlanır. Korneal ülserler ağrılıdır ve şiddetli olduklarında görme kaybına yol açabilirler. Kornea ülserlerini teşhis ve tedavi etmedeki amaç minimal skarlaşma ile hızlı iyileşmeyi teşvik etmektir [48]. Ülseratif keratitin etiyopatogenezi karmaşıktır. Epitelyal bariyere, bakteri ya da mantar enfeksiyonlarına neden olabilirler. Ayrıca mikroorganizmalar, lökositler veya kornea hücreleri proteazlar salgılayarak hasara neden olabilir. Ülseratif keratitte;

gram-pozitif bakteriler, gram-negatif bakteriler veya mantarlar bu hastalığa neden olabilir [49].

Kornea ödemi; epitel veya stroma tarafından aşırı su alımının yol açtığı patolojik bir durumdur.

Korneanın vaskülarizasyonu cerrahi işlemlerden veya bulaşıcı hastalıklardan kaynaklanabilir ve bu da şeffaflığı kritik derecede etkiler. Korneada kan damarlarının veya lenfatik damarların varlığı, korneal körlüğün en yaygın ikinci nedenidir.

2.1.10. Kornea Hastalıklarının Güncel Tedavi Yöntemleri

Anatomik yapı itibari ile incelendiğinde kornea; göz küresinin en ön kısmında yer alan ince, şeffaf bir yapıdır ve görüşü kontrol etmede önemli bir rol oynar. Korneanın herhangi bir tabakasındaki kusur görme işlevini farklı oranlarda bozabilir.

Korneal hastalıkların tedavilerinde en çok kullanılan yöntemler arasında ilaç tedavisi başta olmak üzere otolog serum, gen terapi gibi tedavi yöntemleri vardır. Bu tedavi seçenekleri korneanın hasarına ve hastalık boyutuna göre değişmekle birlikte lojistik destekler, yetişmiş doktor kapasitesi ve hastalığın dünya çapındaki prevalansı ile bağlantılı olup bütün bu durumlar tedavi sürecini etkilemektedir [50].

Geleneksel tedaviler arasında sıklıkla tercih edilen otolog serum kullanımı, genellikle enfeksiyon ve immünolojik reaksiyon riskini ortadan kaldırır. Doğal gözyaşı yapısına büyük oranda benzerlik göstermesi en büyük avantajı olmakla birlikte yapısında bulunan ek besin özellikleri sayesinde iyi bir tedavi seçeneğidir. Literatürde özellikle kuru göz sendromu hastalığının tedavisinde otolog serum kullanımının ön plana çıktığı görülmektedir [51]. Bununla birlikte enflamatuvar bir hastalık olan superior limbik keratokonjonktivit, travma veya korneal bazal membran distrofisine sekonder gelişen rekürren erozyon sendromu veya romatoid

artrit gibi hastalıklar sonucu oluşabilen persistan epitel defektleri ve graft-versus-host hastalığında da sıklıkla otolog serum kullanılmaktadır [52].

Görme kaybının sık görülen nedenleri arasında yer alan keratit ve keratokonjonktivit gibi göz enfeksiyonları için ana risk faktörleri arasında kontakt lensler, kornea ameliyatları ve oküler travmalar bulunmaktadır. Bu tip hastalıkların tedavisinde antibiyotik kullanılmaktadır. Tedavi edilmeyen enfeksiyonlar sıklıkla kalıcı göz hasarına neden olur ve kısmi görme kaybı veya körlüğe neden olur. Kornea perforasyonu meydana gelirse, görmeyi geri kazanmanın tek yolu kornea naklidir. Anti-enflamatuar ilaçların yanlış kullanımı, patojenik mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direncinin artmasına neden olabilir [53-55]. Bu nedenle zamanında ve etkili antibiyotik kullanımı çok önemlidir.

Son yirmi yılda kornea hastalıklarının tedavisinde sıklıkla tercih edilen tedavi yöntemleri arasında limbal kök hücre nakli, spesifik korneal hücrelerin kullanımı, Descemet'in sıyırma otomatik endotel keratoplastisi (DSAEK), korneanın iç tabakasının nakli (DMEK), kontakt lens yoluyla ilaç salımı ve gen tedavisi teknikleri vardır [56].

1994 yılında adenovirüs kullanılarak gerçekleştirilen gen terapisi ile edinilmiş kornea enflamatuar hastalıklarını düzeltmedeki potansiyel ortaya çıkmıştır [57]. Gen terapisi hastalığın kökenini düzeltmeye yönelik bir teknik olup uzun süreli iyileşme sağlar ve tekrarlanan uygulamalar veya klinik ziyaretleri gerektirmez. İmmün ayrıcalıklı doğası nedeniyle kornea, gen terapisi uygulamasının en rahat gerçekleştirildiği dokudur. Kornea gen terapi çalışmaları, kornea transplantasyonunun reddi, korneanın vaskülarizasyonu, korneanın perdelenmesi ve *Herpes Simpleks* Virüs'ünün sebep olduğu herpetik stromal keratiti gibi hastalıklara çözüm bulmuştur [58, 59]. Başarılı bir gen terapi tedavisi, yeterli düzeyde terapötik gen seviyelerinin kornea hücrelerine verilmesi, spesifik hücre popülasyonlarını hedefleyebilme yeteneğine ve patolojik süreçleri sonlandırmak veya engellemek için yeni hedeflerin tanımlanmasına bağlıdır. Bu amaç doğrultusunda çeşitli vektörler, hedefleme teknikleri ve stratejiler geliştirilmiştir [60].

Farklı viral ve nonviral vektörler; *in vitro*, *ex vivo* ve *in vivo* olarak korneaya genleri sokmak için kullanılmaktadır. Viral vektörler arasında; adenovirüs, adeno-bağlantılı virüs (AAV), retrovirüs ve lentivirüs vektörleri tercih edilirken nonviral vektörler arasında; plazmid DNA, lipitler, polimerler ve nanopartiküller başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu vektörler topikal uygulama, gen tabancası, elektroporasyon, intrastromal enjeksiyon ve iyontoforez gibi çeşitli fiziksel teknikler kullanılarak hedef gene verilmektedir [59].

Önleyici stratejiler olarak kabul edilen tedavi seçeneklerinin başarısız olması halinde ileri kornea hastalıklarının tedavisinde en etkili yol kornea transplantasyonudur. Kornea nakli tüm organ nakilleri arasında en yüksek başarı oranına sahiptir. Yapılan araştırmalara göre nakilden sonra sağlıklı greft oranı %94'tür [63]. Bu başarı oranının sağlanmasında etkili olan kriterler şunlardır:

- 1) Korneanın avasküler bir yapıya sahip olması
- 2) İmmünolojik yapısı nedeniyle greft reddinin az olması
- 3) Donör dokudan geçebilecek hastalık riskinin çok az olması [64]
- 4) Descemet'in sıyırma otomatik endotel keratoplasti (DSAEK) yöntemi sayesinde hasarın daha erken düzelmesi, yara ve sütür ile ilgili komplikasyonlar, intraoperatif ve geç suprakroidal kanama riski açısından daha etkili bir teknik olduğunun kanıtlanması [65]
- 5) Viskoelastikler, elmas bıçaklar, ultrasonik pakimetri, intraoperatif optik koherens tomografisi, yapay ön odalar, gelişmiş mikrokeratomlar ve femtosaniye lazer gibi enstrümantasyondaki ilerlemeler

Günümüzde keratoplasti dünyada en çok yapılan ve başarı oranı en yüksek doku naklidir. Son 10 yılda tam kalınlıkta olan korneanın bütün katmanlarının değiştirilmesinden ibaret olan penetran keratoplasti işlemi oldukça fazla tercih edilmektedir [61, 62]. Penetran keratoplastinin endikasyonları arasında greft yetmezliği, greft replasmanı, Fuchs Endotel Distrofisi, psödofakik veya afakik

büllöz keratopati, enfeksiyonlar ve çeşitli travmalar vardır [63]. Bu teknikte alıcının kornea endoteli korunmadığından endotelyal rejeksiyon riski mevcuttur. Bu işlem intraoküler bir cerrahi tekniği olup işlem sırasında ekspulsif hemoraji ve cerrahi sonrasında uzun dönem steroid kullanımına, sekonder katarakt ve glokom gibi birçok ciddi komplikasyona neden olabilir. Bu tekniğin dezavantajları neticesinde endotelin korunduğu keratoplasti teknikleri günden güne gelişmekle beraber ilk tedavi seçeneği olmaya başlamıştır.

Lameller cerrahisinin ön plana çıkmasının ardında korneal mikro anatomi ve mikro cerrahi alanındaki gelişmeler büyük önem arz etmektedir. Özellikle stroma ve endotel tabakasının patolojik olarak derinlemesine incelenmesi bu alanın gelişmesine olanak sağlamıştır. Lameller keratoplastinin temel prensibi hastanın anterior korneal dokularının descemet ve endotel bütünlüğüne dokunulmadan eksizyonu ve donörden alınan sağlıklı anterior dokuların bu bölgeye transplantasyonudur [64]. Lameller keratoplastinin tercih edilmesinin nedenleri arasında; alıcı endotelindeki kaybın minimum düzeyde olması, düşük rejeksiyon oranı ve uzun greft ömrü olması sayılabilir. Bu avantajlar penetran keratoplastiyi endotel tabakası ve descemet tabakasının zarı iyi bir şekilde korunup sadece stroma değiştirildiği için ve endotel reddinden kaynaklanan başarısızlık riski tamamen önlenmesinden dolayı geri planda bırakmaktadır. Diğer bir olası senaryo olan hastanın endotel tabakasının değiştirilmesi gereken durumlarda ise göz küresinin bütünlüğüne herhangi bir zarar gelmeyeceği için özellikle indüklenen astigmatizma kısmen veya tamamen önlenmektedir [65].

Lameller keratoplasti birkaç yolla yapılmaktadır. Bunlardan birisi Anterior Lameller Keratoplasti (ALK) tekniğidir. Bu teknikte descemet membranının korunması esas alınırken, ihtiyaç halinde stromal doku nakli de yapılabilir. Bir diğer teknik olan Derin Anterior Lameller Keratoplasty (DALK) işlemi ise descemet seviyesine kadar ön lamelin değiştirilmesidir [66, 67].

Gelişen teknoloji ve korneanın yapısının daha ayrıntılı incelenmesi sonucunda keratoplastinin kendi içerisinde farklı teknikleri gelişsede tam anlamıyla başarılı

sonuçlar elde etmek için günümüzde süregelen klinik, sosyal ve lojistik engellerin aşılması gerekmektedir. Gelecekteki hangi nedenden kaynaklandığı nemsensemeksizin geniş bir yelpazede korneal körlüğün önlenmesi için dünya genelinde büyük yatırımlar yapılmaktadır. Ümit vaat eden bu yatırımlara rağmen gün geçtikçe ihtiyacı artan kornea transplantasyonunun önündeki engeller korkutucu olmuştur. Sınırlı doku mevcudiyeti, eğitimli kornea cerrahlarının eksikliği, dini ve kültürel inanışlar bu konuda karşılaşılan dezavantajlar arasındadır [68].

2.2. Doku Mühendisliği

“Doku mühendisliği” terimi, 1988 yılında Ulusal Bilim Vakfı’nda biyomalzemeler başta olmak üzere doku iskelelerini ve büyüme faktörlerini destekleyen hücrelerden dokuların yenilenmesine odaklanan yeni bir bilimsel alanı temsil etmek için ortaya atılmıştır. Literatürde doku mühendisliği; doku fonksiyonunun veya bir organın iyileştirilmesi, korunması veya geliştirilmesine yönelik tıp, mühendislik, fen bilimlerini ve yaşam bilimlerinin ilkelerini kapsayan disiplinler arası bir bilim dalı olarak tanımlanmaktadır [69]. Başka bir deyişle insan vücudunun eşsiz yapısal karmaşası karşısında hücreden başlayarak organ seviyesinde ortaya çıkan yapıların yeniden inşa edilmesine ve fonksiyonlandırılması esasına dayanan bir bilim dalıdır [70]. Doku mühendisliği kavramı ortaya atıldığı ilk günden beri birçok problemle karşı karşıya gelmiştir. Bunlar;

1. Geliştirilmek istenen dokunun doğal yapıya maksimum oranda benzemesi için kütle transferi ve biyolojik ortamını st düzeyde biyomimetik olarak oluşturmak
2. Ticari olarak anlamlı ölçekte hücresel mikro evre oluşturmak için genel ölçeklendirme zorluklarının üstesinden gelmek
3. Klinik ve ticari olarak anlamlı ölçekler üzerinde uygun süreç ve kalite kontrolünü ekonomik olarak sağlayabilmek
4. Hücre tedavileri ve yaşayabilir dokuların nakli için gerekli olan uygun hücre kullanımı ve koruma prosedürleri de dahil olmak üzere doku mühendisliği teknolojilerinin klinik ortamlarda uygulanması [70]
5. Allogreft yöntemlerin organ donörü gerektirmesi ve hlihazırda bulunan donrlerin yetersizliği gibi nedenlerden dolayı tercih edilmemesi

6. Organ bağışçısı yetersizliği her yıl arttığı için nakil yöntemi sınırlı hale gelmesi gibi sebeplerdir.

Literatürde geniş çapta ele alınan bu sorunlara rağmen günümüzde hasarlı doku veya organların in vivo olarak işlevselliğini ve fonksiyonunu yeniden kazandırmak veya başarıyla değiştirmek için doku mühendisliği teknikleri kullanılabilmekte ve başarılı sonuçlar alınabilmektedir.

Doku mühendisliği çatısı altında kalp [71], kemik [72], kıkırdak [73], kan damarları [74], kalp kapakçığı [75], trekea [76], kornea [77] ve diğer birçok dokuya ait çalışmalar mevcuttur. Bu multidisipliner bilim dalı gün geçtikçe gelişip daha fazla önem kazanmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde doku mühendisliği ve rejeneratif tıp pazarı, 2009 yılında 6.9 milyar dolara yükselirken 2018'de yaklaşık 32 milyar dolar olacağı tahmin edilmiştir [75]. Bu pazara bakıldığında cilt epidermisi, kornea epiteli ve kıkırdak gibi dokuların avasküler yapıda olmalarından dolayı ön plana çıktığı, karaciğer gibi metabolik aktivite açısından oldukça fonksiyonel olan dokuların ise arka planda kaldığı görülmektedir.

Bilim dünyasının en güçlü referans noktası haline gelmeye başlayan doku mühendisliği alanında atılan ciddi adımlar beraberindeki multidisipliner bilim dallarını da oldukça önemli bir hale getirmektedir. Bu nedenle hem doku mühendisliği çeşitleri hem de tamamlayıcı bir unsur olarak kabul edilen rejeneratif tıp teknikleri topyekûn olarak büyük önem arz etmektedir.

Doku mühendisliği uygulamaları 3 temel komponentten meydana gelmektedir;

- Hücre içi ve dışı taşıyıcı görevini üstlenen ekstraselüler matriks yapısı (ECM),
- Hücrelerin üremesini farklılaşmasını sağlayan sinyal yolları ve sitokinler,
- Hasarlı ya da nekroz dokuların tekrar oluşturulmasını sağlayacak hücreler

Doku mühendisliğinin nihai varış noktası istenilen yapıya fiziksel bir form kazandırmak olduğu için bahsi geçen komponentlerin başarılı ve verimli bir etkileşimi gerekmektedir. Bu nedenle her çalışma kendine özel olmakla birlikte her

problemin de multidisipliner alanda bir çözümlü vardır. Başarılı bir doku mühendisliği çöktüsünün ilk parametresi doku iskelesinin başarılı bir şekilde üretilmesi esasına dayanmaktadır. Çünkü üretilmek istenen doku eşsiz bir mimariye sahip, düzenli hücrelerden oluşan, hücre dışı matriks (ECM) ve ECM bileşenleriyle kompleks bir yapıya sahiptir. Bu bağlamda üretilcek olan dokunun insan vücudunda başarılı bir şekilde görevini yürütebilmesi için doku iskelesinin başarılı bir şekilde modüle etmek tasarımının en önemli parametresidir [75].

İdeal bir doku iskelesinin sahip olması gereken özellikler:

- Kullanılan malzeme biyoyumlu ve biyobozunur olmalı [78]
- Malzeme immünojeniklik veya sitotoksik etki göstermemeli
- Malzemenin mekanik özellikleri yeterli olmalı ve kullanım sırasında ve hastanın normal aktiviteleri sırasında çökmemeli [79]
- İnsan vücuduyla temas eden tüm materyallerde olduğu gibi, doku iskelelerinin enfeksiyonu önlemek için kolayca sterilize edilmesi gerekir
- Maliyeti uygun olmalı
- Malzeme kolay bir şekilde imal edilmelidir ve hücre sel metabolik atıkların uzaklaştırılması için gerekli olan üç boyutlu gözenekli bir yapıyı oluşturmalı [78]

2.2.1. Deselülerizasyon

Doku mühendisliği alanında yıllardır "altın standart" olarak kabul edilen otogreftler immün reddin yaşanmaması açısından rahat bir uygulama olmuştur. Fakat sınırlı olmaları açısından getirdikleri dezavantaj deselülerizasyon tekniğinin ortaya çıkmasına zemin hazırlamıştır. Deselülerizasyon yani hücre sızleştirme; ksenojenik hücrelerin ve antijenlerin uzaklaştırılması ile ksenogreftlerin bağışıklık bariyerini ortadan kaldırmayı ve bu arada doğal hücre dışı matriksi doku iskelesi olarak kullanmayı amaçlamaktadır [80, 81]. Literatürde mevcut olan tüm deselülerizasyon çalışmalarında ortak amaç dokunun ekstraselüler matriks (ECM) yapısının bozulmaması ve buna bağlı olarak elde edilecek doğal iskele yapısının kalıp olarak hücre ekimi ve doku mühendisliğinin diğer gerekli unsurları ile yapılandırılmasıdır. ECM:

1. İçeriğinde proteinlerin çeşitliliği ve farklılığıyla, glikozaminoglikanlarla ve diğer moleküllerle her dokuya özgü karakteristiktir.
2. Büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, matriks degrade eden enzimlerin ve inhibitörlerinin aktivitelerini düzenleyerek hücresel davranışı yönetmektedir.
3. Yapısındaki temel yapısal proteinlerle mekanik dayanımı ve elastisiteyi sağlamaktadır.
4. Fibronektinin yapısında hücre yapışmasında önemli görev alan Arg-Gly-Asp (RGD) sekansları oldukça fazladır. Bu sayede hücre matriks etkileşimlerinde oldukça önemli rol oynar.
5. Kondroitin sülfat, heparin sülfat, heparin ve hyalüronik asit gibi ECM yapısında bulunan glikozaminoglikanlar da çeşitli büyüme faktörlerini ve sitokinleri bağlar, dokunun su tutmasını düzenler ve ECM'nin özelliklerine katkı sağlar [82].

ECM yapısı yukarıda bahsedilen görevleri neticesinde deselülerizasyon protokollerinin hepsi için korunması gereken önemli bir parametredir. Sonrasında elde edilecek ECM yapısı immün rejeksiyona ve inflamasyona sebep olan zenojenik/allojenik hücresel antijen kaynaklarının maksimum verimle dokudan uzaklaştırılmasının getirdiği başarı ile deselülerizasyon işleminin başarısını ortaya koymaktadır. Başarılı bir deselülerize matriksin doğal makro ve mikro yapısı kök hücrelerin çoğalması ve özelleşmesi için uyumlu bir platform görevindedir.

Deselülerizasyon işlemi; kimyasal, enzimatik, fiziksel veya bu tekniklerin beraber kullanılmasıyla gerçekleştirilebilir. Bu noktada dikkat edilmesi gereken en önemli unsur hedeflenen dokunun ECM yapısının hangi teknikte daha iyi muhafaza edileceğinin tespit edilmesidir. Mevcut deselülerizasyon stratejilerinin hem avantaj hem de dezavantajları vardır. Deselülerizasyon yöntemlerinin ilk basamağı hücre membranının parçalanmasıdır. Bu süreç sitoplazmik ve hücre membran bileşenlerin çözünmesiyle ve doku hücre kalıntılarının yapıdan uzaklaştırılmasıyla son bulmaktadır. Deselülerizasyondan sonra kalan tüm kimyasallar oluşturabilecekleri olumsuz konak doku yanıtını önlemek için yapıdan uzaklaştırılmalıdır. Deselülerizasyon işlemi sona erdiğinde ECM'nin ne durumda olduğu çeşitli yöntemlerle tespit edilebilir.

Doku deselüerizasyonunda yaygın olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Fiziksel deselüerizasyon yöntemleri; karıştırma, sonikasyon, mekanik kuvvet, basınç ve dondurup çözmedir. Bu yöntemlerin kullanımıyla hücre zarının büyük oranda hasarı sonucunda nükleus ortaya çıkar ve yapılan yıkama işlemleri ile ECM yapısından istenilmeyen komponentler uzaklaştırılır. Tek başına yeterli bir deselüerizasyon yöntemi olmayan fiziksel deselüerizasyonda ek protokollere ihtiyaç duyulmaktadır. Biyolojik deselüerizasyon yöntemleri enzimatik ve enzimatik olmayan ajanların kullanılmasıyla çeşitlilik göstermektedir. Enzimatik ajanlara örnek olarak; tripsin, dispaz, Fosfolipaz A2, Sera ve Nükleazlar (RNAaz, DNAaz) verilebilir. Serin proteazı ailesine mensup olan Tripsin; deselüerizasyonda yaygın olarak kullanılan bir enzimdir. Hücre yapışma proteinlerinin arjinin ve lizin aminoasitlerinin karboksil uçlarındaki peptit bağını kopararak hücrelerin doku yüzeyinden ayrılmasını sağlar [83]. Tripsin; kolajene karşı dirençli olmaması, hücreleri dokudan uzaklaştırırken daha uzun zamana ihtiyaç duyması açısından bazı dezavantajlara sahiptir. Enzimatik olmayan ajanlara ise Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) örnek olarak verilebilir. EDTA ile tripsinin beraber kullanıldığı deselüerizasyon çalışmalarında büyük ölçüde başarı sağlanmıştır [84]. Kimyasal deselüerizasyon yöntemleri arasında; alkoller (etanol, gliserol), asit ve bazlar (Perasetik asit, Amonyum hidroksit), iyonik deterjanlar (SDS), iyonik olmayan deterjanlar (Triton x 100), hipo ve hipertonic deterjanlar (NaCl, Tris HCl) yer almaktadır. Deselüerizasyonda deterjanların kullanımı yüksek verimde sonuç elde edildiği için sıklıkla tercih edilmektedir. Hem hücre zarını parçalayıp hem de DNA'yı proteinden ayırabilme özelliklerinden dolayı deselüerizasyon protokollerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar.

Tez çalışmalarında Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) tabanlı deselüerizasyon yöntemi tercih edilmiştir. SDS oldukça yüksek bir verimle hücreleri ve hücre sel artık materyalleri dokudan uzaklaştıran bir deterjandır. SDS protokolü, doğal dokunun yapısal konformasyonunu bozabilir. Dokudaki GAG miktarının azalmasına sebep olurken kolajenin de yapısal bütünlüğünü bozarak yapının mekanik dayanımını olumsuz yönde etkiler [85]. Bu gibi nedenlerle ECM yapısında bozulma hatta gevşeme görüleceği için deselüerize dokunun mutlaka bir hidrojelle desteklenmesi gerekmektedir [86].

Başarılı bir deselüerizasyon işlemi; deselüerizasyon protokolünün seçimi ve doğru bir şekilde uygulanmasına bağlıdır. Kullanılan deterjanın cinsi ve miktarı, dokuda bekleme süresi, dokudan uzaklaştırılma yöntemi deselüerizasyon başarısını etkileyen kriterler arasındadır [145].

2.3. Kornea Doku Mühendisliği

Kornea; anatomik lokalizasyonu nedeniyle sürekli olarak aşındırıcı, mekanik kuvvetlere ve kimyasal travmaya maruz kalan, kendi içinde bütün hücresel fonksiyonları yönlendirmeye ve düzenlemeye yardımcı olan son derece özel ve benzersiz şeffaf bir organdır [36, 87]. Korneanın işlevinin kaybı hastalıklara ve hasara bağlı olarak şeffaflığını kaybetmesi ve geri dönüşümsüz olarak avasküler yapısını kaybetmesine sonuç olarak da görme kaybına neden olmaktadır. 2012 yılında yapılan bir araştırmaya göre 285 milyon insandan 39 milyonu görme engellidir. Bu vakaların nedenleri arasında; katarakt (% 51), glokom (% 8) ve yaşa bağlı makula dejenerasyon (% 5) gibi sıklıkla görülen hastalıklar yer almaktadır [88, 89].

Kornea hasarına bağlı körlüğünün geri dönüşsüz bir şekilde yaşanmasının ardından tek iyi tedavi seçeneği allogreft nakillerdir. Bu nedenle, zarar görmüş veya hastalıklı korneaların yerini almak için biyomalzemelerin geliştirilmesinde önemli çalışmalar yapılmıştır. Allogreftlerin; immün red, bazı bulaşıcı hastalıkların etkisi, popülasyonun yaşlanması, cerrahi yetersizlik ve mekanik nedenler gibi birçok dezavantajı olmasına karşın kullanım alanı oldukça geniştir [87]. Ksenograftlar ise bir türden farklı bir türe gerçekleşen nakillerin tümünü kapsamaktadır. İnekler, köpekler, balıklar, domuzlar, domuzlar, koyunlar ve tavşanların kullanımı da dahil olmak üzere hayvansal korneaları insanlara nakletmek için birçok çalışma yapılmıştır [90]. İnsan korneasına fizyolojik ve optik özelliklerinin diğer hayvanlara oranla daha çok benzemesinden dolayı domuz karşımıza en sık tercih edilen hayvan olarak çıkmaktadır [91].

Keratoplasti son yıllarda ciddi oranda gelişen ve kullanılan bir yöntemdir. Günümüzde klinikte çoğunlukla penetran keratoplasti, derin anterior lameller

keratoplasti ve endotel keratoplasti gibi korneal transplantasyon teknikleri sıklıkla kullanılmaktadır. Buna rağmen keratoprotezler dezavantajları bakımından incelendiğinde sosyal ve bilimsel iki mesele etrafında toplanmaktadır. Bunlar; dini ve kültürel faktörlerin getirdiği sorunlar, eğitim eksikliği, göz bankalarının yeterli sayıda olmaması, bağışçı sayısının az olması, yaşlanan popülasyona orantılı olarak genç kornea bağışının az olması gibi faktörlerdir [61, 92]. Karşılaşılan bu sorunların çözümüne yönelik geliştirilen yapay kornealar, yetersiz mekanik mukavemete (yoğunluk, tokluk ve plastisite) sahip olmaları nedeniyle cerrahi dikiş işlemine karşı dayanıksızdır. Ayrıca yapay kornea iskelesinin malzemesi ve yapısı, kornea dokusunun kalıcı ve buna ek olarak biyolojik açıdan tamamen iyileşmesi için yetersiz kalmaktadır. Keratoplasti sonrası immünolojik greft rejeksiyonu diğer organ transplantasyonlarına göre daha nadir görülse de greft rejeksiyonu hâlen greft başarısızlığının en sık nedenidir. Aslında diğer transpantasyonlara göre rejeksiyonun daha az görülmesinin başarısı korneanın avasküler doğası, immünsupresif oküler mikroçevre ve immün olarak ayrıcalıklı olması ile ilişkilidir [1].

Şimdiye kadar ideal bir keratoprotezin gerekliliği defalarca belirtilmesine rağmen yaygın olarak kabul edilen bir kornea ikamesi mevcut değildir [93]. Buna rağmen kornea doku mühendisliği için ideal bir kornea replasmanının başlıca bir takım özelliklere sahip olması beklenilmektedir ve bu özellikler şu şekilde sıralanabilir:

1. İnsan korneasına biyomimetik olarak maksimum oranda benzemelidir.
2. Biyoyumluluğu ve optik olarak saydamlığı doğal korneaya benzemelidir
3. Ameliyat sırasında kolay uygulanabilir ve düşük maliyette olmalıdır [94].

Günümüzde kullanılan yapay korneaların ideal bir ürün çıktısı haline gelebilmesi için bahsedilen mevcut dezavantajlar üzerine yoğunlaşan araştırmacılar, bu sorunları çözmek için yapay kornea iskelesinin mekanik özelliklerinin ve alıcı kornea dokusu ile biyolojik iyileştirme işlevinin artırılmasına odaklanmıştır. Bunun sonucu olarak literatürde önerilen birçok yaklaşım ortaya çıkmıştır ve sayısız araştırmacı kornea hücrelerini tipik bir şekilde *in vitro* bir iskelede ekip büyütme yöntemiyle kornea eşdeğerlerini oluşturmaya çalışmıştır [95]. Diğer yandan kornea doku mühendisliği alanında bugün gelinen son noktada, hücre fenotipi ve doku mimarisi açısından *in vivo* muadillerini taklit etmek üzere tasarlanmış insan doku

mühendisliği kornealarının geliştirilmiştir. 3 boyutlu kornea doku iskelelerinin kullanımı temel araştırma veya klinik amaçlar için oldukça faydalı olmuştur [92].

Son yıllarda mevcut yaklaşımların hem avantaj hem de dezavantajları göz önüne alındığında tamamlayıcı bir parça olarak karşımıza çıkan hücre tabaka mühendisliğinin kullanımı birçok sorunun çözümüne olanak tanımıştır. Literatürde transplantasyonlar için allogreftlere alternatif olarak tüm korneanın veya tek tek katmanlarının yeniden yapılandırılması için bir dizi doku mühendisliği yaklaşımı araştırılmıştır [96]. Özellikle korneal yara iyileşmesi önemli bir klinik problem olup oldukça karmaşık bir süreçten ibaret olduğu için iyileşme mekanizmalarını ve bu mekanizmalara etki eden faktörleri anlamak, yeterli bir iyileşme yanıtını uyarmaya duyarlı büyüme faktörlerini doğru biçimde kullanabilmek önem arz etmektedir. Bunun için pek çok iyileşme modeli kullanılmıştır [97-100]. Korneanın tek bir katmanının modellendiği tek tabakalı kornea modellerinden 3 boyutlu doku modellerine kadar geniş bir yelpazeye sahiptir. Tek tabaka hücre mühendisliğinde kullanılan *in vitro* modeller doğal korneadan daha az karmaşık olup kullanım kolaylığı ve hızlılıkları nedeniyle ilgi çekicidir [101, 102]. Fakat epitel-mezenkimal etkileşimlerden ve sınırlı epitel kalınlığından dolayı dezavantaja sahiptirler. Bu noktada kullanılan hayvan modellerinde kornea yarası iyileşmesi çalışmaları çok pahalıdır [103]. Ayrıca köpek, kedi gibi hayvanlarla yapılan *in vivo* hayvan deneyleri, hayvanlar arasındaki doğal değişkenlik nedeniyle gerçekleştirilmesi hem pahalı hem de zordur [104, 105]. Bütün bu dezavantajlar *in vitro* kornea doku modellerine olan talebi gün geçtikçe artırmaktadır. Bu bağlamda kornea doku modellerinin en büyük avantajı ilaç sektörü için hayvan deneylerinin sayısını azaltmasıdır [106]. 3 boyutlu yapı iskelesine sahip bir korneanın *in vitro* hastalık modelleri bağlamında kullanımı; korneanın doku yapısı, fonksiyonu, sinir, epitel, stroma ve endotel hücre tiplerinin ayrıntılı incelenmesi gibi durumlara olanak sağlamıştır [92].

2.3.1. Kornea Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler

Kornea doku mühendisliğinde kullanılan hücreler korneanın ilgili katmanından izole edilerek kullanılmaktadır. İzole edilen kornea epitel hücreleri, limbal korneal epitel hücreleri rekonstrüksiyonun işlemlerinde kullanılmaktadır [107-109]. Stroma

tabakasının rekonstrüksiyonu için primer stromal hücreler, hücre hatları, dermal fibroblastlar kullanılmaktadır. Endotel tabakanın rekonstrüksiyonu için ise yine bu tabakadan izole edilen endotel hücreleri veya endotelyal hücre hatları kullanılmaktadır [110].

Korneal stromanın temel hücreleri olan keratositler mezenkimal kökenli hücrelerdir. Erişkin bir kornea dokusunda mitoz bölünmeye sahip değildir. Dendritik bir morfolojiye sahip olup yapılarında bolca Aldehid Dehidrogenaz (ALDH) ve CD-34 bulundurlar [111]. Yara iyileşmesi durumunda aktive olan keratositler, dendritik morfolojilerini fibroblast ya da myofibroblastlara dönüştürür. Ayrıca keratositler tarafından sentezlenen proteoglikan kompozisyonu korneal şeffaflığın önemli bir parametresidir. Keratositler, farklılaşma yeteneği fazla miktarda olan mezenkimal kök hücrelerden oluşur. Bu hücreler kornea epitelyum kök hücrelerinin yakınındaki limbal stromada bulunur [112]. Farklılaşma yeteneklerinden dolayı kök hücrelerin kornea doku mühendisliği kullanımı oldukça yaygın hale gelmiştir. Korneal stromadan türetilmiş kök hücreler (CCSC) [113, 114], adipoz türevi yetişkin kök hücreler (ADASC'ler) [115, 116], insan embriyonik kök hücreleri (hESC) [117, 118], kemik iliği mezenkimal kök hücreler (BMSC) [119], oral mukozadan türetilen kök hücreler [120], diş pulpası kök hücreleri (DPSC) [121], saç folikülünden türetilen kök hücreler (HFSC) [122], Wharton Jeli'nden türetilen kök hücreler [123], göbek kordonu kök hücreleri [124] ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerle (iPS) [125, 126] literatürde örneği olan pek çok kornea doku mühendisliği çalışması mevcuttur.

2.3.2. Kornea Doku Mühendisliğinde Kullanılan Doku İskeleleri ve Malzemeler

Kornea doku mühendisliği kapsamında üretilecek olan ideal bir doku iskelesinin taşınması gereken özellikler vardır. Bunlar;

1. Doğal korneaya benzer şekilde şeffaf olmalıdır.
2. Biyouyumlu olmalıdır. Ayrıca; hücresel yapışma, proliferasyon ve hücre göçünü desteklemelidir.

3. Göz içi basınca dayanıklı olacak şekilde özellikle insan korneasına büyük oranda benzeyen biyomekanik özelliklere sahip olmalıdır.
4. Işığın dağılmasını önlemek için pürüzsüz yüzeyin devamlılığını korumalıdır.
5. Doku yeniden modelleme ve biyointegrasyon zamanına uyan biyolojik bozunma özelliklerine sahip olmalıdır.
6. İnsan korneasına benzer kırılma indisine sahip olmalıdır.
7. Hem mikrobiyal bir bariyer görevi görmeli hem de besinler için uygun gözeneklilik ve difüzyonu sağlamalıdır.
8. Üretim ve uygulama açısında kolay uygulanabilir aynı zamanda düşük maliyetli olmalıdır [127].

Kornea doku mühendisliği alanında karşılaşılan problemlerin çözümüne odaklanan araştırmacılar mimetik açıdan en iyi sonucu veren ve biyoyumluluğu üst düzey olan biyomateryalleri araştırmaktadır. Literatürde; stromal iskeleler [128], nanomateryal iskeleler [129], deselülerize iskeleler [130], biyo-baskılı iskeleler [131], kolajen tabakalar [132], jelatin filmler [133], hidrojel lensler [134] ve amniyotik membranlar [135] kullanıldığından bahsetmektedir. Malzemelere bakıldığında polietilen glikol [85], akrilat bazlı polimerler [86], polyesterler [87], polidimetilsiloksan [88], polivinil alkol bazlı polimerler [89], poliamidler [90], polimetil metakrilat (PMMA), polihidroksietil metakrilat (PHEMA) [136], kolajen [132, 137] ve kitosan [138] ön plana çıkana çıkmaktadır. Sentetik polimerler tıbbi ihtiyaçlarla eşleştirilebilecek ayarlanabilir kimyasal ve mekanik özelliklere sahip olsalarda hücre yapışması, çoğalması ve etkili entegrasyon için gerekli biyomimetik özellikleri tam anlamıyla sağlayamamaktadırlar. Biyolojik olarak parçalanmayan doğalarına ek olarak doku iyileşmesi ve yeniden şekillenmesi sırasında hücreleri taşıma ve biyointegrasyon yetersizlikleri de ana zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır [91]. Kişiselleştirilmiş modifikasyonlar ve tasarımlarla yeni biyomateryallerin geliştirilmesinde süregelen ilerlemeler sayesinde gün geçtikçe umut vaat eden çalışmalar ortaya çıkmaktadır. Bütün bu çalışmalar içerisinde deselülerize dokular beraberinde getirdiği avantajlardan dolayı ön plana çıkmaktadır. Fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler de dahil olmak üzere korneanın deselülerizasyonu için farklı teknikler kullanılmaktadır. Literatürde birçok

deselüerizasyon yöntemi ve kullanılan malzeme vardır. Bunlardan bazıları tablo da özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Literatürde yaygın kullanılan deselüerizasyon çalışmalarına örnekler

Kullanılan korneanın orijini	Deselüerizasyon Çeşiti	Deselüerizasyon Detayı	Referans
Domuz	Kimyasal	SDS	[139]
Domuz	Kimyasal+ biyolojik	Triton+dispaz+tripsin	[140]
Domuz	Fiziksel	Yüksek hidrostatik basınç	[141]
Domuz	Kimyasal	SDS	[142]
Domuz	Fiziksel	Nitrojen gazı	[143]
Domuz	Kimyasal	NaCl +Triton	[144]
Domuz	Fiziksel	Yüksek hidrostatik basınç	[145]
Domuz	Biyolojik+fiziksel+kimyasal	Tripsin+ NaOH+freze thawing	[146]
Domuz			
İnsan	Kimyasal	NaCl /SDS/Triton	[147]
İnsan	Kimyasal	SDS	[148]
İnsan	Kimyasal	SDS	[149]
Sığır	Kimyasal	SDS	[150]
Domuz	Fiziksel	Yüksek hidrostatik basınç	[77]
İnsan	Kimyasal	SDS+ lazer kaynaklı deselüerizasyon	[151]

2.4. Jelatin Metakrilat (GelMA)

Jelatin, kolajenin kısmi hidrolizinin geri dönüşümsüz işlemi ile üretilen polidispers bir peptid karışımıdır. Günümüzde jelatinlerin büyük çoğunluğu; sığır, domuz ve kümes hayvanı kolajenlerinden, aynı zamanda balık ve deniz organizmalarından da türetilmektedir [152]. Jelatinin yapısındaki RGD ve MMP sekansları hücrelerin; migrasyonu, çoğalması ve farklılaşması gibi temel hücresel fonksiyonlarını yerine getirmektedir. Ayrıca hücre yapışması ve hücre aracılı enzimatik bozunma ile faaliyetleri kolayca yürütmesini sağlar.

Jelatinin en büyük dezavantajlarından biri oda sıcaklığında jel kıvamındayken 37 °C veya üzerindeki sıcaklıklarda koloidal bir çözelti haline gelerek çözülmesidir [153]. Jel kıvamındaki jelatin termal stabiliteyi bozduğundan dolayı doku kültürü çalışmalarında mutlaka kimyasal çapraz bağlanma gerektirir [154, 155]. Bu sorunun çözümü olarak karşımıza çıkan kovalent çapraz bağlanma uygulaması jelatin jelleri güçlendirmekle kalmaz aynı zamanda çapraz bağlanma derecesini kontrol ederek bozunma süresini de ayarlamaya yardımcı olur. Alternatif olarak jelatin metakrilat veya serbest tiyol grupları ile işlevselleştirme aşamasından sonra foto çapraz bağlanma mümkün olmaktadır.

Literatürde ilk kez 2000 yılında Van Den Bulcke ve arkadaşları tarafından bulunan GelMA [156], günümüzde farklı şekillerde sentezlenerek amaçlanan çalışma doğrultusunda istenen özelliklerde karakterize edilmektedir. Özellikle doku mühendisliği uygulamaları için modifiye doğal ECM bileşenlerinden oluşan foto polimerize edilebilir bir hidrojel olmasından dolayı son yıllarda ilgi çekici bir malzeme olmuştur [157].

GelMA'nın polimerizasyonunda metakrilat grupları hidrojin biyolojik davranışının ve mikro yapısının kontrol edilmesinde rol oynamaktadır. Bu polimerizasyon sürecinde özellikle oda sıcaklığı başta olmak üzere nötr pH, sulu ortamlarda gerçekleşmesi gibi parametreler oldukça önem arz etmektedir [158, 159]. Tepkimeye girmemiş MA (metakrilat) ve metakrilik asit yan ürünlerinin diyaliz membran vasıtasıyla uzaklaştırmak için bir çeşit diyaliz prosesinin uygulandığı polimerizasyon aşamasında safsızlıklar ve sitotoksik etkiler minimum düzeye

indirilmektedir [159]. Böylece üretilecek olan GelMA sitotoksik etkilerden uzak üretilir. Literatürde MA (metakrilat) oranının az veya çok kullanılmasıyla üretilen GelMA'nın özellikleri üzerinde detaylı bir çalışma mevcut değildir. Bu konu daha fazla optimizasyon çalışmaları için araştırılması gereken ilgi çekici bir alan özelliği taşımaktadır.

Fiziksel özellikleri incelendiğinde; şişme, mukavemet, gözeneklilik gibi özellikler nanoparçacıkların eklenmesi veya fonksiyonel grupların jelatin omurgasına eklenmesiyle rahat bir şekilde optimize edilmektedir [160, 161].

Literatürde hidrojellerin kullanıldığı hücre kapsülleme ve foto çapraz bağlama çalışmaları için çeşitli foto başlatıcılar kullanılmasına rağmen Irgacure 2959 (2-hidroksi-4'-(2-hidroksietoksi)-2-metilpropiofenon), doku mühendisliği uygulamaları için en yaygın kullanılan foto başlatıcı olarak kabul edilmektedir [159]. Bununla birlikte, hidrojel varlığında fotopolimerizasyon işleminin daha yüksek hücre canlılığına yol açtığı da gösterilmiştir [162]. Hücre boyutunda gözlenen bu zararın fotopolimerizasyon sırasında oluşan serbest radikallerin çapraz bağlama işlemi sırasında tamamen tükenmesine bağlı olarak hücresel bileşenlere verilen zararı azaltmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Metakrilik yan gruplarının çapraz bağlanması, polimerin kuru kütlesi, işlevselliğin derecesi, foto-başlatıcı konsantrasyonu, ultraviyole (UV) yoğunluğu ve çapraz bağlanma süresi gibi temel değişkenler ile GelMA'nın kontrollü bir şekilde polimerizasyonunun sağlanabilmesi doku mühendisliği çalışmalarında ön plana çıkmasına neden olmuştur [156, 163, 164].

Literatürde GelMA polimeri çok farklı alanlarda kullanılmaktadır. Son yıllarda *in vitro* vaskülarizasyon ve doku oluşumunda [162], yara iyileşmesi ve cilt yenilenmesinde [165], osteoporoz tedavisinde [166] GelMA'nın kullanımı artmıştır.

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Deselüerize Sığır Korneasının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

3.1.1. Sığır Kornealarının Diseksiyonu

Çalışmalarda sığır gözünden elde edilen kornealar kullanılmıştır. Disekte edilen kornealar deselüerizasyon çalışmalarında ve hibrit matrikslerin eldesinde kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan sığır korneaları bekletilmemiş ve konjonktival dokunun çapraz kontaminasyona uğramaması için dikkatli bir şekilde disekte

edilmiştir. Böylece korneanın şeffaflığı korunarak dokuların dehidre olmasının önüne geçilmiştir.

3.1.2. Deselüerize Matrislerin Eldesi

Deselüerizasyon işleminde literatürde sıkça tercih edilen Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) tabanlı kimyasal deselüerizasyon yöntemi tercih edilmiştir. Kornea dokuları 50 mL'lik ependorf tüpleri içerisine alınarak üzerlerine 40 mL %1 (a/h) sodyum dodesil sülfat (SDS) (Serva, Almanya) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 12 saat boyunca orbital çalkalayıcıda işlem gören dokular 2 saat boyunca 5 defa PBS (Sigma Aldrich, ABD) ile pipetaj yapılarak yıkanmıştır. Daha sonra dokular %75'lik (h/h) etanol (Merck, ABD) çözeltisine konularak 12 saat boyunca orbital çalkalayıcıda oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 1 saat boyunca PBS ile 5 defa yıkanmıştır. Dokular petri kaplarına alınıp bastırılarak -80 °C de dondurulmak suretiyle muhafaza edilmiştir. Deneyin devamı için örnekler -80 °C' den alınarak liyofilizatörde 16 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Son olarak liyofilize kornealar eşit ölçülerde 11 mm boyutunda olan punch yardımıyla kesilmiştir.

3.1.3. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), malzemelerin morfolojik özelliklerinin ayrıntılı bir şekilde belirlenmesinde kullanılan, yüksek çözünürlüklü görüntü elde etmeyi sağlayan bir cihazdır. Çalışma kapsamında doğal ve deselüerize korneaların morfolojik incelemeleri Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) (Carl Zeiss Evo 50, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hem deselüerize korneaların hem de kontrol grubu olan işlem görmemiş doğal korneanın adventisya yüzeyleri görüntülenmiştir. Doğal ve deselüerize kornealar ilk olarak %2.5'lük (h/h) glutraldehit çözeltisinde 1 saat boyunca oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Fikse olan dokular %50 (h/h) etanolden başlayarak sırasıyla hacimce %60, 70, 80, 90 ve son olarak %100'lük (h/h) etanolden oluşan kademeli alkol serisinden geçirilerek dehidrasyona uğratılmış ve dokulardaki fazla su uzaklaştırılmıştır. Ardından kornea dokusunun içerisindeki suyu tamamen uzaklaştırmak için 5 dakika boyunca hekzametildisilazan (HMDS) (Sigma Aldrich, Almanya) içerisinde bekletilen doku örnekleri bir gece boyunca çeker ocakta

kurumaya bırakılmıştır. Tüm örnekler analiz öncesinde altınpaladyum karışımı ile kaplanmıştır ve çeşitli büyütmelelerde görüntüler elde edilmiştir.

3.1.4. Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi (ATR-FTIR) Analizi

Tez kapsamında deselülerize edilen kornea ile doğal kornea yapılarının aydınlatılması için FTIR-ATR spektrofotometresi (Agilent, ABD) kullanılmıştır. Bu iki yapının tüm spektrumları $400-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlükte kaydedilmiştir ve elde edilen spektrumlar Thermo Electron Corporation, Omnic yazılımı kullanılarak incelenmiştir.

3.1.5. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) Nükleik Asit Boyama

DNA'da meydana gelen değişimlerin tespiti başta olmak üzere histokimya ve biyokimya çalışmalarında, akış sitometrisi ve kromozom boyamada kullanılan DAPI floresan boyama ile hücrenin çekirdeğini maviye boyayan bir boyadır [167]. DAPI, DNA'ya A-T bakımından zengin bölgelere bağlandığında, DAPI'nin floresansı 20 kat artar ve bütün hücrelerin çekirdekleri boyanır [168]. Deselülerizasyon işleminin başarısını değerlendirmek için yapılan DAPI boyama testinde deselülerize kornealar ve doğal kornealar kullanılmıştır. 11 mm punch ile eşit ölçüde kesilen doku iskeleleri oda sıcaklığında 24 saat boyunca %10 formalin içerisinde bekletilerek rehidre edilmiştir. DAPI floresan boyası ışığa karşı hassas olduğu için rehidrasyon sonrası boyama işlemi karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. 10 μL DAPI (Biotium EverBrite hardset mounting medium with DAPI, ABD) boyası preparata damlatılmıştır ve ardından lamel ile kapama yapılmıştır. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra preparatlar floresan mikroskopuyla (Leica, Almanya) görüntülemiştir.

3.1.6. Hematoksilen & Eozin Boyaması

Hematoksilen ve eozin (H&E) hücresel bileşenleri kolayca ayırt etmekte çekirdeği ve sitoplazmayı farklı renklerle boyamak için kullanılan yaygın bir histoloji boyama yöntemidir [169]. Hematoksilen hücre çekirdeğini mavi- mor renge boyarken Eozin sitoplazmayı pembe renge boyamaktadır. Deselülerizasyon işleminin başarısının

ve deselüerize olan dokunun yeniden hücrelendirme veriminin tespit edilmesi için dokular Hematoksilen&Eozin boyası ile histolojik olarak boyanmıştır. Böylece, ekstraselüler matriks (ECM) ve hücre çekirdeklerinin görüntülenmesi sağlanmıştır. Çalışmada kullanılan örnekler %10 formaldehit (h/h) tamponunda 24 saat süreyle fikse edilmiş ve ardından gece boyu su ile yıkamaya bırakılmıştır. Dokulardan suyu uzaklaştırmak 30'ar dakika %70, 80, 90'luk ve 1 saat %100'lük (h/h) kademeli etil alkol serisinden geçirilmiştir. Dehidre dokular ksilen içerisinde 1 saat süre ile bırakılmış, ardından parafine gömülerek 5 µm kesitler alınarak boyamaya hazır hale getirilmiştir. Kesitler bu aşamada ilk olarak %95 (h/h) etil alkol ve mutlak alkol ile rehidre edilmiştir. Rehidre edilen doku kesitleri sırasıyla hematoksilen ve eozin muamele edilmiştir. Hematoksilen hücre çekirdeklerini mavi mor renge boyamıştır. Ardından preparatlar eozinde bekletilerek hücre sitoplazması pembe renge boyanmıştır. Fazla eozin kısa süreli bir yıkamanın ardından uzaklaştırıldıktan sonra doku kesitleri entellan ile kapatılmıştır. Entellan kuruduktan sonra preparatların ışık mikroskopu ile görüntüleri (Leica, Almanya) alınmıştır.

3.1.7. Deselüerize Matrikste Artık Genomik DNA Miktarının Tayini

Deselüerizasyon işleminin ardından dokuda kalan DNA miktarının analizi için 25 pg/mL'ye kadar olan DNA miktarını kolaylıkla ve büyük bir hassasiyetle ölçebilen Quant-iT™ PicoGreen® (Thermofisher, ABD) test kiti kullanılmıştır. Kimyasal yöntemle deselüerize edilen sığır korneaları ve kontrol grubu olarak kullanılacak olan işlem görmemiş doğal sığır korneaları için örnek sayısı n=3 olarak belirlenmiştir. Dokular ilk olarak 200 U/mL Proteinaz K (Sigma Aldrich, Amerika) ile 37 °C'de orbital çalkalayıcı yardımıyla 3 saat süreyle etkileştirilerek enzimatik parçalanma sağlanmış ve ardından steril PBS ile yıkanmıştır. Steril dokular -80 °C'de dondurulmuş ve 16 saat süre ile liyofilize edilmiştir. Kuru örnekler 1 mg/mL proteinaz K (100 mM amonyum asetat çözeltisi) (Serva, Danimarka) içerisinde 60 °C'de 16 saat süreyle enzimatik olarak parçalanmıştır. Deneyde 10 mg kuru örnekleri 500 µL proteinaz K ile etkileştirilmiştir. Enzimatik olarak parçalanan örneklerin ve standartların absorbansları PicoGreen Quanti dsDNA Assay (Sigma Aldrich, Amerika) kitinde verilen talimatlara göre 480-520 nm dalga boyunda florasan spektrofotometresi (Agilent-Cary Eclipse, Amerika) ile tespit edilmiştir. Sonuçlar örneklerin 10 mg kuru ağırlığına göre normalize edilmiştir.

3.1.8. Deselüerize Matrikste Sülfatlı Glikozaminoglikan (sGAG) Miktarının Tayini

Deselüerizasyon işleminin dokudaki ECM yapısındaki GAG üzerindeki etkisini belirleyebilmek için florimetrik bir yöntem ile GAG analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 1,9-Dimetil Metilen Mavisi (DMMB) içeren bir karışım kullanılmıştır. Çalışma kapsamında işlem görmemiş doğal sığır korneası ile kimyasal yöntemle deselüerize edilmiş kornea karşılaştırılmıştır. Deney grupları liyofilize edildikten sonra proteinaz K ile enzimatik olarak 60 °C'de 16 saat süreyle parçalanmıştır. DMMB boyası için 500 mL amonyum asetat içerisinde 8 mg 1,9-Dimetil-Metilen Mavisi çinko klorür çift tuzu, 40 mM NaCl (Sodyum klorür), 40 Mm Glisin, 0.1 M HCl (hidroklorik asit) çözdürülmüştür. Standart olarak ise farklı konsantrasyonlarda amonyum asetat içerisinde kondroitin sülfat çözeltisi hazırlanmıştır. Enzimatik olarak parçalanmış deselüerize mantriks kondroitin sülfat standartları ile 3 tekrarlı olarak hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu kaplarda 40 µL örnek başına 200 µL DMMB solüsyonu eklenmiş, 525 nm dalga boyunda mikroparka okuyucu (Epoch) ile absorbanlar belirlenmiştir. Sonuçlar 10 mg kuru ağırlığa göre normalize edilmiştir.

3.1.9. Kolajenin Kantitatif Tayini

Dokuda kolajen yıkımı ile ortaya çıkan hidroksiprolinlerin kantitatif tayini için Hydroxyproline Colorimetric Assay Kit (Biovision, Almanya) kullanılmıştır. Numuneleri hidroksiprolin tayinine hazırlanmak amacıyla ilk olarak kolajen ekstraksiyonu için 10 mg örnek 100 µL distile su ile homojenize edilmiştir. Ardından 100'er µL 12 N HCl eklenerek 3 saat 120 °C'de inkübe edilmiştir. 3 saat sonunda örnekler 10000 rpm'de 3 dk santrifüjlenerek çökeltilerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ekstraktlardan 10'ar µL alınarak 96 gözlü petri kaplarına aktarılmış ve 1 gece boyunca 60 °C'de kurumaya bırakılmıştır. Analiz için iki aşamalı bir prosedür uygulanmıştır. Birinci aşamada kuruyan örneklerin üzerine 100 µL kloramin T ajanı (5 dakika) eklenerek oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İkinci aşamada ise 100 µL DMAB ajanı eklenerek 60 °C'de 90 dk inkübe edilmiştir. Kontrol grubu olarak işlem görmemiş kornea kesitleri kullanılmış ve her bir grup için örneklem sayısı 3 olarak belirlenmiştir. Standart olarak hidroksiprolinin farklı

konsantrasyonları hazırlanmıştır. Tepkime sonucu oluşan hidroksiprolinin absorbanları mikrolaka okuyucu yardımıyla 560 nm'de ölçülmüştür.

3.2. GelMA'nın Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

Çalışma kapsamında kullanılan GelMA, Hosseini ve arkadaşlarından uyarlanmıştır [170]. %8'lik olarak hazırlanan GelMA için ilk olarak 8 gr jelatin, 60 °C'de PBS (pH 7.5) içerisinde manyetik karıştırıcı eşliğinde çözdürülmüştür. Jelatinin çözünme işlemi tamamlandıktan sonra 8 mL Metakrilik Anhidrit (MA) aynı sıcaklıkta jelatinin içine mikro pipet yardımıyla damla damla ilave edilmiştir. Metakrilik Anhidrit (MA) ilavesinin ardından çözelti 2.5 saat aynı hızda ve sıcaklıkta çeker ocakta karışmaya bırakılmıştır. 2.5 saatin sonunda karışım hızlı bir şekilde diyaliz torbasının içine ilave edilmiştir. 40 °C'de distile suyun içerisine 12-14 kDa kesme değerine sahip diyaliz membranı koyduktan sonra manyetik karıştırıcı eşliğinde yavaş bir hızda muameleye bırakılmıştır. Beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldıktan sonra folyo gün aşırı değiştirilerek membrandan salınan fazla metakrilik uzaklaştırılmıştır. Elde edilen çözelti 1 hafta liyofilize edilerek GelMA'nın sentezi tamamlanmıştır. -80 °C'de muhafaza edilen GelMA tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılmak istendiğinde 1.2 mL PBS çözeltisinde 0,006 gr photoinitiator (PI) çözdürülmüştür. 80 °C'de 30 dakika sonikatörde bekletildikten sonra 0.08 gr GelMA eklenerek vortekslenmiştir. 15 dakika daha sonikatörde bekletildikten sonra çalışmalarda kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

Çalışma kapsamında GelMA polimeri kullanıma hazır hale geldikten sonra UV altında farklı süre ve enerji miktarlarında çapraz bağlanarak karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmaların neticesinde transparanlık ve yoğunluk açısından incelenerek hibrit korneaların eldesinde kullanılmak üzere 3200 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ ve 6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ olmak üzere üç farklı değerle çalışmalara devam edilmiştir.

3.3. Hibrit Korneaların Eldesi

Çalışma kapsamında deselülerize edilen kornealarla GelMA (jelatin metakrilat) birleşiminden elde edilecek olan hibrit korneaların optimal şartlarda üretilmesi için

GelMA farklı voltaj ($3200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$, $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ve $6900 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) ve farklı süre (hemen, 5 dakika, 24 saat) parametreleriyle çalışmalar gerçekleştirilmiştir ve bu parametreler Çizelge 3.1' de özetlenmiştir. Hibrit korneaların eldesi için öncelikli deselülerize matriks yapılarının üzerine $200 \mu\text{L}$ GelMA eklenerek farklı sürelerde (hemen, 5 dakika, 24 saat) emdirilme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından UV altında belirtilen süre ve enerji yoğunluklarında ($3200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$, $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ve $6900 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) çapraz bağlama işlemi yapılarak hibrit matrikler elde edilmiştir.

Çizelge 3.1. GelMA karakterizasyonunda optimal koşulların belirlenmesi amacıyla test edilen parametreler.

Enerji ($\mu\text{J}/\text{cm}^2$)	Hibrit Korneanın GelMA'da adsorblanma süresi	UV kalma süresi (sn)
3200	Hemen, 5 dakika, 24 saat	1.5 sn-9 sn
6210	Hemen, 5 dakika, 24 saat	1.5 sn-9 sn
6900	Hemen, 5 dakika, 24 saat	1.5 sn-9 sn

Çalışma kapsamında GelMA polimerinin UV altında optimal şartlarda polimerleşmesinin tespiti için farklı enerji ve sürelerde denemeler yapılarak en uygun değerler tespit edilmiştir. Hibrit korneaların üretimi, optimal koşulların belirlenmesi sürecinde belirlenen parametreler ile gerçekleştirilmiştir.

3.4. Hibrit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

3.4.1.Çap ve Kalınlık Tayini

Tez kapsamında kullanılan deselülerize matriks, hibrit matriks ve doğal kornea deney gruplarının (her bir muamele grubu ve kontrol grubu için $n=3$) çap ve kalınlık ölçümleri yapılmıştır. Çalışmada kullanılan bütün deney grupları liyofilize edildikten

sonra 11 mm punch kullanılarak eşit ölçüde kesilmiştir. Çap ölçümleri ise mikrometre cihazı ile yapılmıştır.

3.4.2. Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi (ATR-FTIR) Analizi

GelMA'nın kimyasal yapısını ve deselülerize matriks içindeki formunu araştırmak için Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometre (ATR-FTIR) (Agilent, ABD) analizi yapılmıştır. Analiz sırasında cihaz tarafından yayılan elektromanyetik spektrumlar ölçümü yapılan numune tarafından absorbe edildikten sonra malzemedeki fonksiyonel gruplar absorpsiyon bandları yardımı ile tespit edilmektedir. Her iki spektrum da 650–4000 cm⁻¹ aralığında elde edilmiştir ve elde edilen spektrumlar Thermo Electron Corporation, Omnic yazılımı kullanılarak incelenmiştir.

3.4.3. Su Tutma Kapasitesi Tayini

Kimyasal yöntem ile deselülerize edilen sığır korneaları, GelMA polimeri ile çapraz bağlanmış hibrit kornealar ve işlem görmemiş doğal kornea dokularının su tutma kapasitesinin tayini için şişme testi uygulanmıştır. Tüm deney gruplarının (n=3) su tutma kapasiteleri zamana karşı kütle kaybının belirlenmesiyle tespit edilmiştir. Bunun için kimyasal yöntem ile deselülerize edilen sığır korneaları (n=3) ve işlem görmemiş doğal sığır korneaları (n=3) liyofilize edildikten sonra tartılmıştır (W₀). Deselülerize olan kornealar ise GelMA polimeri ile UV altında çapraz bağlandıktan sonra iyice kurutulduktan sonra tartılmıştır (W₀). Bütün deney grupları 37 °C'de 3 mL PBS solüsyonuna konulmuştur. Belirli aralıklarda örnekler PBS içinden alınarak filtre kâğıdı yardımıyla iyice kurutulduktan sonra ağırlık ölçümleri yapılmıştır (W_h). Su tutma kapasitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmış ve matrikslerin su tutma kapasitesi belirlenmiştir [77].

$$H(\%) = [(W_h - W_0) / W_h] \times 100 \quad (1)$$

3.4.4. Enzimatik Degradasyon Testi

Doku mühendisliği teknikleriyle üretilen her ürün belli bir degradasyon kapasitesine sahiptir. Degradasyon şekli ve süresi malzemenin kullanılacağı dokuyla uyum

içinde olduğu zaman üretilen malzeme başarı kriterini sağlamaktadır. Tez çalışması kapsamında üretilen doku iskelelerinin enzimatik bozunma profillerini tespit etmek için doğal kornea, deselülerize sığır korneaları ve GelMA ile çapraz bağlanan hibrit kornealar (6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV'de 24 saat GelMA emdirilmiş grup) 1U/mL kolajenaz A ile muamele edilmiştir. Tüm deney grupları (n=3) liyofilize edildikten sonra başlangıç ağırlıklarının (W_0) belirlenmesi için tartılmıştır. Numuneler 4 saat boyunca pH 7.5'te 100 mM PBS içerisinde 1U/mL konsantrasyondaki kolajenaz A çözeltisinde orbital çalkalayıcı (Gerhardt, Almanya) eşliğinde 37 °C'de 10 rpm'de bekletilmiştir. Her saatte numuneler 10 mM PBS ile yıkanarak 16 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Son ağırlıklarının (W_d) tespitinden sonra degradasyon hızı hesaplanmıştır. Bozunma hızı aşağıdaki ifadeye (2) göre hesaplanmıştır.

$$D(\%) = [(W_0 - W_d)/W_0] \times 100 \quad (2)$$

3.4.5. PBS İçerisinde Degradasyon Testi

PBS içerisinde degradasyon testi 3 farklı deney grubu olan; deselülerize kornealar, doğal kornealar ve hibrit kornealar (24 saat GelMA polimeri emdirildikten sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV'de çapraz bağlanan grup) için yapılmıştır. PBS içinde degradasyon profilinin tespiti için 28 gün boyunca tüm numuneler 10 mM pH 7.4 PBS içerisine konularak 37 °C ve 10 rpm'de orbital çalkalayıcıda bekletilmiştir. Test süresince 7, 14, 21 ve 28. günde numuneler PBS çözeltisinden uzaklaştırılarak -80 °C'de dondurulmuştur. Dondurulan numuneler liyofilize edildikten sonra son ağırlıkları tartılarak tespit edilmiştir (W_s). Degradasyon oranı eşitlik 2 ile belirlenmiştir.

$$D(\%) = [(W_0 - W_d)/W_0] \times 100 \quad (2)$$

3.4.6. Işık Geçirgenliği ve Saydamlık Testi

Tez kapsamında incelenen doğal kornea, deselülerize kornea ve hibrit kornea yapılarının ışık geçirgenliği ve saydamlık analizleri yapılmıştır. Deney gruplarının ışık geçirgenlik analizleri, 400-800 nm aralığında mikropilaka spektrofotometre

(Epoch-BioTek, ABD) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Örnekler (n = 3) 1 saat boyunca 37 °C'de PBS içinde bekletilmiştir. 6 mm punch yardımıyla kesilen numuneler 96 oyuklu plakalara aktarıldıktan sonra 50 nm dalga boyu aralıklarla spektrofotometre ile ölçümler yapılmıştır. Yapılan ölçümlerin sonucunda bulunan absorbans değerlerinden aşağıda verilen formül ile doku iskelelerinin ışık geçirgenliği yüzdesi hesaplanmıştır (3).

$$T(\%) = 10^{(2A)} \quad (3)$$

Deney gruplarının şeffaflık analizi için doku iskeleleri distile su ile ıslatıldıktan sonra Hacettepe Üniversitesi'nin logosu ve adı ile basılmış bir kâğıda yerleştirilerek görüntülenmiştir.

3.4.7.Mekanik Testler

Tez çalışması kapsamında üretilen hibrit ve deselülerize kornealarla birlikte kontrol grubu olarak belirlenen doğal kornealar, mekanik özelliklerinin değerlendirilmesi için test ed (CellScale, Kana ilmiştir da). Bu amaçla her bir deney grubunun (n=4) numunesi 11X2 mm boyutlarında hazırlanarak 1 saat boyunca PBS içerisinde bekletildikten sonra test edilmiştir. Sıkıştırma testleri, 2 mm/dk hızda 50 N yük kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Young modülleri, %20 ile 40 arasında değişen gerilme-şekil değiştirme eğrisine göre hesaplanmıştır. İlaveten hibrit yapıların molar çapraz bağlanma yoğunlukları, Denklem 4'te ifade edilen Flory Teorisi kullanılarak hesaplanmıştır [171].

$$n = E / 3RT \quad (4)$$

Denklemden n molar çapraz bağlanma yoğunluğu (mol/m³), E hibrit yapıların sıkıştırma modülü (N/m²), R evrenseldir.Gaz sabiti (Nm/mol·K) ve T mutlak sıcaklıktır (K).

3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.5.1. Sterilizasyon ve Hücre Kaynağının Eldesi

Tez çalışmasının bu aşamasında reselüerizasyon işleminde kullanılan hücreler primer kültür yöntemiyle sığır kornealarından elde edilmiştir. Bu amaçla mezbahanedede taze kesilen sığırların gözleri %3 antibiyotik içeren PBS içerisine

alınarak hızlıca laboratuvarımıza getirilmiştir. Dikkatli bir şekilde disekte edilen korneaların stroma tabakaları %3 antibiyotik-antimikotik (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) içeren PBS içerisine alınarak hücre kültürü laboratuvarına transfer edilmiştir. 6 kuyucuklu kültür kabına alınan stroma parçaları yaklaşık 2x2 mm boyutuna küçültülerek 1 saat boyunca %3 antibiyotik içeren PBS içerisinde birkaç defa yıkanmıştır. Sterilizasyonu gerçekleştirilen stroma parçaları kurutma kâğıdı yardımıyla dikkatli bir şekilde kurutulduktan sonra 8-10 tanesi 25 cm²'lik hücre kültür flasklarına yerleştirilmiştir ve yapışmaları için 3 saat inkübe edilmiştir. Ardından %1 antibiyotik (Capricorn, Almanya), %1 L-glutamin (Capricorn, Almanya) ve %10 fetal sığır serumu (FBS-12A, Capricorn, Almanya) katkısıyla hazırlanmış düşük glikozlu DMEM besi ortamı eklenmiş ve flasklar 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre (Mettler, Almanya) yerleştirilmiştir. Her 3 günde bir besi ortamı yenilenerek kültür periyodu devam ettirilmiştir. Kültürün 3. gününden sonra dokudan hücre göçüne rastlanmıştır ve hücreler kabin yüzeyini kapladıklarında %0.25 Trypsin Edta (Biological Industries, ABD) ile yüzeyden kaldırılarak pasajlanmıştır. Hücreler 2500 rpm'de 3 dakika boyunca 15 mL'lik falkon tüp içerisinde çöktürülmüştür ve hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen keratositler, flasklarda çoğaltıldıktan sonra % 10 (h/h) DMSO içeren FBS içerisinde sıvı azotta dondurularak saklanmıştır.

3.5.2. Hibrit Matrislere Hücre Ekimi Çalışmaları

Deselülerize kornealar %70 (h/h) etanol ile steril edildikten sonra reselülerizasyon için hazır hale getirilmiştir. Bu işlem için hücre ekim yoğunluğu $1 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ GelMA çözeltisi olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan GelMA polimeri %8'lik konsantrasyonda hazırlanmıştır. GelMA çözeltisi içerisinde hücrelerin süspansiyon edilebilmesi için 5×10^5 keratosit hücreleri santrifüj ile çöktürülmüş ve süpernatant atılmıştır. 2 mL ependorf tüpü içerisinde 1.2 mL steril PBS ile 0.006 g Irgacure 30 dakika boyunca 80 °C'de sonikatörde çözündürülmüştür. 0.08 g GelMA ilavesinin ardından çözelti vortexlenerek 15 dakika boyunca 80 °C'de sonikatörde tutulmuştur. Elde edilen hücre süspansiyonundan her bir deselülerize doku iskeleleri üzerine 100 μL olacak şekilde ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücre

ekilmiş deselülerize kornealar 9 x 1.5 dk boyunca 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ 'de UV altında çapraz bağlama işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemden sonra hibrit doku iskeleleri hücre yapışmasını sağlamak amacıyla 37°C'de %5 CO₂ şartlarında inkübatöre kaldırılmış ve burada kültüre edilmiştir.

3.5.3. Hücre Yapışma ve Çoğalmasının Belirlenmesi

3.5.3.1. Alamar Blue Analizi

Çalışmanın bu aşamasında materyaller üzerindeki keratosit proliferasyonunu değerlendirmek için kültür döneminin ilk, üçüncü, yedinci ve ondördüncü günlerinde alamar mavisi testi gerçekleştirilmiştir. Alamar mavisi testi hücre zarından geçebilen ve toksik özellik göstermeyen rezorinin hücre içerisinde resorufine indirgenmesi ve güçlü floresan ışımaya sergilemesi prensibine dayanan kolorimetrik bir analizdir. Bu amaçla kültüre edilen doku iskelelerinin üzerinden ilgili günlerde besi ortamı çekilerek uzaklaştırılmış ve yerine %10 alamar mavisi içeren yeni besi ortamı ilave edilmiştir. Alüminyum folyo ile kapatılan kültür kapları inkübatörde 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından her bir doku iskelesi kuyucuğundan 200'er μL örneklem alınmış ve 96 kuyucuklu kültür kaplarında 570/600 nm'de okutulmuştur. Elde edilen optik yoğunlukların kültür süresince değişimi grafiğe aktarılarak hücre üreme eğrisi raporlanmıştır.

3.5.3.2. Canlı/Ölü Boyama Analizi

Canlı/Ölü boyası içeriğinde canlı hücreleri boyamak üzere Calcein AM ve ölü hücreleri görüntülemek üzere Etidyum Homodimer-1 (EthD-1) boyalarını barındırmaktadır. Bu amaçla kültür periyodunun ilk, yedi ve on dördüncü günlerinde canlılık analizi için Live–Dead test kiti (Thermo Fisher Scientific, Almanya) kullanılmıştır. Boyama esnasında kullanılan kalsein canlı hücrelerin yeşil ışımaya yapmasını sağlarken propidyum iyodür ise ölü hücrelerin kırmızı ışımaya yapmasını sağlamaktadır. Protokole göre calcein AM ve etidyum bromür homodimer-1 (EthD-1) floresan boyaları 1 mL PBS içinde 2 μL :1 μL oranında karıştırılmıştır. Her bir analiz gününde kültür ortamı kuyucuklardan dikkatli bir şekilde uzaklaştırılarak numuneler PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra 1 mL PBS ve 100 μL boya karışımı ilave edildikten sonra numuneler 20 dakika boyunca 37 °C

%5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda örnekler üzerindeki çözelti uzaklaştırılarak PBS ile yıkanmıştır. Tez kapsamında elde edilen görüntüler konfokal mikroskobu (Zeiss, Almanya) Calcein AM ve EthD-1 için sırasıyla 505-550 ve 525 nm eksitasyon dalga boylarında yapılar üzerindeki hücreleri gözlemlemek için kullanılmıştır.

3.5.3.3. Reselülerizasyon

Reselülerizasyon sürecinin başarısını ortaya çıkarmak için, Başlık 3.1.5.'te anlatılan DAPI boyama protokolü uygulanmıştır. Hücreler reselülerize edilen hibrit yapının üzerinde 7 gün boyunca kültüre edilmiştir. Bunun için sabitlenen numuneler parafine gömülerek 10 µm kalınlığındaki doku kesitleri alınmıştır. Son olarak DAPI ile boyanmıştır ve ters floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir.

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamında kullanılan her bir yöntem için örnek sayısı üç olarak ayarlanmıştır. Tüm veriler ortalama \pm SD olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkları belirlemek için Welch'in t testi ve iki yönlü ANOVA kullanılmıştır. Her çalışmada elde edilen p değerlerinin anlamlılık derecesi en az 0.05 olarak kabul edilmiştir. Farklı p değerleri ve bunların anlamlılık düzeyleri sonuç kısmında sunulan her bir şekilde ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

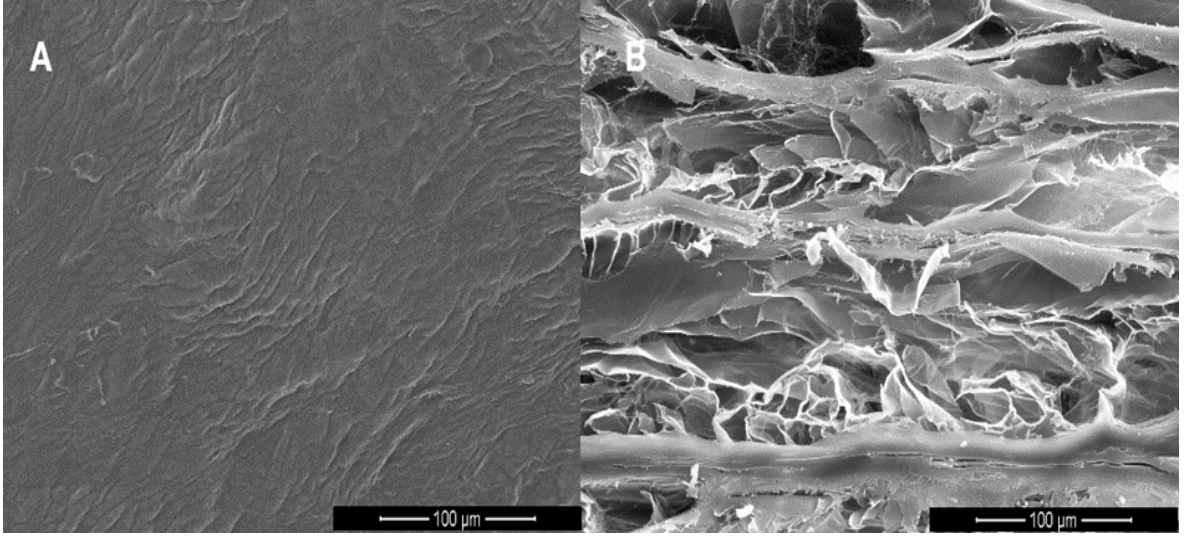
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Deselülerize Matriksin Karakterizasyonu

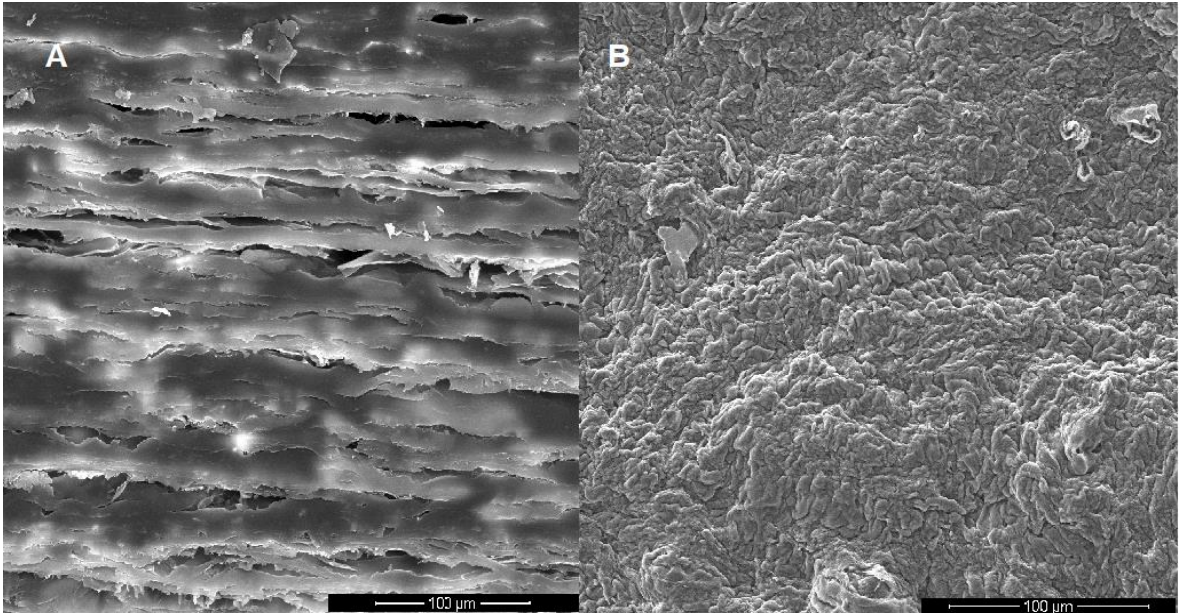
Çalışma kapsamında kimyasal yöntemle deselülerize edilen sığır korneaları ve kontrol grubu olarak kullanılan işlem görmemiş doğal sığır korneaları deselülerizasyon başarısını değerlendirmek için histolojik ve biyokimyasal olarak analiz edilmiştir. Deney gruplarının histolojik analizleri için hematoksilen eozin boyama (HE), DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) gibi boyama yöntemlerine ek olarak artık DNA miktarının tayini, sülfatlanmış Glikozaminoglikan (sGAG), hidroksiprolin gibi biyokimyasal testler de yapılmıştır.

4.1.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Deselüerize edilen kornealar ve kontrol grubu olarak belirlenen işlem görmemiş doğal kornealar stroma tabakasının morfolojisini değerlendirmek üzere Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile incelemiştir. Şekil 4.1.'de doğal kornea, Şekil 4.2.'de deselüerize korneaların enine ve boyuna görüntüleri gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Doğal korneanın boyuna kesiti Şekil A, doğal korneanın enine kesiti Şekil B, stroma katmanlarını gösteren SEM görüntüleri (100µm)



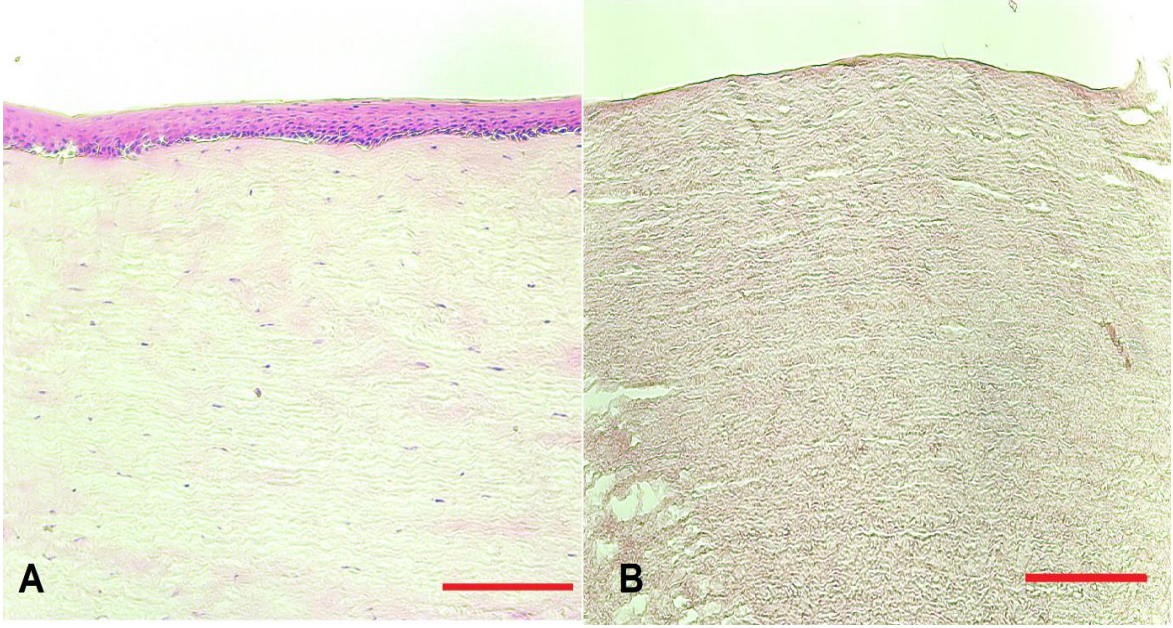
Şekil 4.2. Deselüerize korneanın enine kesiti Şekil A, deselüerize korneanın boyuna kesiti Şekil B, stroma katmanlarını gösteren SEM görüntüleri (100µm)

Doğal ve deselülerize edilmiş kornealar karşılaştırıldığında stroma tabakasının yüzeyinde SDS kullanılarak yapılan deselülerizasyon işleminin başarısı net bir şekilde görülmüştür. Aynı şekilde deselülerize edilmiş korneanın enine kesitine bakıldığı zaman (Şekil 4.2); doğal korneanın enine kesitine göre (Şekil 4.1.) deselülerizasyon işleminin bir sonucu olarak delamine bir yapı göstermiştir.

Literatürde mevcut olarak bahsi geçen deselülerizasyon metotları arasında en etkili olan SDS (sodyum dodesil sülfat) ile yapılan deselülerizasyon protokolüdür. SDS'nin doğrudan deselülerizasyon başarısını etkilediğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)'in deselülerizasyon işlemine olan pozitif ve negatif etkileri incelendiğinde başarılı bir deselülerizasyon protokolü olduğu literatürde geçen çalışmalarda defalarca kanıtlanmıştır. Deselülerize dokunun kalan matriks bileşenleri üzerindeki olumsuz etkileri en aza indirmek için, SDS ideal oranda ve ideal etkileşim süresinde dokuya maruz bırakılarak yıkıcı etkilerini minimuma indirmek için defalarca yıkama yapılmıştır [172]. Deselülerizasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiği gözlenmiştir. Şekil 4.1. ve Şekil 4.2. karşılaştırmalı olarak incelendiğinde ekstraselüler matriks içeriğine sahip olan deselülerize doku iskelesinin kornea hücreleri tarafından tutunma ve yaşama için uygun içerikler olduğu gözlenmiştir.

4.1.2. Hematoksilen Eozin ile Histolojik Boyama

Kimyasal yöntemle deselülerize edilen korneaların deselülerizasyon etkinliğinin tespiti için histolojik analizleri yapılmak üzere bir seri işlemde geçirilerek 5µm kalınlığında doku preparatları hazırlanmıştır. Deselülerizasyon işleminin değerlendirilmesi için hazırlanan preparatlar hücre çekirdeği-sitoplazma boyası olan hematoksilen ve eozin (HE) ile boyanmıştır. HE boyamasında hücre çekirdekleri mavi-mor iken, hücre sitoplazması ise pembe renk ile spesifiktir. Şekil 4.3.'te işlem görmemiş doğal kornea dokusu (A) deselülerize matriksler (B) ile gösterilmiştir



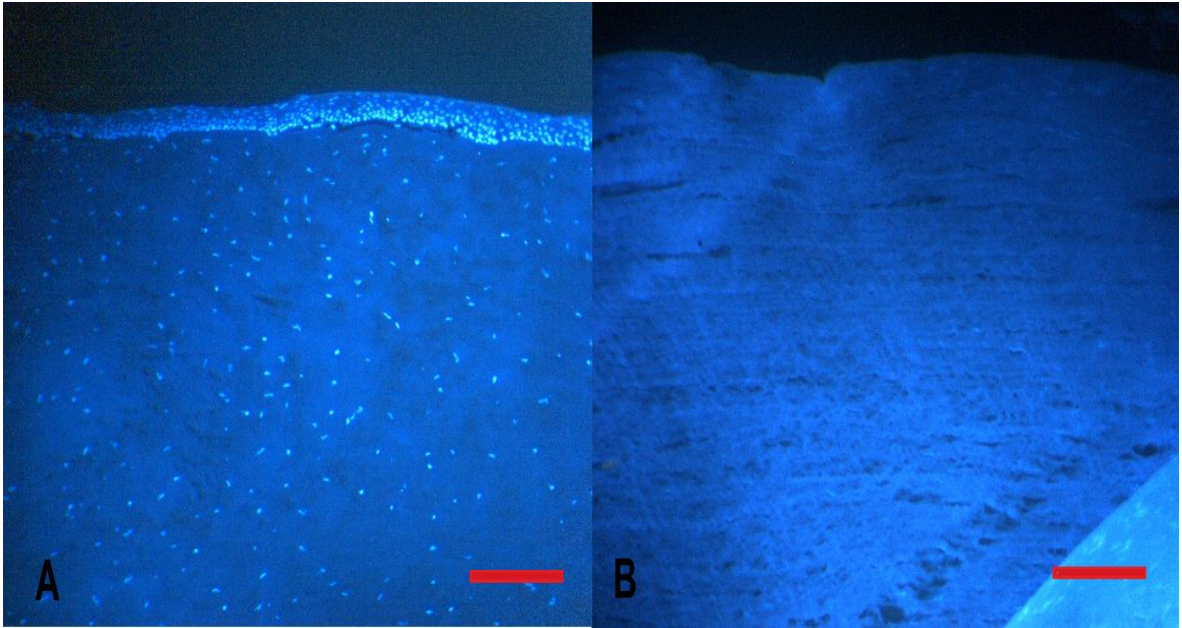
Şekil 4.3. Kornea doku kesitlerinin hematoksilin eozin boyaması Şekil A, doğal kornea Şekil B, deselülerize kornea (B) 200 µm

Çalışmada uygulanan SDS tabanlı deselülerizasyon yönteminin korneanın stroma ve epitel tabakalarından keratositlerin uzaklaştırılmasında başarılı olduğu görülmüştür. Şekil 4.3'te de görüldüğü üzere boyama sonucu doğal sığır kaynaklı korneada yapılar belirgin olarak görülmektedir. Ayrıca ECM yapısı daha pembe, çekirdekler ise daha koyu ve mavi renkte boyanmışlardır. Deselülerize matrikste doku bütünlüğünün korunduğu görülmüşsede doğal yapıya oranla ECM yapısında gevşemenin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca deselülerize matrikste herhangi bir hücre çekirdeğine rastlanmamıştır. SDS'nin ECM yapısında yapısal bozulmalara hatta bazı protein kayıplarına sebep olduğu literatürde bildirilmiştir [159]. SDS'nin bu yıkıcı etkilerine rağmen Şekil 4.3'te de görüldüğü üzere ECM yapısının korunduğu ve bunun sonucu olarak da hücre kültürü çalışmaları için iyi bir aday olduğu gözlemlenmiştir.

4.1.2. DAPI Boyama

DAPI, (4',6-diamidino-2-phenylindole) adenin timin nükleotidlerinden zengin çift zincirli DNA'ya bağlanan floresan bir boyadır. Floresans mikroskopisinde yaygın olarak kullanılan DAPI boyama yöntemi; kolay tekrarlanabilir, etkili ve hassas bir yöntemdir. Hücre DNA'sında meydana gelen değişimleri gözlemlemekte kullanılan DAPI, DNA'ya bağlandığında floresansı 20 kat artar ve bütün hücrelerin

çekirdekleri boyanır. Kimyasal yöntemle deselülerize edilen sığır korneaları ve kontrol grubu olarak belirlenen işlem görmemiş doğal sığır korneaları canlı hücrelerin varlığını tespit etmek için test edilmiştir. Deney grupları önceden anlatıldığı gibi fikse edilerek DAPI boyama sürecinden geçirilmiştir. DAPI ile boyanan örnekler Floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir (Leica, Almanya). DAPI floresan boyası ışığa karşı hassas olup ışıkta yapısı bozulduğundan rehidrasyon sonrası boyama işlemi karanlıkta gerçekleştirilmiştir. 10 µL DAPI boyası preparata damlatılmıştır ve ardından lamel ile kapama yapılmıştır. Boyama sonrası preparatlar floresan mikroskopuyla (Nikon Eclipse TI, Hollanda) görüntülenmiştir. Yapılan boyama sonucunda doğal kornea dokusunda epitel ve stroma tabakasında bulunan hücrelerin yaptığı ışımaya sayesinde hücreler mavi renkte görüntülenmiştir. DAPI floresan boyaması sonucu elde edilen görüntüler Şekil 4.4' te verilmiştir.



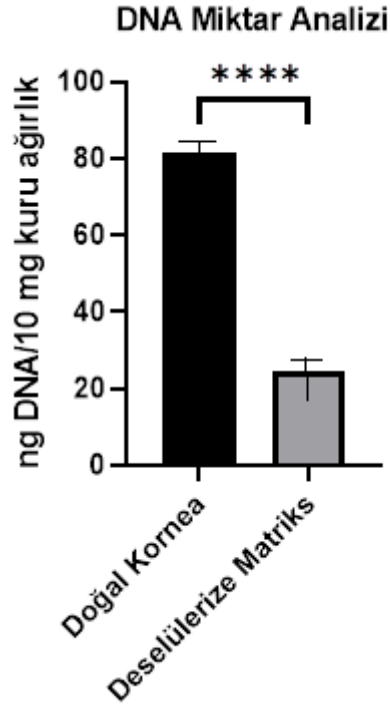
Şekil 4.4. İşlem görmemiş kornea Şekil A, DAPI boyaması Deselülerize matris Şekil B, DAPI boyaması

Kontrol grubunda doku bütünlüğü, kornea tabakaları ve hücreler belirgin bir şekilde görüntülenmiştir. Kimyasal yöntemle deselülerize edilen doku iskelesi grubunda doku bütünlüğünün korunduğu ancak hücrelerin olmadığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar Hematoksilen & Eozin boyamasının sonuçlarına paralel olup deney

sonuçlarını doğrulamıştır. Deselülerizasyon işleminde SDS kullanımı neticesinde DAPI boyamada işlemin başarı sı hücre çekirdeklerinin uzaklaştırıldığının kanıtı literatür bilgisiyle paralellik göstermektedir [96].

4.1.3. DNA Miktarının Hesaplanması

Tez alışması kapsamında, kimyasal yöntemle gerçekleştirilen deselülerizasyon işleminin verimliliğini tespit etmek ve deselülerize matrikslerin genomik DNA miktarını kantitatif olarak belirlemek amacıyla DNA içerik analizi yapılmıştır. Doku mühendisliği alanında son yıllarda oldukça popüler olan deselülerize matriksin başarısını ölçmek için kullanılan kriterlerden biri matriksin hücre ve hücre materyallerinden iyi bir şekilde arınmış olmasıdır. Deselülerizasyon sonrasında dokuda kalan DNA miktarının yüksek olması doku içerisinden hücre ve hücrenel komponentlerin etkili bir şekilde uzaklaştırılmadığının kanıtıdır. Başlık 3.1.7.'de ayrıntılı olarak açıklanan analiz yönteminde PicoGreen test kiti ile dokulardaki DNA miktarı, işlem görmemiş doğal kornea ve deselülerize matriks gruplarında nanogram (ng) mertebesinde belirlenmiş ve sonuçlar 10 mg kuru ağırlık üzerinden normalize edilmiştir. şekil 4.5.'te kontrol ve deselülerize matrikslerin DNA miktarları gösterilmektedir.



Şekil 4.5. Doğal ve deselülerize matrikste artık DNA miktarı (n=3) (***) ($p < 0.001$).

Bağışıklık reddi problemlerini önlemek için klinikte kullanılmak üzere hazırlanan deselülerize doku, doğal dokuya göre %3'ten daha az DNA içeriğine sahip olmalı veya çift zincirli DNA içeriğinden 50 ng/mg'dan fazla olmamalıdır [86, 173]. Bu kriter aynı zamanda başarılı bir deselülerizasyon işleminin ölçütü olarak literatürde yer almaktadır [174].

Tez çalışması kapsamında elde edilen kalibrasyon grafiği ile grupların absorbanlara karşılık olarak ng cinsinden DNA miktarları hesaplanmıştır. Buna göre işlem görmemiş kontrol grubunda 81.67 ± 4.9 ng DNA bulunurken; deselülerize matrikslerde 24.39 ± 2.5 ng DNA tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Sonuçlar 1 mg kuru ağırlık üzerinden hesaplanmıştır. Yapılan analizler neticesinde doğal kornea dokusundaki DNA miktarı deselülerize matriksteki miktardan yüksek çıkmıştır. Deselülerize matriksin doğal kornea gruplarına kıyasla %70 daha az miktarda DNA içerdiği görülmektedir. Mevcut literatür bilgisine göre işlem görmemiş domuz korneasından %90 oranında [145], işlem görmemiş keçi korneasından %80 oranında DNA uzaklaştırılmıştır [175]. Sığır korneası

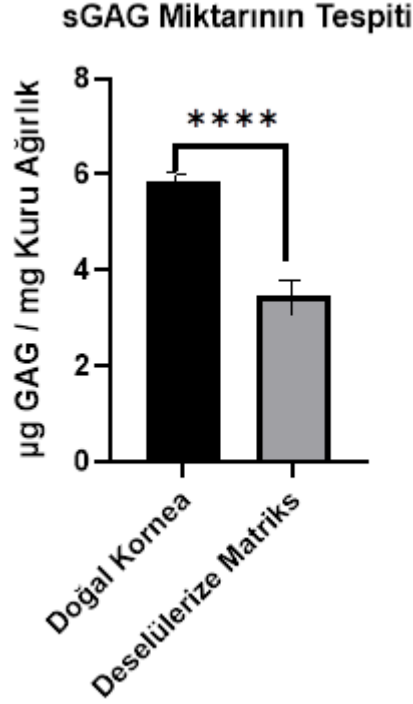
çalışmasında ise kontrol grupları ortalama 65 µg DNA içerirken bu miktarın yaklaşık %75'i dokudan başarılı bir şekilde uzaklaştırılmıştır [176]. Çalışmada kornea dokusunun DNA içerik analizi sonucuna göre %70 oranında başarılı bir şekilde deselülerize edildiği belirlenmiştir.

4.1.4. Sülfatlanmış Glikozaminoglikan (sGAG) Miktarının Tayini

Başarılı bir kornea deselülerizasyon işlemi için korneanın eşsiz organize yapısına sahip olan ECM yapısının doku mimarisi, yapısal proteinler ve glikozaminoglikan (GAG) içeriğinin korunması oldukça önemlidir [177]. Glikozaminoglikanlar hücrenin, kolajen ve elastin fiberlerin içine gömüldüğü matriksin temel bileşenleri olup insan gözünde en çok bulunan heteropolisakaritlerdir. Glikozaminoglikanlar çözeltilere yüksek viskozite kazandıran genişletilmiş bir konformasyona sahip olduklarından dolayı bir alanı doldurma, su moleküllerini bağlama, düzenleme ve negatif yüklü molekülleri itme yeteneğine sahiptirler [178].

Korneanın deselülerizasyonu sırasında GAG miktarının korunması, çalışmanın sonraki aşamalarında diğer biyolojik aktivitelerin normal işleyişinin devam etmesi için önemlidir. Bu amaçla çalışma kapsamında kimyasal deselüerizasyon sonucu dokuda kalan glikozaminoglikan miktarının tespiti ve kıyaslanması için bir GAG tayin yöntemi olarak 1,9-dimetilmetilen mavisi (DMMB) testi yapılmıştır. Doğal kornea yapısında stroma tabakasında bulunan sülfatlanmış glikozaminoglikanlar, önemli oranda hücre yapışmasını sağlarken yapının su tutma kapasitesini de etkilemektedir. Bu nedenle tez kapsamında yapılan sGAG analiz sonuçları hem yapının korunup korunmadığını hem de su tutma kapasitesini anlamak için önemli bir parametredir.

Tüm örnekler liyofilize edildikten sonra enzimatik olarak parçalanmıştır. Elde edilen test verileri doğrultusunda sGAG miktarı hesaplanmış ve sonuçlar mikrogram (µg) cinsinden ifade edilerek grafiğe aktarılmıştır.



Şekil 4.6. Doğal ve deselüerize dokudaki sGAG miktarı (n=3) (***) p < 0.001).

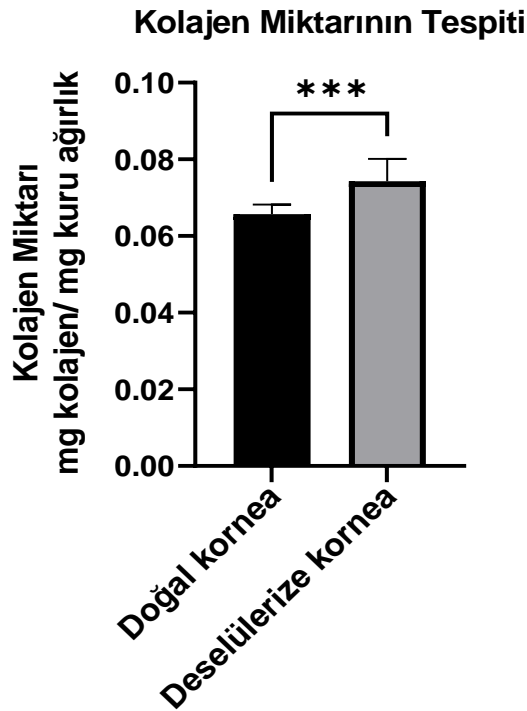
Şekil 4.6 'da deselüerize matrisin sGAG içeriği 3.47 ± 0.12 µg olarak bulunmuştur. Doğal korneanın sGAG miktarı ise 5.78 ± 0.1 µg olarak tespit edilmiştir. Bu iki veri mukayese edildiğinde deselüerize matrisin doğal korneaya göre sGAG içeriğinde %40'lık bir azalmaya sahip olduğu görülmektedir (p < 0.001).

Literatür bilgisi dahilinde GAG miktarının işlem görmemiş doğal kornea grupları ile deselüerize matris gruplarının kıyaslamalarında domuz korneasında %65'inin [145], keçi korneasında ise ortalama %72'sinin [179] korunduğu gösterilmiştir. Doğal kornea gruplarındaki GAG miktarındaki farklılıklar hayvanın cinsi ve yaşına göre değişebilmektedir. Bu nedenle yapılan deselüerizasyon çalışmalarının tamamında temin edilen sığır korneasının taze olmasına ve hayvanların aynı yaşta olmasına dikkat edilmiştir. Tüm bu sonuçlar literatür bilgisi ile değerlendirildiğinde hücre dışı matristeki GAG'ın başarılı bir şekilde korunabildiğini kanıtlanmıştır.

4.1.4. Kolajen Miktarının Kantitatif Tayini

Tez çalışmasının diğer önemli bir ölçütü olan kolajen miktarının kantitatif tayini, deselülerizasyon işlemi sonrasında dokunun hücre ekstraselüler matriksindeki kolajen bütünlüğünün değerlendirilmesinde kullanılan bir ölçüttür. Bu analiz için literatürde sıkça kullanılan Hidroksiprolin Kolorimetrik Test kiti kullanılmıştır. Bu test kiti ile öncelikle kolajen fibrillerin asit muamelesi sonucunda aminoasitlerine parçalanması sağlanmaktadır. Ardından aminoasitlerin oksidasyonu ile 4-hidroksiprolin gruplarına indirgenmektedir. Sonuçta bu grupların kolorimetrik olarak 560 nm'de absorbanlarına karşılık gelen değerlerin eldesi ile kolajen miktarı tayin edilmektedir. Bu amaçla işlem görmemiş kornea dokularının (kontrol) ve deselülerize matrikslerin hidrolizi gerçekleştirilmiş ve standartların ise ayrı olarak hazırlanması sağlanmıştır.

Doğal kornea ve deselülerize matrikslerin hidroksiprolin grafiği Şekil 4.7.'de sunulmuştur. Yapılan analiz sonucuna göre sırayla doğal dokunun ve deselülerize dokunun hidroksiprolin miktarı 0.65 ± 0.01 mg ve 0.74 ± 0.01 mg olarak tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Şekil 4.7.'de doğal ve deselülerize matriksin kolajen miktarları verilmiştir. Tüm ölçümler mg kuru ağırlığa normalize edilmiştir.



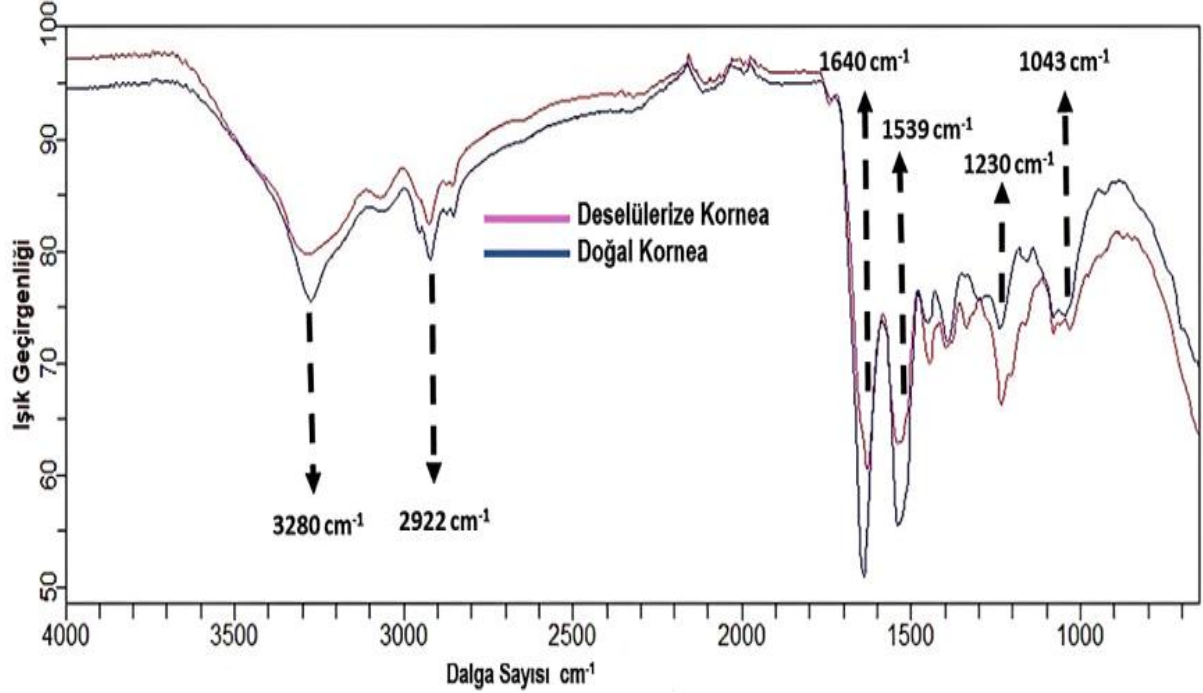
Şekil 4.7. Doğal ve deselülerize korneada kolajen miktarının karşılaştırılması (n=3 ve *** $p < 0.01$).

Kolajenin ana bileşeni olan hidroksiprolin, kolajen üçlü sarmal yapısının stabilitesinin sağlanmasında büyük öneme sahiptir ve %12.5 oranında kolajen içermektedir [180, 181]. Literatür bilgisi incelendiğinde deselülerizasyon sonrasında çözünür bileşenlerin kaybedilmesiyle yapıda bulunan hidroksiprolin miktarının birim ağırlık başına arttığı görülmektedir. Bu nedenle deselülerize dokudaki hidroksiprolin miktarı doğal dokuya oranla artmaktadır [182]. Deney sonuçlarına göre deselülerize matriksin kolajen miktarında (0.09 mg/10 mg kuru ağırlık) küçük bir artış gözlenmiştir. Bu artışın nedeni kolajen fibrillerin ve proteoglikanların kaybindan ileri gelmektedir [139].

Elde edilen bu bilgiler literatür bilgisi ile eşdeğer olup kolajenin başarılı bir şekilde ekstraselüler matriks içeriğinde korunduğunu göstermektedir [147].

4.1.2. Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi (ATR-FTIR) Analizi

Şekil 4.8. doğal ve deselülerize matrikste bulunan kimyasal bağların yapısının FTIR spektrumlarını göstermektedir. FTIR spektrumunda elde edilen pikler OMNIC yazılımı (Thermo Scientific Nicolet iS10, ABD) kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 4.8. Doğal ve deselülerize korneanın FTIR spektrumları.

Deselülerize korneaların ATR-FTIR spektroskopisi 650 ve 4000 cm^{-1} aralığında gözlenebilen kolajen ve proteoglikan değişikliklerini araştırmak için incelenmiştir. Elde edilen pikler ayrıntılı bir şekilde incelenerek daha önceki literatür bulguları ile kıyaslanmıştır. Kornea, ağırlıklı olarak doğal bir α -sarmal yapıya sahip olan kolajen tip I'den oluşmaktadır. Bu yapı herhangi bir fiziksel veya kimyasal maruziyette bozulma ihtimaline sahiptir. Deselülerizasyon esnasında kullanılan SDS deterjanı hem de dokunun maruz kaldığı stres bu konformasyonel değişikliklerin indüklenmesinde rol oynamaktadır [183].

Analiz sonuçları incelendiğinde kolajene özgü 3280 cm^{-1} de görülen pik O-H gerilim absorpsiyon bandına aittir. 2922.2 cm^{-1} 'de ortaya çıkan pik ise C-H gerilim absorpsiyon bandına aittir. Ayrıca 1043.7 cm^{-1} ve 1028.7 cm^{-1} 'de ortaya çıkan pikler glikozaminoglikanlara ait C-O gerilim absorpsiyon bandını ifade etmektedir [179]. 1230 cm^{-1} 'deki pik ise sülfatlanmış gruplardan kaynaklanan glikozaminoglikan (GAG) moleküllerini temsil etmektedir. 1640 cm^{-1} 'de görülen pik Amid-I piki olup N-H absorpsiyon bandını temsil etmektedir. Amid-II olarak bilinen ve 1539 cm^{-1} 'de görülen pik, N-H bağları nedeniyle ortaya çıkmaktadır.

FTIR spektrumları incelendiğinde deselülerize kornea yapısı ile doğal kornea yapısı büyük oranda benzerlik göstermektedir. Deselülerize kornea ve doğal korneanın yapısında büyük miktarda bulunan kolajene özgü karakterize bantların varolduğu karşılaştırmalı olarak görülmektedir. Elde edilen sonuçlar daha önceki gerçekleştirilen çalışmalarla uyum içerisinde olup deselülerize matriks yapısının doğal korneaya benzerliği kanıtlanmış olup yapıdaki kolajenin korunduğu da kanıtlanmıştır.

4.2. Hibrit Matrikslerin Eldesi

Çizelge 3.4'te ayrıntılı olarak verilen deney grupları ile elde edilen hibrit matrikslerin yapılarının karakterizasyonu için çap ve kalınlık tayini testi, ışık geçirgenliği ve transparanlık analizi, su tutma kapasitesi tayini, enzimatik degradasyon testi, PBS içerisinde degradasyon testi, FTIR analizi ve mekanik testleri karşılaştırmalı olarak yapılmıştır.

4.2.1. Çap ve Kalınlık Tayini

Kimyasal yöntemle deselülerize edilen kornealara, işlem görmemiş doğal kornea ve hibrit kornealara çap ve kalınlık ölçümü testleri yapılmıştır. Bütün deney grupları liyofilize edildikten sonra özel olarak üretilen 11 mm çapındaki punch yardımıyla eşit olarak kesilmiştir. Kalınlık ölçümlerinin tespiti için mikrometre kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Doku iskelelerine ait kalınlık ve çap ölçümleri.

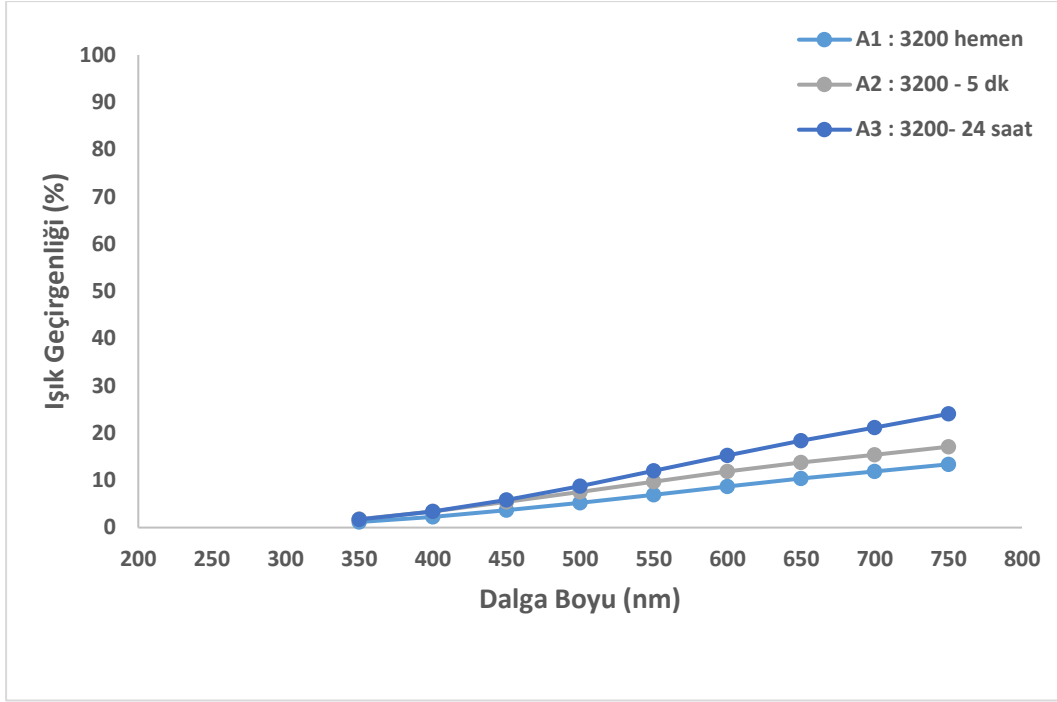
Deney Grupları n=3	Çap (mm)	Kalınlık (mm) ($X \pm SS$)
Doğal kornea	11 mm	1.52 \pm 0.08
Deselülerize kornea	11 mm	5.93 \pm 0.057

Hibrit kornea	11 mm	1.47 ± 0.2
---------------	-------	------------

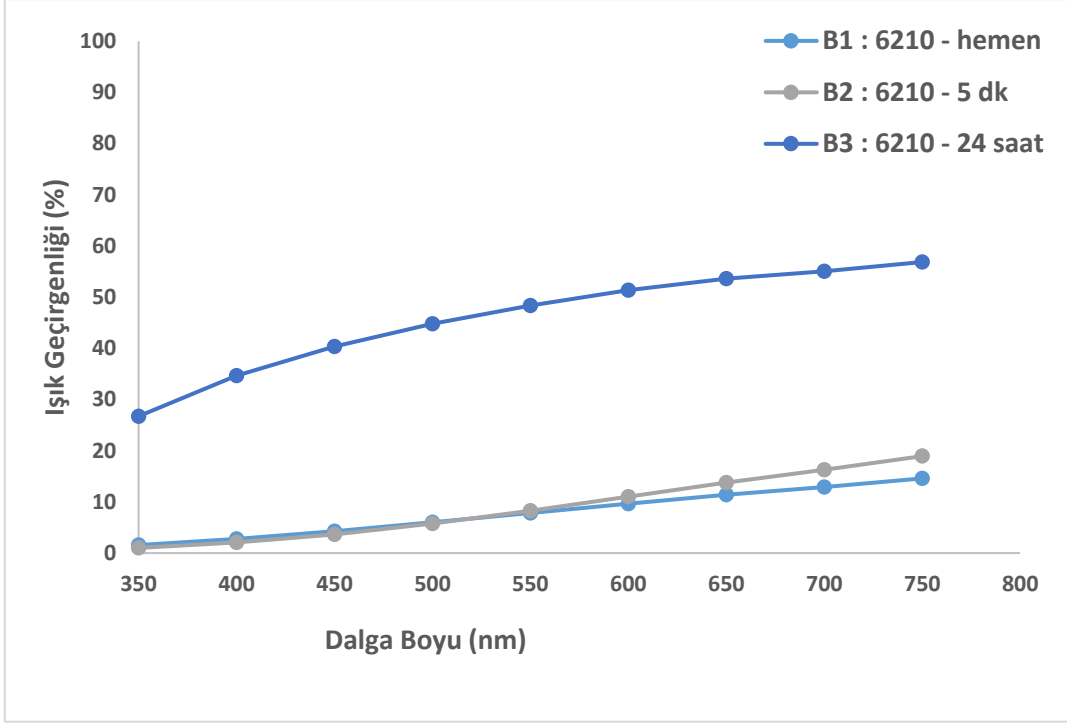
Doku iskelelerine ait kalınlıkların tespiti için mikron seviyesinde ölçüm yapan hassas mikrometre kullanılmıştır. Doğal kornea ve hibrit kornealar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Fakat deselülerize korneanın kalınlığı doğal korneaya kıyasla 4 kat daha artmıştır. Bunun nedeni deselülerizasyon işlemi nedeniyle kornea yapısının şişmesidir.

4.1.2. Işık Geçirgenliği ve Saydamlık Analizi

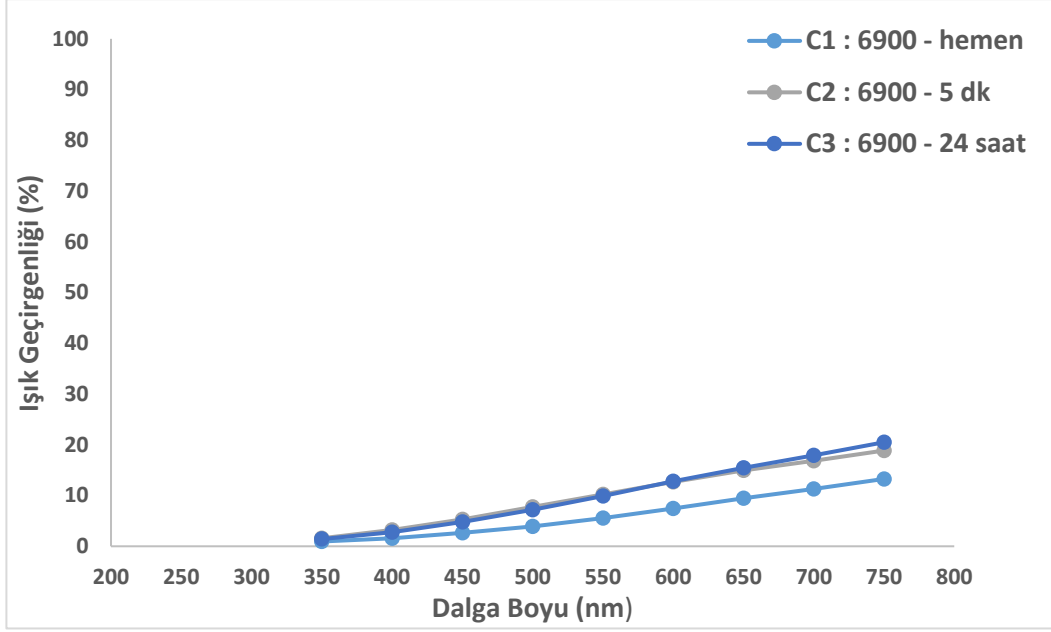
Işığın hem iletilip hem de kırılmasında önemli bir göreve sahip olan korneanın yapısındaki herhangi bir geri dönüşümsüz hasar, şeffaflık kaybına yol açarak kişide düşük görme kabiliyetinden körlüğe kadar geniş ölçüde hasara neden olmaktadır [86]. Korneanın ışık geçirgenliğindeki rolü, stroma tabakasının optik özellikleriyle doğrudan alakalıdır. Stromadaki her kolajen tip I fiberinin çapı 20-35 nm'dir ve bu fiberler 30 nm aralıklarla birbirine paralel olarak hizalanmaktadır. Bu düzenli yapı korneaya başta şeffaflık olmak üzere anatomik şeklin korunması ve yapıya güç sağlamak gibi özellikler kazandırmaktadır [15, 78, 184]. Bu çalışmada; doğal, deselülerize edilmiş ve çapraz bağlanmış hibrit yapıların ışık geçirgenliği 300-800 nm'de UV absorbansı ile belirlenmiştir. GelMA polimeri ile farklı sürelerde ve farklı UV değerlerinde muamele edilen hibrit kornealar PBS içerisinde 1 saat bekletilmiştir.



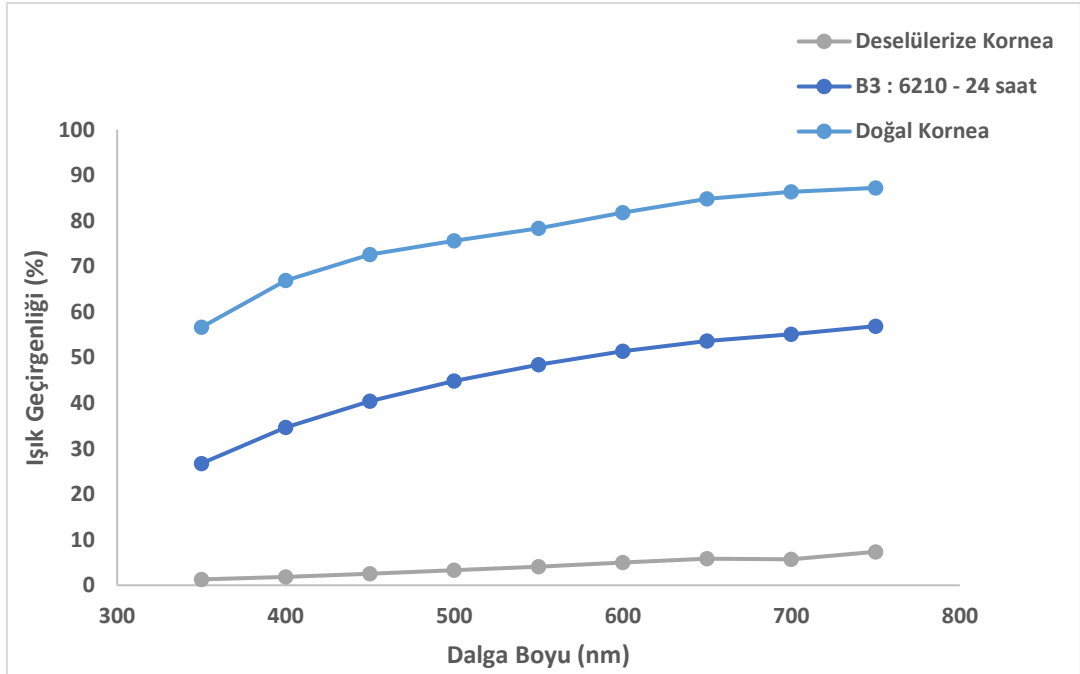
Şekil 4.9. Farklı sürelerde GelMA emdirildikten sonra $3200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ enerji yoğunluğunda çapraz bağlanan hibrit matrislerin ışık geçirgenlik analizi (n=3).



Şekil 4.10. Farklı sürelerde GelMA emdirildikten sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ enerji yoğunluğunda çapraz bağlanan hibrit matrikslerin ışık geçirgenlik analizi (n=3).



Şekil 4.11. Farklı sürelerde GelMA emdirildikten sonra $6900 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ enerji yoğunluğunda çapraz bağlanan hibrit matrikslerin ışık geçirgenlik analizi (n=3).



Şekil 4.12. Doğal, deselülerize ve B3 hibrit kornea yapılarının ışık geçirgenlik değerlerinin karşılaştırılması (n=3).

GelMA ile farklı UV değerlerinde çapraz bağlanan hibrit doku iskeleleri kendi aralarında kıyaslandığında en iyi sonucu 24 saat GelMA içerisinde bekletildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV değerinde çapraz bağlanan hibrit doku iskelesinde görülmüştür. B3 grubunun ($6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ enerji ile 24 saatte GelMA emdirilmiş), geçirgenlik değerleri $\%55.05 \pm 6.74$ iken doğal kornea $\%80.42 \pm 6.26$ olarak bulunmuştur. Ayrıca hibrit doku iskeleleri deselülerize edilmiş iskelelere göre daha fazla ışık geçirgenliğine sahiptir. Bunun nedeni GelMA polimerinin yapısal olarak ışık geçirgenliğine önemli katkıda bulunmasıdır.

700 nm 'deki tüm hibrit grupların geçirgenlik değerleri Çizelge 4.2.'de özetlenmiştir. Tüm ışık geçirgenliği sonuçları, brüt şeffaflık değerlendirmelerinin bulgularıyla yakın bir uyum içindedir.

Çizelge 4.2. 700 nm de hibrit doku iskelelerinin ışık geçirgenlik değerleri

Grup	Işık geçirgenliği (%)
A1	13.79 ± 6.13
A2	10.40 ± 0.82
A3	15.47 ± 2.69
B1	11.41 ± 3.83
B2	13.76 ± 2.96
B3	53.60 ± 6.50
C1	9.43 ± 2.15
C2	14.98 ± 4.14
C3	18.38 ± 8.44

Deselülerize edilen kornealar deselülerizasyon işlemi sırasında kullanılan SDS nedeniyle zarar görerek su basıncını kaybetmiş bu da saydamlığın azalmasına neden olmuştur. Buna bağlı olarak deselülerize doku ışık geçirgenliği açısından diğer doku iskelelerinden daha az ışık geçirmektedir. Literatürde deselülerizasyon sonrası dokunun su kaybetmesine bağlı olarak şeffaflığını kaybetmesi durumunda gliserol kullanılmıştır. Böylece stroma tabakası optik olarak berrak görünümde kalırken yapısal olarak büyük bir değişiklik gözlenmemiştir [96]. Tez kapsamında

yapılan çalışmalarımızda gliserol kullanılmamasına rağmen GelMA sayesinde şeffaflık büyük ölçüde sağlanırken anatomik yapı da korunmuştur.

Işık geçirgenliği analizinin yanında deney gruplarının saydamlıklarını gözlemlemek için doku iskeleleri yazı üzerine konulmuştur. şeffaflık sonuçları şekil 4.13'te verilmektedir. GelMA hidrojeli emdirildikten hemen sonra farklı UV enerjileri (3200 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ ve 6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) ile çapraz bağlanan hibrit kornea yapıları benzer şeffaflık göstermiştir. şekil 4-A GelMA ile hemen muamele edilip çapraz bağlanan grupları, şekil 4-B 5 dakika GelMA emdirildikten sonra çapraz bağlanan grupları, son olarak da şekil 4-C 24 saat GelMA emdirildikten sonra çapraz bağlanan grupları göstermektedir. Bu sonuçlara göre 24 saat boyunca GelMA emdirildikten sonra farklı enerji yoğunluklarında çapraz bağlanan gruplar, diğerlerine kıyasla daha şeffaf görünüme sahiptir.

24 saatlik GelMA ile emdirilme işleminden sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ enerjide gerçekleştirilen fotopolimerizasyon işlemi sonucunda gerçekleştirilen makroskopik incelemelere göre en uygun protokol B3 grubu olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular işık geçirgenlik ölçümleri ile paralel olup birbirini destekler niteliktedir.

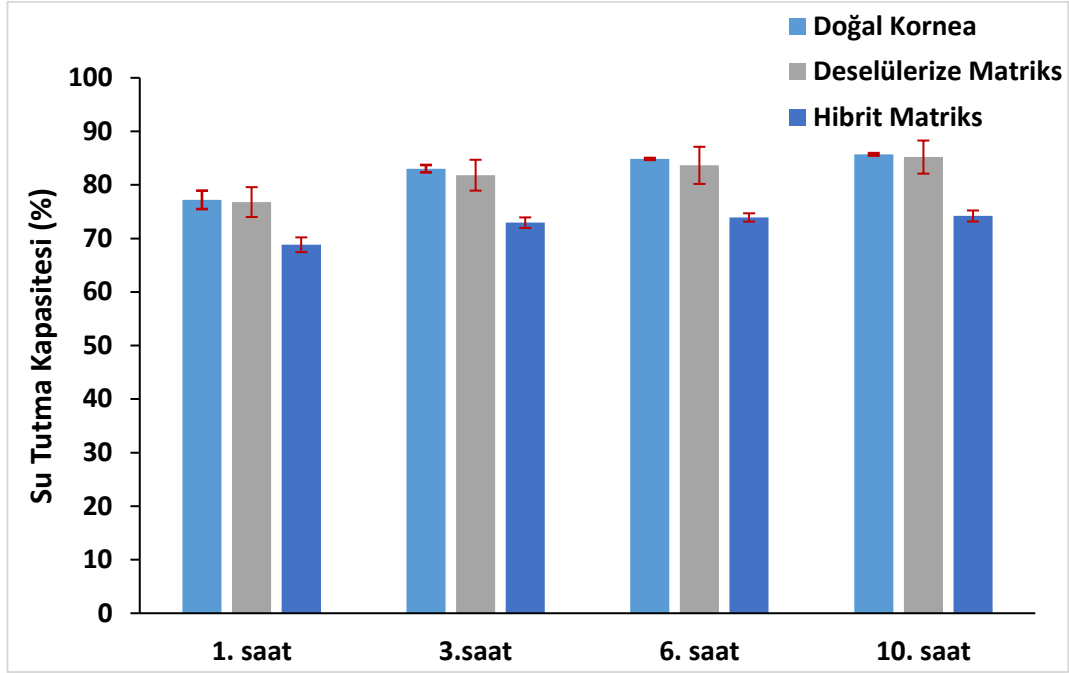


Şekil 4.13. Farklı enerji yoğunlukları ile farklı sürelerde GelMA ile emdirilen hibrit matrislerin şeffaflık üzerindeki etkilerini gösteren görüntüler. Gruplar $3200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$, $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ve $6900 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV ışığına (365 nm) maruz bırakılmıştır. 200 μL GelMA polimeri üzerine emdirildikten hemen sonra çapraz bağlanmış yapılar (A), 5 dakika sonra (B), 24 saat sonra GelMA emdirilmiş hibrit matrisler (C).

4.1.4. Su Tutma Kapasitesi Tayini

Karakterizasyon testleri neticesinde en yüksek şeffaflığa ve en yüksek mekanik dayanıma sahip olduğu tespit edilen Grup B3 (24 saat GelMA emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ enerjide UV çapraz bağlanan grup) doğal kornea ve deselülerize edilmiş kornea ile karşılaştırmalı olarak şişme testine tabii tutulmuştur. Bunun için tüm deney gruplarının kuru ağırlıkları ölçülerek belirlenmiştir (W_0). Ardından örnekler $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 3 mL PBS (0.1 M) solüsyonuna konularak belli aralıklarla bu solüsyondan alınarak ağırlıkları ölçülmüştür. PBS içerisinden alınan örneklerde fazla su filtre kâğıdı ile uzaklaştırılarak ölçümleri yapılmıştır (W_h). Su tutma

kapasitesinin tayini için uygulanan şişme testi ile matrikslerin su tutma kapasiteleri hesaplanmıştır.



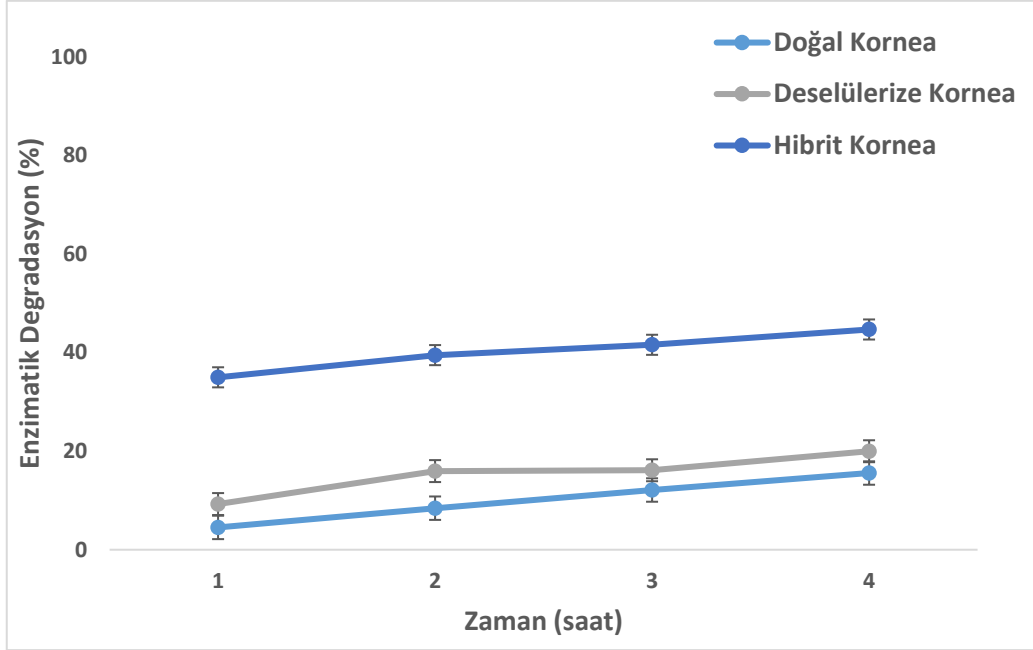
Şekil 4.14. Doğal, deselülerize ve hibrit matrikslerin stromal yapılarının su tutma kapasitelerinin karşılaştırılması (n=3 ve ****p < 0.0001).

Literatür çalışmalarında görüldüğü gibi doğal korneanın su tutma kapasitesi 78 ± 3 'tür [185]. Deneysel sonuçlarına göre doğal korneanın su tutma kapasitesi 85.7 ± 0.22 bulunurken deselülerize korneanın su tutma kapasitesi 85.2 ± 3.09 olarak bulunmuştur. Hibrit yapının su tutma kapasitesi ise 74.2 ± 1.03 olarak tespit edilmiştir. 10 saat süren deney sonucunda doğal kornea ve deselülerize korneanın su tutma kapasitesinde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Bu iki veri deselülerizasyon işleminin etkili ve başarılı olduğunun göstergesidir ($p < 0.001$). Diğer yandan hibrit korneanın su tutma kapasitesinin diğer iki deney grubuna göre daha düşük olmasının nedeni GelMA polimerinin yapısal özelliklerinden ve UV altında çapraz bağlanmasından ileri gelmektedir.

4.1.5. Enzimatik Degradasyon Testi

Doku mühendisliğinde kullanılan sentetik ve doğal polimerler kullanıldıkları dokuya özgü belirli degradasyon kriterlerine sahip olmalıdırlar. Literatürde kolajen bazlı

biyomalzemelerin stabilitesini değerlendirmek için pepsin, tripsin ve kollajenaz gibi proteolitik enzimler kullanılmaktadır [87]. Bu çalışmada, kolajenaz A solüsyonu kullanılarak nihai matriksin stabilitesini değerlendirmek için hazırlanan yapıların bozunma davranışı araştırılmıştır.



şekil 4.15. Doğal, deselülerize ve B3 (24 saat GelMA emdirildikten sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjisi ile çapraz bağlanan grup) hibrit yapısının kolajenaz A enzimi ile degradasyon testi (n=3).

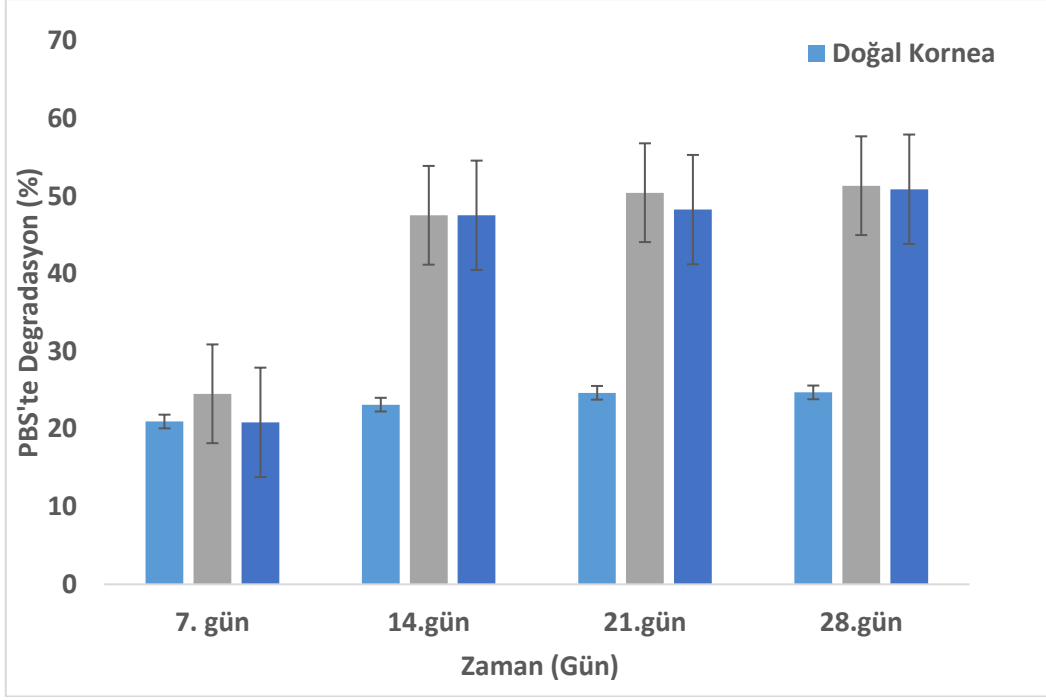
şekil 4.15'te, doğal ve deselülerize kornea stromal yapılarına kıyasla hibrit numunelerdeki (24 saat GelMA emdirildikten sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjisi ile çapraz bağlanan grup) kütle kaybını göstermektedir. 4 saatlik sürenin sonunda hibrit yapı için $\%44.68 \pm 5.99$, doğal kornea için $\%15.56 \pm 2.84$ son olarak da deselülerize doku için $\%19.98 \pm 2.56$ kütle kaybı hesaplanmıştır. Hibrit yapının deselülerize yapıya göre daha fazla kütle kaybettiği görölmektedir. Bu durum hibrit yapının içeriğindeki GelMA polimerinin hidrojel özelliğinde olmasından kaynaklanmaktadır. Hidrojeller büyük miktarda su tutma kapasitesine sahip malzemelerdir. Çalışmada GelMA'nın UV altında çapraz bağlanması neticesinde yoğunluğunun arttırılmasıyla beraber 3D yapısında sıkılaşma gözlenmiştir. Bu durum ise hidrasyon oranında bir azalmaya yol açmaktadır [186]. Hibrit kornea stromal yapılarının hidrasyon oranları beklendiği gibi GelMA hidrojel ile

emdirildikten sonra azalmıştır. Bu durum malzemenin bozunma profili ve yapıların kararlılığı hakkında bir fikir veren önemli bir faktördür. Çalışmanın nihai bir sonucu olarak elde ettiğimiz deselülerize kornea ile GelMA'nın başarılı bir şekilde senkronizasyonu ile elde edilen hibrit matriksler hem kullanılan GelMA'nın yüzde oranı hem de UV altında çapraz bağlanma süre ve enerjisiyle ayarlanmıştır.

Elde edilen hibrit kornea stromal yapıları için, B3 olarak adlandırılan grup (24 saat GelMA emdirildikten sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjisi ile çapraz bağlanan grup) %8'lik üretilen GelMA'nın varlığı ve konsantrasyonuna bağlı olarak hem enzimatik hem de PBS bozunma çalışmalarında doğal korneaya kıyasla yüksek bozunma oranı göstermiştir. Kolajenazın enzimatik degradasyon için kullanıldığı GelMA'daki bozunma raporlarına göre, %10'luk GelMA'nın 4 saatlik süren enzim muamelesinde yaklaşık %30'unun degrade olduğu bildirilmiştir [187]. Deney sonuçları literatür bilgisiyle benzerlik göstermektedir.

4.1.6.PBS İçinde Degradasyon Testi

Şekil 4.16'da doğal, deselülerize ve hibrit matriksin (24 saat GelMA emdirildikten sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjide çapraz bağlanan grup) PBS'deki bozunma profili verilmiştir. 4 hafta süreyle gerçekleştirilen bu testte 7. Günde doğal, deselülerize matriks ve hibrit matriks yapıları için sırasıyla 20.98 ± 10.83 , 24.55 ± 4.53 ve 20.87 ± 3.51 olarak hesaplanmıştır. 28. güne gelindiğinde ise doğal kornea 24.73 ± 6.55 , deselülerize matriks 51.37 ± 4.29 ve hibrit matriks 50.9 ± 10.34 oranında kütle kaybına neden olmuştur ($p < 0.0001$).



Şekil 4.16. Doğal kornea, deselüleriye matriks ve hibrit matriks (24 saat GelMA emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjide çapraz bağlanan grup) PBS içinde bozunma davranışının karşılaştırılması (n=3 ve $p < 0.0001$).

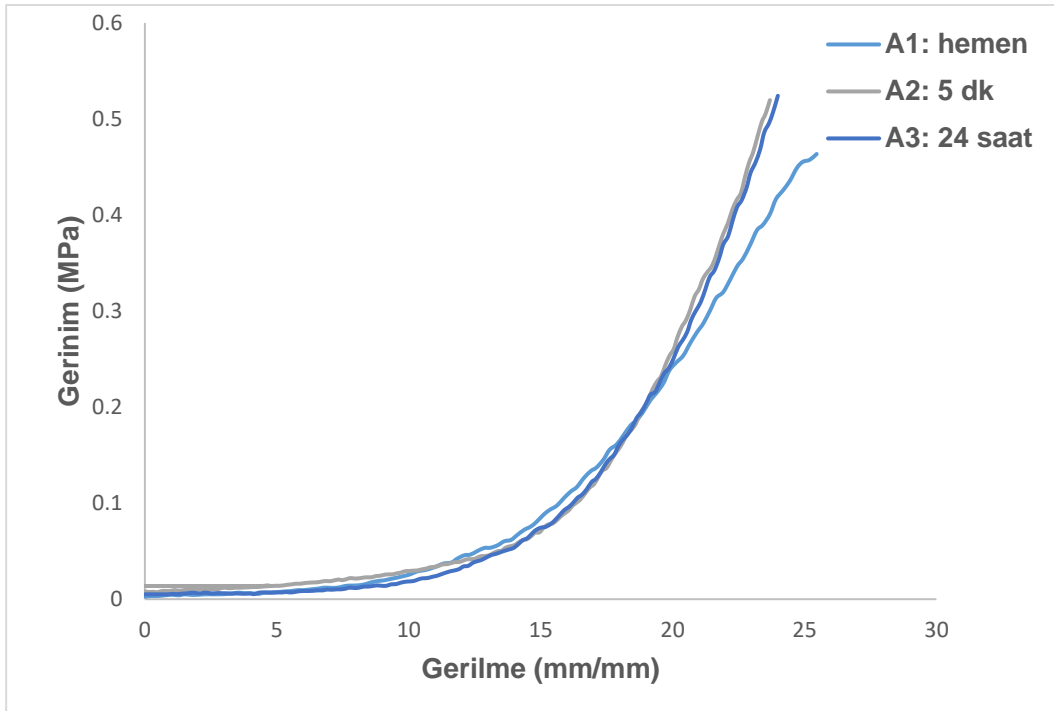
Literatürde GelMA konsantrasyonu ile PBS içerisinde bozunma süresi arasında doğrusal bir ilişki olduğu öne sürülmektedir [187]. Buna rağmen çalışma kapsamında %8 oranında üretilen GelMA, UV'de çapraz bağlama süresinin uzatılmasıyla senkronize edilmiştir.

4.1.7. Mekanik Testler

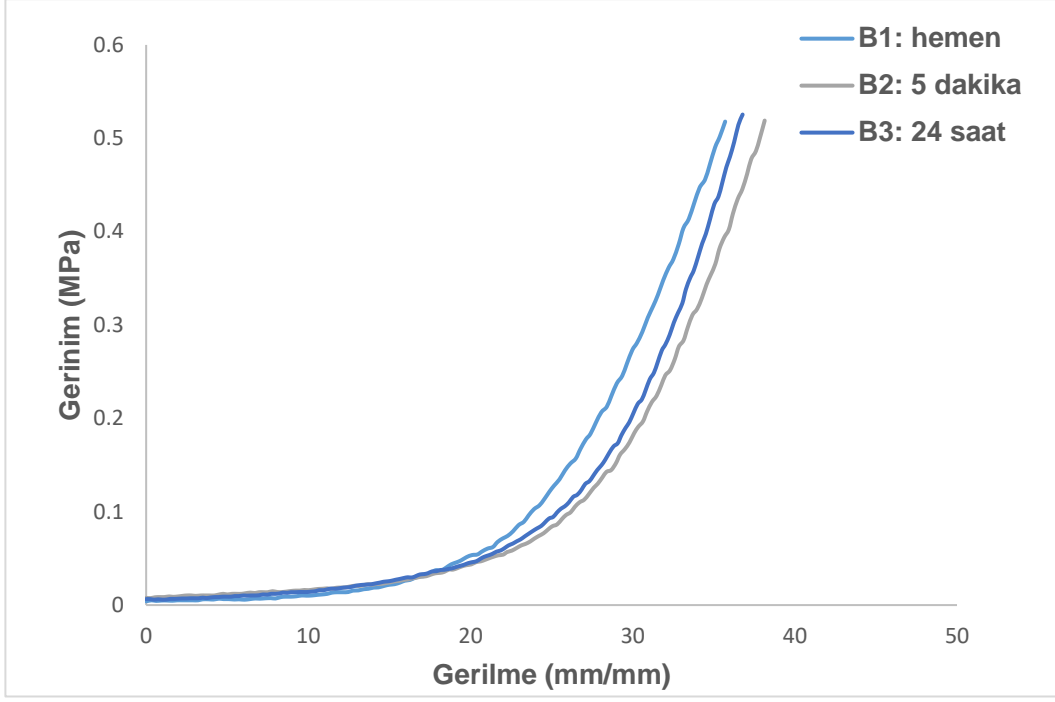
Korneanın mekanik davranışı dokunun mikro yapısından temel olarak anatomik şekil ve kalınlığıyla doğrudan ilişkilidir. Tez kapsamında hibrit korneaların mekanik davranışı GelMA polimeri ile farklı emdirilme sürelerine ve farklı enerjilerde çapraz bağlanma yoğunluklarına bağlı olarak kornea dokusuna etkisini net olarak belirlemek için incelenmiştir.

Doku mühendisliği teknikleri ile üretilecek korneanın klinikte kullanılabilirlik düzeyi hakkında yorum yapabilmek için malzemenin taşıyabileceği maksimum yükünü, sıkıştırılabilirliğini, basınç altında sergilediği özelliklerini, elastikiyeti son olarak da malzemelerin biyomekanik özelliklerini bilmek ve bu doğrultuda ürün üretmek

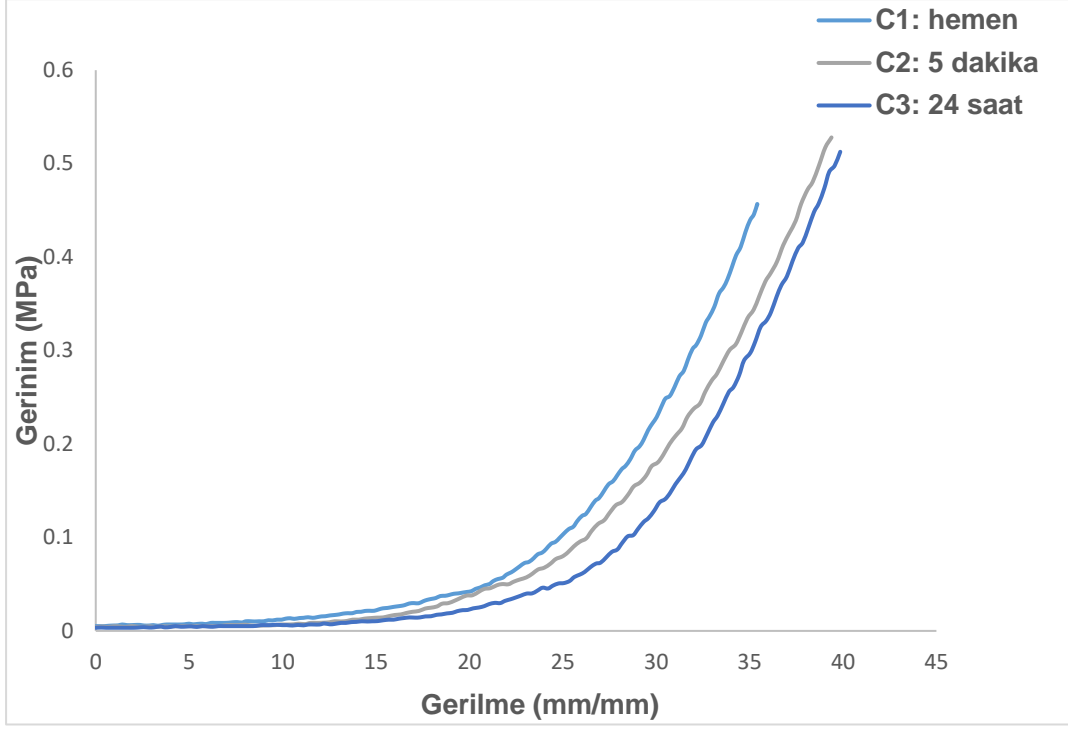
gerekmektedir. Bu noktada çekme testi malzemelerin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde sıklıkla tercih edilen mekanik testlerden birisidir. Grup A olarak kategorize edilen grup farklı sürelerde (hemen, 5 dakika 24 saat) GelMA emdirildikten sonra $3200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV'de çapraz bağlanan hibrit matriksleri temsil etmektedir. Grup B olarak kategorize edilen grup farklı sürelerde (hemen, 5 dakika 24 saat) GelMA emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV'de çapraz bağlanan hibrit matriksleri temsil etmektedir. Grup C olarak kategorize edilen grup ise farklı sürelerde (hemen, 5 dakika 24 saat) GelMA emdirildikten sonra $6900 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV'de çapraz bağlanan hibrit matriksleri temsil etmektedir. Son olarak doğal, deselülerize ve B3 grubu olarak isimlendirilen 24 saat GelMA emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ enerjide UV'de çapraz bağlanan hibrit matriks grubu karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.



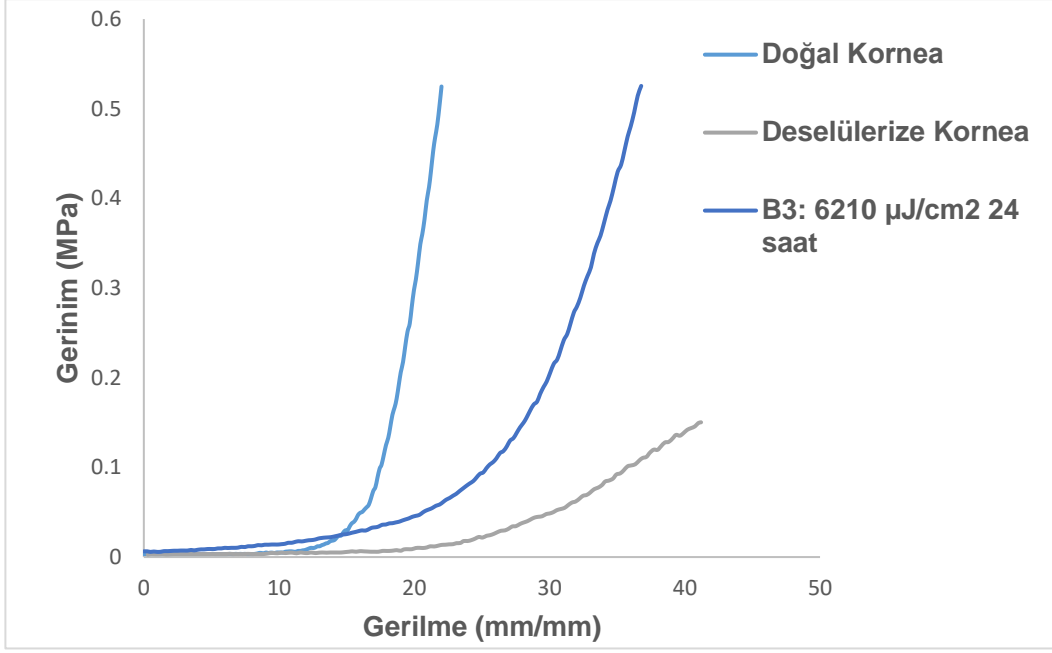
Şekil 4.17. Farklı sürelerde (hemen, 5 dakika, 24 saat) GelMA emdirildikten sonra $3200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjisi çapraz bağlanan hibrit matrikslerin gerilim-gerinim grafiği.



Şekil 4.18. Farklı sürelerde (hemen, 5 dakika, 24 saat) GeIMA emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjisi çapraz bağlanan hibrit matrikslerin gerilim-gerinim grafiği.



Şekil 4.19. Farklı sürelerde (hemen, 5 dakika, 24 saat) GelMA emdirildikten sonra $6900 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjisi çapraz bağlanan hibrit matrikslerin gerilim-gerinim grafiği.



Şekil 4.20. Doğal kornea deselülerize kornea ve B3 (24 saat GelMA emdirildikten sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjisi ile çapraz bağlanan grup) hibrit matriksine ait gerilim- gerinim grafiği.

Çekme testi sonuçlarının grafik ile ifade edilen bulgularına bakıldığında Grup A olarak kategorize edilen grup farklı sürelerde (hemen, 5 dakika 24 saat) GelMA emdirildikten sonra 3200 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV'de çapraz bağlanan hibrit matriksler %20-25 aralığında % gerilme göstermektedir. Grup B olarak kategorize edilen deney grubu farklı sürelerde (hemen, 5 dakika 24 saat) GelMA emdirildikten sonra 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV'de çapraz bağlanan hibrit matriksler %34-40 aralığında % gerilme göstermektedir. Bu duruma net bir şekilde artan çapraz bağ yoğunluğu etki etmiştir. Grup C olarak kategorize edilen grup ise farklı sürelerde (hemen, 5 dakika 24 saat) GelMA emdirildikten sonra 6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV'de çapraz bağlanan hibrit matriksler ise ve Grup B ile benzer bir eğilim göstermektedir. Çekme testi sonuçları kendi aralarında mukayese edildiğinde B3 olarak adlandırılan hibrit kornea yapısının gerilim- gerinim eğrisi tekrardan doğal ve deselülerize kornea yapılarına karşı değerlendirilmiştir.

Hibrit matriks yapılarının mekanik analizleri, UV'ye maruz kalma süresinin arttırılmasının deselülerize korneaya kıyasla sıkıştırma modülünü iyileştirdiğini ortaya çıkarmıştır. Literatürde deselülerize kornea matrikslerinin sıkıştırma

modüllerinin uygulanan protokole, test koşullarına, hayvanın yaşına ve sağlığına bağlı olarak 0.1 ila 57 MPa aralığında olduğu bildirilmektedir [188].

Literatürde SDS ile deselülerizasyonun korneanın şeffaflığı ve mekanik özellikleri üzerindeki zararlı etkileri zaten bildirilmiştir [189, 190]. Bu çalışma korneanın şeffaflık ve mekanik özelliklerini iyileştirmeyi amaçlamaktadır. Bu doğrultuda GelMA polimerinin farklı süre ve enerjide kullanımı deselülerizasyon protokolünün literatürde bahsedilen yıkıcı etkilerini geride bırakarak bu özelliklerin iyileştirilmesi sağlanmıştır. Gerilim-gerinme grafiğinden sıkıştırma modülü verileri hesaplanarak Çizelge 4.3.'te verilmiştir.

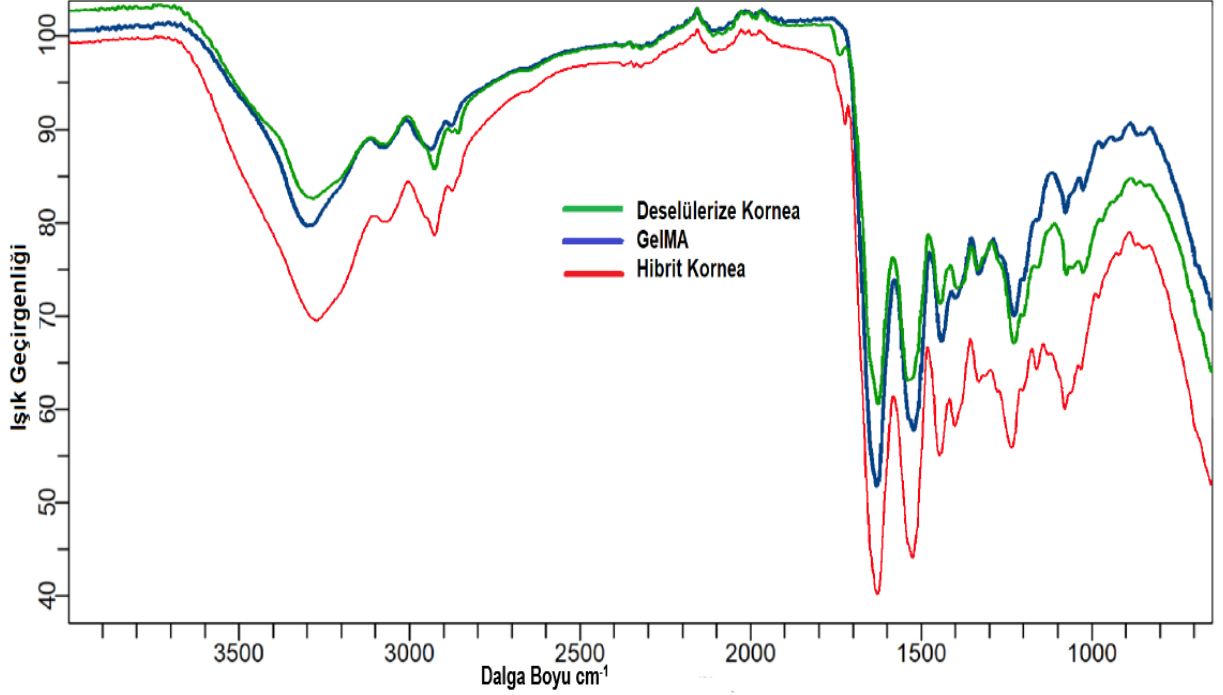
Çizelge 4.3. Doğal, deselülerize ve hibrit matrislerin sıkıştırma modülü (MPa)

Gruplar	Sıkıştırma Modülü (MPa)
Doğal kornea	9.79 ± 0.56
Deselülerize kornea	0.87 ± 0.15
A1	4.19 ± 0.56
A2	4.14 ± 0.52
A3	4.85 ± 0.82
B1	4.37 ± 0.97
B2	4.47 ± 0.85
B3	5.04 ± 0.68
C1	3.93 ± 0.43
C2	4.33 ± 0.82
C3	4.80 ± 0.26

Sıkıştırma modülü, eğrilerin doğrusal bölgesinden hesaplanmıştır. Doğal korneanın sıkıştırma modülü 9.79 ± 0.56 MPa hesaplanırken deselülerize kornea için bu değer 0.87 ± 0.15 MPa olarak belirlenmiştir. Deselülerize kornea grubu için elde edilen düşük mekanik mukavemet değerleri, kullanılan deselülerizasyon protokolünün yan etkilerinin bir göstergesidir. GelMA polimerinin optimal şartlarda çapraz bağlanmasıyla doğal dokuya en yakın değerde mekanik özelliklerin elde edildiği deney kapsamında gösterilmiştir. B3 grubunun sıkıştırma modülü hibrit kornea yapıları arasında en yüksek (5.04 ± 0.68 MPa) değerde görülmektedir.

4.2.2. Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi (ATR-FTIR) Analizi

Çalışma kapsamında üretilen 24 saat GelMA emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV'de çapraz bağlanan hibrit matriks grubu, GelMA polimeri ve deselülerize korneanın kimyasal yapısı karşılaştırmalı olarak ATR-FTIR analizine tabi tutulmuştur. Şekil 4.21'de bu yapılara ait FTIR spektrumu verilmiştir.



Şekil 4.21. Deselülerize kornea, GelMA polimeri ve 24 saat GelMA emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV'de çapraz bağlanan hibrit matriks grubunun kimyasal yapısının FTIR grafiği

Şekil 4.21' de 1632.6 cm^{-1} 'de gözlenen pik, N-H bağları nedeniyle oluşup C=O bağlarının vibrasyonunu gösteren Amid-III piki olarak adlandırılmaktadır ve bu pikin yeri ile yoğunluğu jelatinin ikincil yapısının sonucudur. Ayrıca 1632.6 cm^{-1} 'de görülen pikin tepe noktası, jelatin ve metakrilat anhidrit arasındaki etkileşimi göstermektedir [160]. 1524.5 cm^{-1} 'de görülen pik Amid-II pikidir. N-H bağlarının vibrasyonundan ve kısmen C-N bağlarından dolayı oluşmaktadır. 1230 cm^{-1} 'de ortaya çıkan C-H gerilmesine ait absorpsiyon bandıdır [191]. 3295 cm^{-1} 'de görülen pik O-H gerilme absorpsiyon bandından oluşmaktadır [192]. 3071.3 cm^{-1} 'de görülen pik ise C-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 24 saat GelMA polimeri emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjide çapraz bağlanan

hibrit matriks yapısına ait FTIR grafiği incelendiğinde hem kolajen yapısının korunduğu hem de GelMA polimeri ile uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

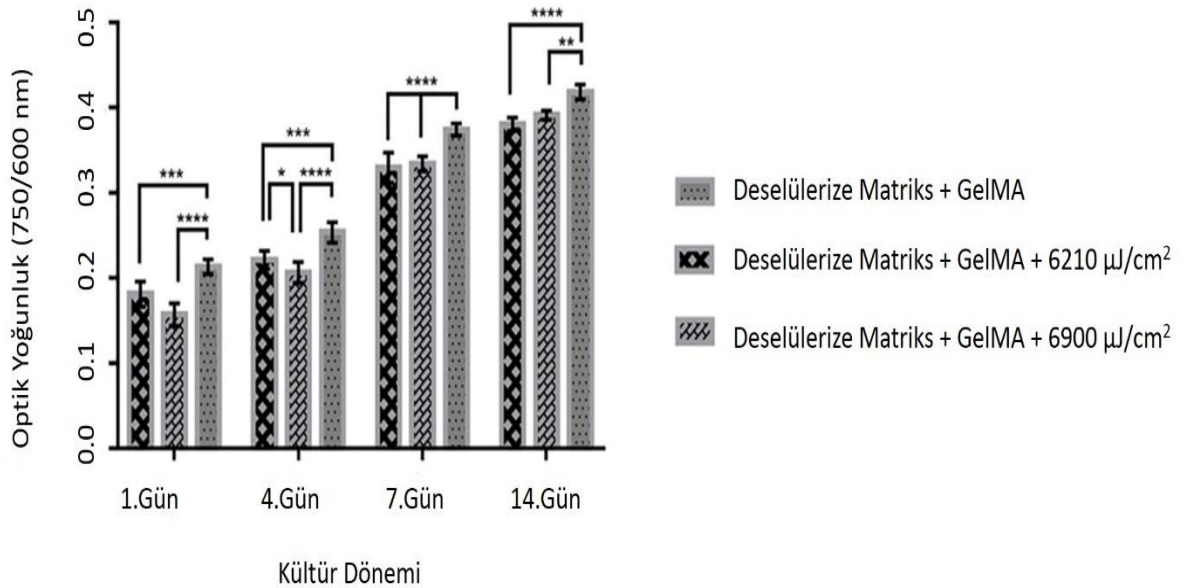
Elde edilen sonuçlar daha önce gerçekleştirilen çalışmalarla da uyumludur [158]. Sonuç olarak FTIR sonuçları GelMA'nın başarılı bir şekilde sentezlendiğini ve hibrit matriks ile uyum içerisinde olduğunu göstermektedir.

4.3. *In Vitro* Çalışmalar

DeneySEL çalışmaların son grubu olarak *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Tez kapsamında yapılan *in vitro* çalışmaların tümünde primer kültürle kornedan elde edilen primer hücreler kullanılmıştır. Deselülerize sığıR korneasına hücre ekimi yapılmıştır. 4., 7. ve 14. günlerde hücre yapışması, başarısı ve morfolojisi farklı çalışmaları ile incelenmiştir.

4.3.1. Deselülerize Matrikslere Hücre Ekimi

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında sığıR korneasından elde edilen hücreler primer kültürde çoğaltılmıştır. 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ ve 6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV'de deselülerize matriksin (DBC) kültür süresince değişimi grafiğe aktarılarak hücre üreme eğrisi raporlanmıştır.



Şekil 4.22. Deselülerize kornea GelMA (DBC + GelMA), Deselülerize kornea GelMA 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ (DBC + GelMA+6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$), Deselülerize kornea

GelMA 6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ (DBC + GelMA+6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) hücre proliferasyon grafiği. [193] (n=3 ve $p < 0.0001$).

Şekil 4.22' de görüldüğü gibi elde edilen proliferasyon verilerine göre en yüksek hücre canlılığı DBC + GelMA grubunda gözlenmiştir. Başlangıçta tüm malzemeler üzerinde eşit miktarda hücre ekimi yapılmasına rağmen, UV'nin hücreler üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı UV ile muamele edilmiş gruplarda, UV ile muamele edilmeyen gruplara kıyasla, düşük hücre canlılığı gözlenmiştir. DBC + GelMA (UV ile muamele edilmemiş) grubunun, hücre canlılığı açısından üstünlüğünü koruduğu gözlemlenmiştir. Ancak UV çapraz bağlı GelMA grupları içeren gruplarda özellikle kültür periyodunun 7. ve 14. gününde proliferasyon oranı dikkat çekici bulunmuştur.

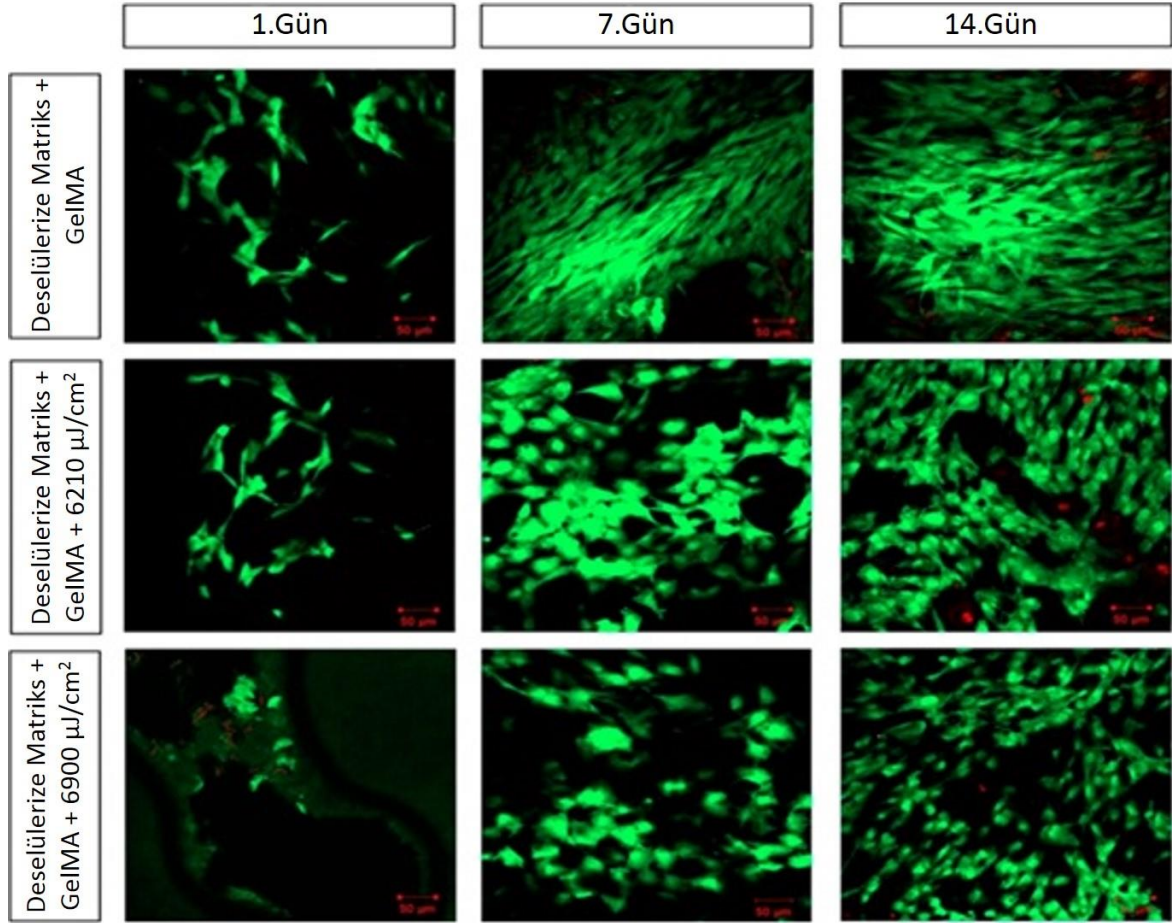
GelMA'nın çapraz bağlanmasının kültür döneminin başında hücrelerin canlılığını azalttığı ancak GelMA polimerinin biyolojik kökeninden dolayı iyi bir hücre çoğalması gösterdiği sonucuna varılmıştır [157].

4.3.2. Canlı / Ölü Analizi

Canlı Ölü boyama kalsein ve propidyum iyodür boyalarının DNA'ya bağlanması sayesinde bize doku iskelesi üzerinde bulunan hücrelerin canlı yada ölü olması ile ilgili bilgi vermektedir. Kalseinin asetoksimetil esteri lipofilik olduğu için hücre zarı geçirgenliği oldukça yüksektir. Kalsein, kendisi florasan bir molekül olmamasına rağmen canlı hücrelerde bulunan esteraz enzimi ile etkileşime girmektedir. Propidyum iyodür boyası ise hücre çekirdeğini boyayabilen fakat hücre zarından geçemeyen bir boyadır. Bu boya ölü hücre zarının düzensiz bölgelerinden geçerek çekirdeğe ulaşır ve hücrenin DNA çift sarmalını boyayarak kırmızı florasan ışımaya yapar.

Tez kapsamında üretilen hibrit matrikslere canlı ölü boyama testi uygulanmıştır. Test neticesinde Şekil 4.18' de alınan eş odaklı mikroskopi görüntüleri göstermektedir. Tüm doku iskelelerinde hücre yapışması ve çoğalması gözlemlenmiştir. Kültürün ilk gününde 6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjisi ile çapraz bağlanan

grupta en az hücre sayısı gözlenmiştir. 4. günde hücreler açılmış ve yayılmaya başlamış, 7. gün tüm yüzeyi tamamen kaplamıştır.



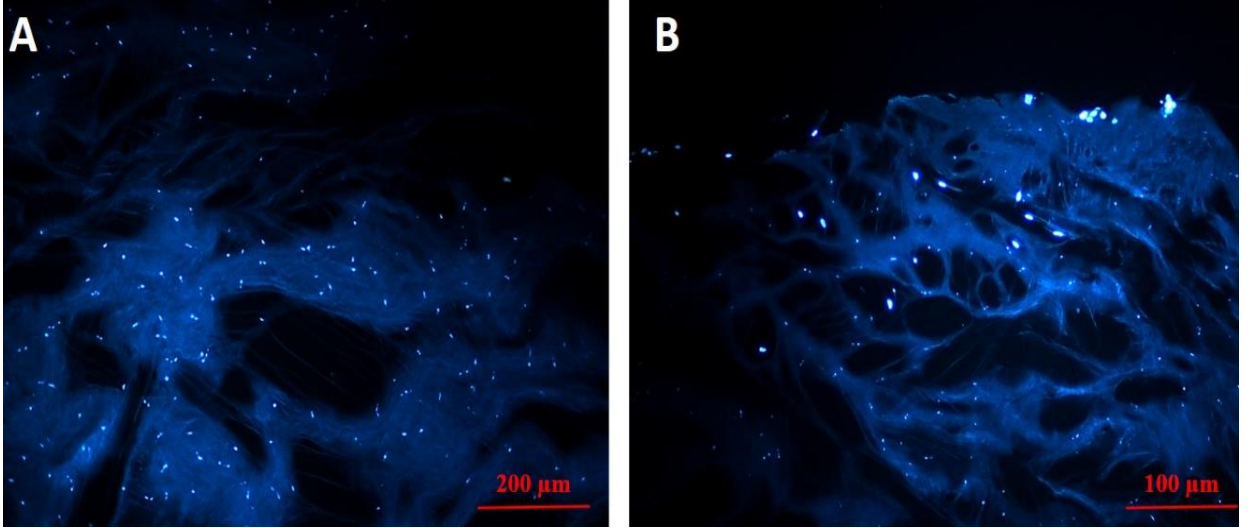
Şekil 4.23. Canlı ölü testi ile hibrit malzemeler üzerinde hücre canlılığı ve hücre morfolojisinin belirlenmesi.20X [193]

Doğal kornea stromasındaki keratositler aşırı lamellipodia ile birlikte büyük ve yuvarlak bir hücre gövdesine sahiptir [194, 195]. UV ile muamele edilmeyen grupların kültürün sonraki günlerinde fibroblastik bir morfoloji sergilediği gözlenirken, UV ile muamele edilmiş gruplarda orijinal hücre morfolojilerini koruduğu gözlenmiştir.

4.3.3.Reselüllerizasyon

Çalışma kapsamında üretilen 24 saat boyunca GelMA polimeri ile emdirildikten sonra 6210 µJ/cm² enerjide çapraz bağlanan hibrit matris grubu reselüllerizasyon çalışmalarına tabi tutulmuştur. Çalışmanın başarısı DAPI boyama yöntemi ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.24.'te, malzeme üzerine dağılmış koyu mavi boyalı hücre çekirdekleri açıkça gözlenmektedir.

Öte yandan, statik ekime bağlı olarak, hibrit matriks üzerinde daha fazla hücre çekirdeği görülmektedir. Bu bulgular reseüerizasyon işleminin etkili bir şekilde gerçekleştirildiğinin kanıtıdır.



Şekil 4.24. 7 günlük kültürlenmiş hibrit yapılarda hücre çekirdeği dağılımının belirlenmesi. (A) 200, (B) 100 µm.[193]

GelMA emdirilerek bir ECM yapısı içinde in situ çapraz bağlanmayla elde edilen hibrit matriks yaklaşımı ile istenen mekanik özelliklerin ve şeffaflığın elde edileceği düşünülmüştür. Nihai yapı olarak kabul edilen 24 saat boyunca GelMA polimeri ile emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ enerjide çapraz bağlanan hibrit matriks grubu ile hem GelMA polimerinin ayarlanabilir fiziksel özelliklerinden yararlanılmış hem de deselülerize dokunun doğal mikro mimarisinden ve bileşiminden yararlanılmıştır.

Bunun dışında, hibrit yapının şeffaflık seviyesi ve mekanik özellikleri, in vivo testlerle araştırılmaya değer olup özellikle literatürdeki transpante edilebilir deselülerize dokunun sınırlamalarını ortadan kaldıracağı ön görülmüştür

5. GENEL SONUÇ VE ÖNERİLER

- ✓ Çalışma kapsamında SDS tabanlı deselüerizasyon yöntemi kullanılmıştır. SDS'nin zararlı etkileri PBS ile yıkama sayısının artırılmasıyla büyük oranda giderilmiştir.
- ✓ Sığır kaynağından elde edilen kornealar kimyasal deselüerizasyon yöntemiyle deselüerize edilmiş ve protokol sonrası petri kaplarında bastırılarak liyofilize edilmiştir. Bu sayede bütün deney grupları için kornea kalınlıkları çok yakın değerlerde elde edilmiştir.
- ✓ Deselüerize korneaların karakterizasyonu için histolojik ve floresan boyamalar yapılmıştır. Histolojik boyamalar deselüerizasyon işleminin başarısını ortaya koymuştur.
- ✓ Hematoksilen eozin boyamada kontrol grubu, korneanın hücreleri ve katmanları belirli bir şekilde boyanmış ve diğer gruplardaki değişimler gözlemlenmiştir. Kimyasal deselüerizasyonla hücrelerin tamamen uzaklaştığı, ECM matriksin kontrol grubuna göre daha gevşek olduğu görülmüştür.
- ✓ DAPI boyamada hematoksilen eozin boyamaya paralel sonuçlar elde edilerek deselüerizasyon işleminin başarısı bir kere daha kanıtlanmıştır.
- ✓ Deselüerize matriks ve doğal kornea sGAG miktarının tespiti için DMBB testine tabi tutulmuştur. Bu testin sonuçlarına göre doğal korneaya kıyasla deselüerize matriksin sGAG miktarında %40 oranında bir azalma tespit edilmiştir. Literatür bilgisiyle paralellik gösteren bu oran aynı zamanda deselüerizasyon işleminin başarısını da ortaya koymuştur. sGAG oranı ile ilerleyen çalışmalar için hem sağlam bir ECM yapısının elde edildiği hem de su tutma kapasitesinin istenilen oranda olduğu bilgisine varılmıştır.
- ✓ Deselüerize dokuda kalan artık DNA miktarının tespiti için yapılan Picogreen testinin sonuçlarına göre işlem görmemiş kontrol grubunda 81.67 ± 4.9 ng DNA bulunurken, deselüerize matrikslerde 24.39 ± 2.5 ng DNA tespit edilmiştir. Sonuç olarak, doğal dokudan %70 DNA uzaklaştırılarak başarılı bir deselüerize matriks elde edilmiştir.

- ✓ Kolajen miktarının kantitatif tayini için kullanılan hidroksiprolin test sonuçlarına göre doğal dokunun ve deselülerize dokunun hidroksiprolin miktarı 0.65 ± 0.01 mg ve 0.74 ± 0.01 mg olarak tespit edilmiştir. Deselülerize matriksin kolajen miktarında (0.09 mg/10 mg kuru ağırlık) gözlenen bu küçük artışın nedeni deselülerizasyon sonrasında proteoglikanlar gibi çözünür bileşenlerin kaybedilmesiyle yapıda bulunan hidroksiprolin miktarının birim ağırlık başına artmasıdır.
- ✓ Tez çalışmalarının ikinci aşamasında kornea doku mühendisliğinde kullanılabilecek hibrit doku iskeleleri tasarlanmıştır. GelMA polimeri ile adsorblanma karakterizasyonları yapılmış ve bu veriler doğrultusunda UV altında farklı enerji ve farklı sürelerde çapraz bağlanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon işlemleri neticesinde 3 farklı deney grubu belirlenmiştir. Bunlar farklı sürelerde (hemen, 5 dakika ve 24 saat) GelMA polimeri emdirildikten sonra farklı UV enerjilerinde ($3200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$, $6200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$, $6900 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) çapraz bağlanarak elde edilen gruplardır.
- ✓ Çalışmada kullanılacak olan jelatin metakrilat (GelMA) polimeri %8'lik olarak sentezlenmiştir. Yapı analizlerini gerçekleştirmek üzere FTIR analizi yapılmıştır. FTIR sonuçlarına göre hem GelMA polimerinin yapısı incelenmiş hem de deselülerize matriks ile B3 grubu olarak adlandırılan 24 saat GelMA polimeri emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ enerjide çapraz bağlanan hibrit matriks grubunun yapısı incelenmiştir. Yapı analizleri literatür bilgisiyle uyumlu bulunmuştur.
- ✓ Hibrit matrikslerin karakterizasyon sonuçlarında kalınlığının ortalama 1.47 ± 0.2 mm olduğu bulunmuştur. Deselülerize korneaların kalınlıkları 5.93 ± 0.057 mm iken doğal korneanın kalınlığı 1.52 ± 0.08 mm olarak bulunmuştur. Deselülerize korneanın kalınlığının diğer deney gruplarına oranla yaklaşık 4 kat fazla çıkmasının nedeni SDS tabanlı deselülerizasyon yöntemidir. Ayrıca bütün deney gruplarının çapı eşit olacak şekilde 11mm punch ile kesilmiştir.
- ✓ Işık geçirgenliği ve saydamlık analizi için bütün deney grupları ayrı ayrı test edilmiştir. En iyi ışık geçirgenliği sonucu 24 saat GelMA içerisinde bekletildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV değerinde çapraz bağlanan hibrit doku iskelesinde görülmüştür. B3 grubu olarak adlandırılan bu grup için ışık geçirgenlik değerleri $\%55.05 \pm 6.74$ iken doğal kornea $\%80.42 \pm 6.26$ olarak

bulunmuştur. Ayrıca hibrit doku iskeleleri genel olarak değerlendirildiğinde deselülerize edilmiş iskelelere göre daha fazla ışık geçirgenliğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni GelMA polimerinin yapısal olarak ışık geçirgenliğine önemli katkıda bulunmasıdır.

- ✓ Şeffaflık değerlendirmelerinde çapraz bağlamadan önce 5 dakika boyunca GelMA emdirilmiş hibrit kornea yapıları, üç farklı UV yoğunluğunda hemen çapraz bağlanan gruba kıyasla daha şeffaf bir görünüm göstermiştir. Bununla birlikte, en iyi şeffaf görünümün hidrojel emdirilme süresinin pozitif etkilerini gösteren GelMA'nın 24 saat emdirildiği gruplarda olduğu gözlenmiştir. 24 saatli GelMA emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ enerjide gerçekleştirilen fotopolimerizasyon işlemi, makroskopik incelemelere göre en uygun protokol olarak önerilmiştir.
- ✓ Deney grupları arasında kolajenaz A ile gerçekleştirilen enzimatik bozunma testinin sonuçlarına göre 4 saatlik sürenin sonunda hibrit yapı için $\% 44.68 \pm 5.99$, doğal kornea için $\%15.56 \pm 2.84$ son olarak da deselülerize doku için $\%19.98 \pm 2.56$ olarak hesaplanmıştır. Hibrit yapının deselülerize yapıya göre daha fazla kütle kaybetmesinin nedeni GelMA polimerinin hidrojel özelliğinde olmasından kaynaklanmaktadır. Hidrojeller büyük miktarda su tutma kapasitesine sahip malzemeler oldukları için UV altında çapraz bağlanması neticesinde yoğunluğunun artırılmasıyla beraber 3D yapısında sıkılaşma meydana gelmiştir. Bu durumun neticesinde hidrasyon oranında bir azalmaya meydana gelmiştir. Sonuç olarak da hibrit kornea stromal yapılarının hidrasyon oranları beklendiği gibi GelMA emdirildikten sonra azalmıştır.
- ✓ Hibrit doku iskelelerine ve deselülerize doku iskelesine PBS içerisinde bozunma testi yapılmıştır. 7. 14. 21. ve 28. günler ölçümler alınmıştır. 28. güne gelindiğinde doğal kornea $\%24.73 \pm 6.55$, deselülerize kornea $\%51.37 \pm 4.29$ ve hibrit kornea $\%50.9 \pm 10.34$ oranında kütle kaybına neden olmuştur.
- ✓ Su tutma kapasitesinin tayini doğal, deselülerize ve hibrit matriks grubundan Grup B3 olarak adlandırılan (24 saat GelMA polimeri emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjisinde çapraz bağlanan) grup ile karşılaştırmalı olarak yapılmıştır. Deney sonuçlarına göre doğal korneanın su tutma kapasitesi $\%85.7 \pm 0.22$ bulunurken deselülerize korneanın su

tutma kapasitesi $\%85.2 \pm 3.09$ olarak bulunmuştur. Hibrit yapının su tutma kapasitesi ise $\%74.2 \pm 1.03$ olarak tespit edilmiştir. Bu test deselülerize dokunun başarılı olduğunu kanıtlamaktadır. Ayrıca hibrit matriksin su tutma kapasitesinin deselülerize matrikse göre az olmasının nedeni yapısında bulunan GelMA polimerinden kaynaklanmaktadır.

- ✓ Çekme testi sonuçlarına göre B3 olarak adlandırılan (24 saat GelMA polimeri emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjisinde çapraz bağlanan) hibrit matriks yapısı ön plana çıkmıştır. Grup A olarak adlandırılan farklı sürelerde (hemen, 5 dakika, 24 saat) GelMA emdirildikten sonra $3200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjinde çapraz bağlanan grup $\% 20-25$ aralığında $\%$ gerilme göstermektedir. Grup B olarak adlandırılan farklı sürelerde (hemen, 5 dakika, 24 saat) GelMA emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjinde çapraz bağlanan grup $\%34-40$ aralığında $\%$ gerilme göstermektedir. Son olarak Grup C olarak adlandırılan farklı sürelerde (hemen, 5 dakika, 24 saat) GelMA emdirildikten sonra $6900 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjinde çapraz bağlanan grup, Grup B ile benzer sonuçlar göstermiştir.
- ✓ Mekanik testler genel anlamda değerlendirildiğinde GelMA polimerinin farklı süre ve enerjide kullanımı malzemeye ekstra dayanıklılık sağlamıştır. Bu durum ise deselülerizasyon protokolünün literatürde bahsedilen yıkıcı etkilerini geride bırakarak bu özelliklerin iyileştirilmesini sağlamıştır.
- ✓ Tezin son aşamasında gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarla UV ile çapraz bağlanmalarına rağmen UV'nin yıkıcı etkilerinin geride bırakılarak özellikle kültür periyodunun 7. ve 14. gününde proliferasyon oranının arttığı tespit edilmiştir. GelMA'nın jelatinden kaynaklanan biyolojik kökeni hücreler üzerinde iyileştirici bir etki yapmıştır.
- ✓ Tez kapsamında üretilen hibrit matrikslere uygulanan canlı ölü boyama testinin neticesine göre tüm doku iskelelerinde hücre yapışması ve çoğalması gözlemlenmiştir. Kültürün ilk gününde $6900 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjisi ile çapraz bağlanan grupta en az hücre sayısı gözlenmiştir. 4. günde hücreler açılmış ve yayılmaya başlamış, 7. gün tüm yüzeyi tamamen kaplamıştır. Hücrelerin canlılıklarını en iyi devam ettirdiği grup ise 24 saat GelMA emdirildikten sonra $6210 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV enerjinde çapraz bağlanarak elde edilen hibrit matriks grubu olmuştur.

- ✓ Tez çalışması kapsamında geliştirilen hibrit matriks yaklaşımının kornea doku mühendisliği alanında kullanılabilirliği önerilmiş ve ileride üstün özellikte keratoroptezlerin üretimi için potansiyel teşkil edebileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Whitcher, J.P., M. Srinivasan, and M.P. Upadhyay, *Corneal blindness: a global perspective*. Bull World Health Organ, 2001. **79**(3): p. 214-21.
 2. Price, F.W., Jr., et al., *Risk factors for corneal graft failure*. J Refract Surg, 1996. **12**(1): p. 134-43; discussion 143-7.
 3. Zhang, Z., et al., *Bioengineered multilayered human corneas from discarded human corneal tissue*. Biomedical materials (Bristol, England), 2015. **10**: p. 035012.
 4. Wu, Z., et al., *Bioprinting three-dimensional cell-laden tissue constructs with controllable degradation*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 24474.
 5. Uzunalli, G., et al., *Bioactive self-assembled peptide nanofibers for corneal stroma regeneration*. Acta Biomater, 2014. **10**(3): p. 1156-66.
 6. Bayyoud, T., et al., *Decellularized bovine corneal posterior lamellae as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells*. Curr Eye Res, 2012. **37**(3): p. 179-86.
 7. Kong, B., et al., *Tissue-engineered cornea constructed with compressed collagen and laser-perforated electrospun mat*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 970.
 8. DelMonte, D.W. and T. Kim, *Anatomy and physiology of the cornea*. J Cataract Refract Surg, 2011. **37**(3): p. 588-98.
 9. Richard, A.J., et al., *Quantification of corneal transparency in post-mortem human corneas using laser scatter image analysis*. Clin Exp Optom, 2019. **102**(5): p. 485-488.
 10. Lwigale, P.Y., *Corneal Development: Different Cells from a Common Progenitor*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2015. **134**: p. 43-59.
 11. Kjncaid, M.C., *Pathology of the Eye*. American Journal of Clinical Pathology, 1988. **90**(6): p. 742-742.
 12. Forrester, J.V., et al., *Chapter 2 - Embryology and early development of the eye and adnexa*, in *The Eye (Fourth Edition)*, J.V. Forrester, et al., Editors. 2016, W.B. Saunders. p. 103-129.e8.
 13. Zavala, J., et al., *Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration*. Eye, 2013. **27**(5): p. 579-588.
 14. Bergmanson, J.P.G., *3 - Anatomy and Physiology of the Cornea and Related Structures*, in *Contact Lenses (Sixth Edition)*, A.J. Phillips and L. Speedwell, Editors. 2019, Elsevier: London. p. 33-64.
 15. Shah, A., et al., *The Development of a Tissue-Engineered Cornea: Biomaterials and Culture Methods*. Pediatric Research, 2008. **63**(5): p. 535-544.
 16. Sridhar, M.S., *Anatomy of cornea and ocular surface*. Indian journal of ophthalmology, 2018. **66**(2): p. 190-194.
 17. Doughty, M.J. and M.L. Zaman, *Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach*. Surv Ophthalmol, 2000. **44**(5): p. 367-408.
 18. Ahearne, M., et al., *Designing Scaffolds for Corneal Regeneration*. Advanced Functional Materials, 2020. **30**(44): p. 1908996.
 19. Ludwig, P.E., M. Motlagh, and K. Sevensma, *Anatomy, Head and Neck, Eye Cornea*, in *StatPearls*. 2019, StatPearls Publishing
- StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
20. Saghizadeh, M., et al., *Concise Review: Stem Cells for Corneal Wound Healing*. Stem cells (Dayton, Ohio), 2017. **35**(10): p. 2105-2114.
 21. Maghsoudlou, P., et al., *Cornea Transplantation*, in *StatPearls*. 2019, StatPearls Publishing

StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).

22. Rio-Cristobal, A. and R. Martin, *Corneal assessment technologies: Current status*. Survey of Ophthalmology, 2014. **59**(6): p. 599-614.
23. Forrester, J.V., et al., *Chapter 1 - Anatomy of the eye and orbit*, in *The Eye (Fourth Edition)*, J.V. Forrester, et al., Editors. 2016, W.B. Saunders. p. 1-102.e2.
24. Knupp, C., et al., *The Architecture of the Cornea and Structural Basis of Its Transparency*, in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, A. McPherson, Editor. 2009, Academic Press. p. 25-49.
25. Dua, H.S., et al., *Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer)*. Ophthalmology, 2013. **120**(9): p. 1778-85.
26. Nuijts, R.M.M.A., *Ocular toxicity of intraoperatively used drugs and solutions*. 1995, Amsterdam <etc.>: Kugler.
27. Nishida, T. and R. Yanai, *Advances in treatment for neurotrophic keratopathy*. Curr Opin Ophthalmol, 2009. **20**(4): p. 276-81.
28. Müller, L.J., et al., *Corneal nerves: structure, contents and function*. Experimental Eye Research, 2003. **76**(5): p. 521-542.
29. Chhabra, M., J.M. Prausnitz, and C.J. Radke, *Modeling corneal metabolism and oxygen transport during contact lens wear*. Optom Vis Sci, 2009. **86**(5): p. 454-66.
30. Graham, A.D., et al., *Predicting extended wear complications from overnight corneal swelling*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(13): p. 3150-7.
31. Leung, B.K., J.A. Bonanno, and C.J. Radke, *Oxygen-deficient metabolism and corneal edema*. Progress in Retinal and Eye Research, 2011. **30**(6): p. 471-492.
32. Dohlman, C.H., *The function of the corneal epithelium in health and disease. The Jonas S. Friedenwald Memorial Lecture*. Invest Ophthalmol, 1971. **10**(6): p. 383-407.
33. Komai, Y. and T. Ushiki, *The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991. **32**(8): p. 2244-58.
34. Myron, Y. and D. Jay, *Ophthalmology*. 3rd ed. Corneal anatomy, physiology, and wound healing. 2009, St. Louis, Elsevier
35. Mobaraki, M., et al., *Corneal Repair and Regeneration: Current Concepts and Future Directions*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019. **7**(135).
36. Couture, C., et al., *Enhanced wound healing of tissue-engineered human corneas through altered phosphorylation of the CREB and AKT signal transduction pathways*. Acta Biomater, 2018. **73**: p. 312-325.
37. Ljubimov, A.V. and M. Saghizadeh, *Progress in corneal wound healing*. Progress in retinal and eye research, 2015. **49**: p. 17-45.
38. Matthyssen, S., et al., *Corneal regeneration: A review of stromal replacements*. Acta Biomater, 2018. **69**: p. 31-41.
39. Gain, P., et al., *Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking*. JAMA Ophthalmology, 2016. **134**(2): p. 167-173.
40. WHO. *Visual impairment and blindness*. 2018.
41. Zhang, X., et al., *Dry Eye Management: Targeting the Ocular Surface Microenvironment*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(7).
42. *The Definition and Classification of Dry Eye Disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007)*. The Ocular Surface, 2007. **5**(2): p. 75-92.
43. Sharma, S., *Keratitis*. Bioscience Reports, 2001. **21**(4): p. 419-444.
44. Marquart, M.E., *Animal models of bacterial keratitis*. Journal of biomedicine & biotechnology, 2011. **2011**: p. 680642-680642.

45. Aldave, A.J., *The genetics of the corneal dystrophies*. Dev Ophthalmol, 2011. **48**: p. 51-66.
46. Lin, Z.-N., J. Chen, and H.-P. Cui, *Characteristics of corneal dystrophies: a review from clinical, histological and genetic perspectives*. International journal of ophthalmology, 2016. **9**(6): p. 904-913.
47. Choi, J.A. and M.S. Kim, *Progression of keratoconus by longitudinal assessment with corneal topography*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53**(2): p. 927-35.
48. Mowat, F.M., *Chapter 143 - Management of Corneal Ulcers*, in *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine (Seventh Edition)*, K.A. Sprayberry and N.E. Robinson, Editors. 2015, W.B. Saunders: St. Louis. p. 605-607.
49. Hughes, K., *Chapter 12 - Ophthalmology*, in *Equine Medicine, Surgery and Reproduction (Second Edition)*, T.S. Mair, et al., Editors. 2012, W.B. Saunders: Oxford. p. 235-260.
50. Lamm, V., et al., *Corneal blindness and xenotransplantation*. Xenotransplantation, 2014. **21**(2): p. 99-114.
51. Shtein, R.M., et al., *Autologous Serum-Based Eye Drops for Treatment of Ocular Surface Disease: A Report by the American Academy of Ophthalmology*. Ophthalmology, 2020. **127**(1): p. 128-133.
52. Geerling, G., S. MacLennan, and D. Hartwig, *Autologous serum eye drops for ocular surface disorders*. The British journal of ophthalmology, 2004. **88**(11): p. 1467-1474.
53. Jin, H., et al., *Evolving risk factors and antibiotic sensitivity patterns for microbial keratitis at a large county hospital*. British Journal of Ophthalmology, 2017. **101**(11): p. 1483-1487.
54. Miller, D., *Update on the Epidemiology and Antibiotic Resistance of Ocular Infections*. Middle East African journal of ophthalmology, 2017. **24**(1): p. 30-42.
55. Reitberger, H.H., et al., *Argon Cold Plasma—A Novel Tool to Treat Therapy-resistant Corneal Infections*. American Journal of Ophthalmology, 2018. **190**: p. 150-163.
56. Chaurasia, S.S., et al., *Nanomedicine approaches for corneal diseases*. Journal of functional biomaterials, 2015. **6**(2): p. 277-298.
57. Mashhour, B., et al., *In vivo adenovirus-mediated gene transfer into ocular tissues*. Gene Ther, 1994. **1**(2): p. 122-6.
58. Klausner, E.A., et al., *Corneal gene therapy*. J Control Release, 2007. **124**(3): p. 107-33.
59. Mohan, R.R., et al., *Gene therapy in the cornea: 2005--present*. Progress in retinal and eye research, 2012. **31**(1): p. 43-64.
60. Mohan, R.R., J.T. Rodier, and A. Sharma, *Corneal gene therapy: basic science and translational perspective*. The ocular surface, 2013. **11**(3): p. 150-164.
61. Tan, D.T., et al., *Corneal transplantation*. Lancet, 2012. **379**(9827): p. 1749-61.
62. Singh, R., et al., *Corneal transplantation in the modern era*. The Indian journal of medical research, 2019. **150**(1): p. 7-22.
63. Boynton, G.E. and M.A. Woodward, *Evolving Techniques in Corneal Transplantation*. Current surgery reports, 2015. **3**(2): p. <http://link.springer.com/article/10.1007/s40137-014-0079-5/fulltext.html>.
64. Asbell, P. and D. Brocks, *Cornea Overview*, in *Encyclopedia of the Eye*, D.A. Dartt, Editor. 2010, Academic Press: Oxford. p. 522-531.
65. Singh, N.P., D.G. Said, and H.S. Dua, *Lamellar keratoplasty techniques*. Indian journal of ophthalmology, 2018. **66**(9): p. 1239-1250.

66. Yeung, S.N., et al., *Retrospective contralateral study comparing deep anterior lamellar keratoplasty with penetrating keratoplasty: a patient's perspective*. *Can J Ophthalmol*, 2012. **47**(4): p. 360-4.
67. Espandar, L. and A.N. Carlson, *Lamellar Keratoplasty: A Literature Review*. *Journal of Ophthalmology*, 2013. **2013**: p. 894319.
68. Oliva, M.S., T. Schottman, and M. Gulati, *Turning the tide of corneal blindness*. *Indian J Ophthalmol*, 2012. **60**(5): p. 423-7.
69. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. *Science*, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
70. <aylin kornea tez.pdf>.
71. Rodrigues, I.C.P., et al., *Cardiac tissue engineering: current state-of-the-art materials, cells and tissue formation*. Einstein (Sao Paulo, Brazil), 2018. **16**(3): p. eRB4538-eRB4538.
72. Noori, A., et al., *A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering*. *International journal of nanomedicine*, 2017. **12**: p. 4937-4961.
73. Liu, Y., G. Zhou, and Y. Cao, *Recent Progress in Cartilage Tissue Engineering—Our Experience and Future Directions*. *Engineering*, 2017. **3**(1): p. 28-35.
74. Schutte, S.C. and R.M. Nerem, *Chapter II.6.9 - Blood Vessel Tissue Engineering*, in *Biomaterials Science (Third Edition)*, B.D. Ratner, et al., Editors. 2013, Academic Press. p. 1237-1246.
75. Zhu, A.S. and K.J. Grande-Allen, *Heart valve tissue engineering for valve replacement and disease modeling*. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2018. **5**: p. 35-41.
76. Law, J.X., et al., *Tissue-engineered trachea: A review*. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2016. **91**: p. 55-63.
77. Hashimoto, Y., et al., *Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering*. *Biomaterials*, 2010. **31**: p. 3941-8.
78. Hu, X., et al., *Tissue engineering of nearly transparent corneal stroma*. *Tissue Eng*, 2005. **11**(11-12): p. 1710-7.
79. Rezwani, K., et al., *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*. *Biomaterials*, 2006. **27**(18): p. 3413-3431.
80. Dong, M., et al., *Rapid porcine corneal decellularization through the use of sodium N-lauroyl glutamate and supernuclease*. *Journal of tissue engineering*, 2019. **10**: p. 2041731419875876-2041731419875876.
81. Badylak, S.F., D. Taylor, and K. Uygun, *Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2011. **13**: p. 27-53.
82. Parmaksiz, M., et al., *Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine*. *Biomed Mater*, 2016. **11**(2): p. 022003.
83. Wood, E.J., *Fundamentals of biochemistry: Life at the molecular level (Third Edition)* by D. Voet, J. Voet, and C. W. Pratt. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2008. **36**(4): p. 319-320.
84. Giraldo-Gomez, D.M., et al., *Trypsin as enhancement in cyclical tracheal decellularization: Morphological and biophysical characterization*. *Materials Science and Engineering: C*, 2016. **59**: p. 930-937.

85. Woods, T. and P.F. Gratzner, *Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft*. *Biomaterials*, 2005. **26**(35): p. 7339-49.
86. Kim, H., et al., *Characterization of cornea-specific bioink: high transparency, improved in vivo safety*. *Journal of tissue engineering*, 2019. **10**: p. 2041731418823382-2041731418823382.
87. Ponce Márquez, S., et al., *Decellularization of bovine corneas for tissue engineering applications*. *Acta Biomaterialia*, 2009. **5**(6): p. 1839-1847.
88. Pascolini, D. and S.P. Mariotti, *Global estimates of visual impairment: 2010*. *Br J Ophthalmol*, 2012. **96**(5): p. 614-8.
89. Stevens, G.A., et al., *Global prevalence of vision impairment and blindness: magnitude and temporal trends, 1990-2010*. *Ophthalmology*, 2013. **120**(12): p. 2377-2384.
90. Hara, H. and D.K. Cooper, *Xenotransplantation--the future of corneal transplantation?* *Cornea*, 2011. **30**(4): p. 371-8.
91. Zeyland, J., D. Lipiński, and R. Słomski, *The current state of xenotransplantation*. *Journal of applied genetics*, 2015. **56**(2): p. 211-218.
92. Ghezzi, C.E., J. Rnjak-Kovacina, and D.L. Kaplan, *Corneal tissue engineering: recent advances and future perspectives*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2015. **21**(3): p. 278-87.
93. Zhou, H., et al., *Genipin-crosslinked polyvinyl alcohol/silk fibroin/nano-hydroxyapatite hydrogel for fabrication of artificial cornea scaffolds-a novel approach to corneal tissue engineering*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2019. **30**(17): p. 1604-1619.
94. Huang, Y.-H., et al., *Preparation of acellular scaffold for corneal tissue engineering by supercritical carbon dioxide extraction technology*. *Acta Biomaterialia*, 2017. **58**: p. 238-243.
95. Huang, Y.X. and Q.H. Li, *An active artificial cornea with the function of inducing new corneal tissue generation in vivo-a new approach to corneal tissue engineering*. *Biomed Mater*, 2007. **2**(3): p. S121-5.
96. Shafiq, M.A., et al., *Decellularized human cornea for reconstructing the corneal epithelium and anterior stroma*. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 2012. **18**(5): p. 340-348.
97. Grant, M.B., et al., *Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta on corneal cell chemotaxis*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992. **33**(12): p. 3292-301.
98. Kim, M.J., et al., *Optimal concentration of human epidermal growth factor (hEGF) for epithelial healing in experimental corneal alkali wounds*. *Curr Eye Res*, 2001. **22**(4): p. 272-9.
99. Maldonado, B.A. and L.T. Furcht, *Epidermal growth factor stimulates integrin-mediated cell migration of cultured human corneal epithelial cells on fibronectin and arginine-glycine-aspartic acid peptide*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995. **36**(10): p. 2120-6.
100. Nelson, J.D., et al., *Corneal epithelial wound healing: a tissue culture assay on the effect of antibiotics*. *Curr Eye Res*, 1990. **9**(3): p. 277-85.
101. Lu, J., et al., *Effect of Hypoxic Stress-Activated Polo-like Kinase 3 on Corneal Epithelial Wound Healing*. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2010. **51**: p. 5034-40.

102. Rieck, P.W., S. Cholidis, and C. Hartmann, *Intracellular signaling pathway of FGF-2-modulated corneal endothelial cell migration during wound healing in vitro*. *Exp Eye Res*, 2001. **73**(5): p. 639-50.
103. Couture, C., et al., *The tissue-engineered human cornea as a model to study expression of matrix metalloproteinases during corneal wound healing*. *Biomaterials*, 2016. **78**: p. 86-101.
104. Bentley, E., et al., *Morphology and immunohistochemistry of spontaneous chronic corneal epithelial defects (SCCED) in dogs*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001. **42**(10): p. 2262-9.
105. Bühren, J., et al., *Optical effects of anti-TGFbeta treatment after photorefractive keratectomy in a cat model*. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2009. **50**(2): p. 634-643.
106. Sharif, R., et al., *Corneal Tissue Engineering: An In Vitro Model of the Stromal-nerve Interactions of the Human Cornea*. *J Vis Exp*, 2018(131).
107. Rama, P., et al., *Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency*. *Transplantation*, 2001. **72**(9): p. 1478-85.
108. Ide, T., et al., *Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes*. *Biomaterials*, 2006. **27**(4): p. 607-14.
109. Germain, L., et al., *Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering*. *Pathobiology*, 1999. **67**(3): p. 140-7.
110. Vrana, N.E., et al., *Development of a reconstructed cornea from collagen-chondroitin sulfate foams and human cell cultures*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008. **49**(12): p. 5325-31.
111. Jester, J.V., et al., *The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'*. *J Cell Sci*, 1999. **112** (Pt 5): p. 613-22.
112. Pinnamaneni, N. and J.L. Funderburgh, *Concise review: Stem cells in the corneal stroma*. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 2012. **30**(6): p. 1059-1063.
113. Orozco Morales, M.L., et al., *Anti-inflammatory potential of human corneal stroma-derived stem cells determined by a novel in vitro corneal epithelial injury model*. *World journal of stem cells*, 2019. **11**(2): p. 84-99.
114. Gonzalez-Andrades, M., et al., *Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011. **52**(1): p. 215-22.
115. El Zarif, M., et al., *Corneal Stroma Cell Density Evolution in Keratoconus Corneas Following the Implantation of Adipose Mesenchymal Stem Cells and Corneal Laminae: An In Vivo Confocal Microscopy Study*. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2020. **61**(4): p. 22-22.
116. Alió del Barrio, J., et al., *Cellular Therapy With Human Autologous Adipose-Derived Adult Stem Cells for Advanced Keratoconus*. *Cornea*, 2017. **36**.
117. Chan, A.A., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells into cells with corneal keratocyte phenotype*. *PloS one*, 2013. **8**(2): p. e56831-e56831.
118. Hanson, C., et al., *Transplantation of human embryonic stem cells onto a partially wounded human cornea in vitro*. *Acta ophthalmologica*, 2013. **91**(2): p. 127-130.
119. Çerman, E., et al., *Retinal Electrophysiological Effects of Intravitreal Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells in Streptozotocin Induced Diabetic Rats*. *PloS one*, 2016. **11**(6): p. e0156495-e0156495.

120. Nishida, K., et al., *Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium*. N Engl J Med, 2004. **351**(12): p. 1187-96.
121. Yoshida, S., et al., *Insight into the Role of Dental Pulp Stem Cells in Regenerative Therapy*. Biology, 2020. **9**(7): p. 160.
122. Meyer-Blazejewska, E.A., et al., *From hair to cornea: toward the therapeutic use of hair follicle-derived stem cells in the treatment of limbal stem cell deficiency*. Stem cells (Dayton, Ohio), 2011. **29**(1): p. 57-66.
123. Davies, J.E., J.T. Walker, and A. Keating, *Concise Review: Wharton's Jelly: The Rich, but Enigmatic, Source of Mesenchymal Stromal Cells*. Stem cells translational medicine, 2017. **6**(7): p. 1620-1630.
124. Saleh, R. and H.M. Reza, *Short review on human umbilical cord lining epithelial cells and their potential clinical applications*. Stem cell research & therapy, 2017. **8**(1): p. 222-222.
125. Gois Beghini, D., et al., *Induced Pluripotent Stem Cells: Hope in the Treatment of Diseases, including Muscular Dystrophies*. International journal of molecular sciences, 2020. **21**(15): p. 5467.
126. Mikhailova, A., et al., *Small-Molecule Induction Promotes Corneal Epithelial Cell Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells*. Stem Cell Reports, 2014. **2**(2): p. 219-231.
127. Grinstaff, M.W., *Designing hydrogel adhesives for corneal wound repair*. Biomaterials, 2007. **28**(35): p. 5205-14.
128. Palchesko, R.N., S.D. Carrasquilla, and A.W. Feinberg, *Natural Biomaterials for Corneal Tissue Engineering, Repair, and Regeneration*. Adv Healthc Mater, 2018. **7**(16): p. e1701434.
129. Mozafari, M., *Nanoengineered Biomaterials for Regenerative Medicine Preface*. Nanoengineered Biomaterials for Regenerative Medicine, 2019: p. Xxv-Xxv.
130. Fernandez-Perez, J. and M. Ahearne, *Decellularization and recellularization of cornea: Progress towards a donor alternative*. Methods, 2019.
131. Zhang, B., et al., *3D bioprinting for artificial cornea: Challenges and perspectives*. Med Eng Phys, 2019. **71**: p. 68-78.
132. Mimura, T., et al., *Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(9): p. 2992-7.
133. Watanabe, R., et al., *A novel gelatin hydrogel carrier sheet for corneal endothelial transplantation*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(17-18): p. 2213-9.
134. Kennedy, S., et al., *Poly-ε-lysine based hydrogels as synthetic substrates for the expansion of corneal endothelial cells for transplantation*. J Mater Sci Mater Med, 2019. **30**(9): p. 102.
135. Ishino, Y., et al., *Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(3): p. 800-6.
136. Chirila, T.V., *An overview of the development of artificial corneas with porous skirts and the use of PHEMA for such an application*. Biomaterials, 2001. **22**(24): p. 3311-7.
137. Mimura, T., *[Cultured human corneal endothelial cell transplantation]*. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 2006. **110**(11): p. 879-97.
138. Li, W., et al., *Fabrication and characterization of chitosan-collagen crosslinked membranes for corneal tissue engineering*. Journal of biomaterials science. Polymer edition, 2014. **25**(17): p. 1962-1972.

139. Du, L. and X. Wu, *Development and characterization of a full-thickness acellular porcine cornea matrix for tissue engineering*. *Artif Organs*, 2011. **35**(7): p. 691-705.
140. Xu, Y.-G., et al., *Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate*. *Molecular vision*, 2008. **14**: p. 2180-2189.
141. Sasaki, S., et al., *In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas*. *Mol Vis*, 2009. **15**: p. 2022-8.
142. Yoeruek, E., et al., *Reconstruction of corneal stroma with decellularized porcine xenografts in a rabbit model*. *Acta Ophthalmol*, 2012. **90**(3): p. e206-10.
143. Amano, S., et al., *Decellularizing corneal stroma using N₂ gas*. *Molecular vision*, 2008. **14**: p. 878-882.
144. Luo, H., et al., *Construction of tissue-engineered cornea composed of amniotic epithelial cells and acellular porcine cornea for treating corneal alkali burn*. *Biomaterials*, 2013. **34**(28): p. 6748-59.
145. Hashimoto, Y., et al., *Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering*. *Biomaterials*, 2010. **31**(14): p. 3941-8.
146. Lin, X.C., et al., *Lamellar keratoplasty with a graft of lyophilized acellular porcine corneal stroma in the rabbit*. *Vet Ophthalmol*, 2008. **11**(2): p. 61-6.
147. Wilson, S.L., et al., *Corneal Decellularization: A Method of Recycling Unsuitable Donor Tissue for Clinical Translation?* *Current eye research*, 2016. **41**(6): p. 769-782.
148. Yam, G.H., et al., *Decellularization of human stromal refractive lenticles for corneal tissue engineering*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 26339.
149. Alió Del Barrio, J.L., et al., *Corneal Stroma Enhancement With Decellularized Stromal Laminae With or Without Stem Cell Recellularization for Advanced Keratoconus*. *Am J Ophthalmol*, 2018. **186**: p. 47-58.
150. Guler, S., et al., *Supercritical Carbon Dioxide-Assisted Decellularization of Aorta and Cornea*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2017. **23**(9): p. 540-547.
151. Yam, G.H.-F., et al., *Decellularization of human stromal refractive lenticles for corneal tissue engineering*. *Scientific Reports*, 2016. **6**(1): p. 26339.
152. Gaspar-Pintilieșcu, A., A.-M. Stanciu, and O. Craciunescu, *Natural composite dressings based on collagen, gelatin and plant bioactive compounds for wound healing: A review*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019.
153. Sell, S., et al., *The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues*. *Polymers*, 2010. **2**: p. 522-553.
154. Sisson, K., et al., *Evaluation of cross-linking methods for electrospun gelatin on cell growth and viability*. *Biomacromolecules*, 2009. **10**(7): p. 1675-80.
155. Thiele, J., et al., *25th anniversary article: Designer hydrogels for cell cultures: a materials selection guide*. *Adv Mater*, 2014. **26**(1): p. 125-47.
156. Van Den Bulcke, A.I., et al., *Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels*. *Biomacromolecules*, 2000. **1**(1): p. 31-8.
157. Nichol, J.W., et al., *Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels*. *Biomaterials*, 2010. **31**(21): p. 5536-44.
158. Mamaghani, K.R., et al., *GelMa/PEGDA containing graphene oxide as an IPN hydrogel with superior mechanical performance*. *Materials Today: Proceedings*, 2018. **5**(7, Part 3): p. 15790-15799.

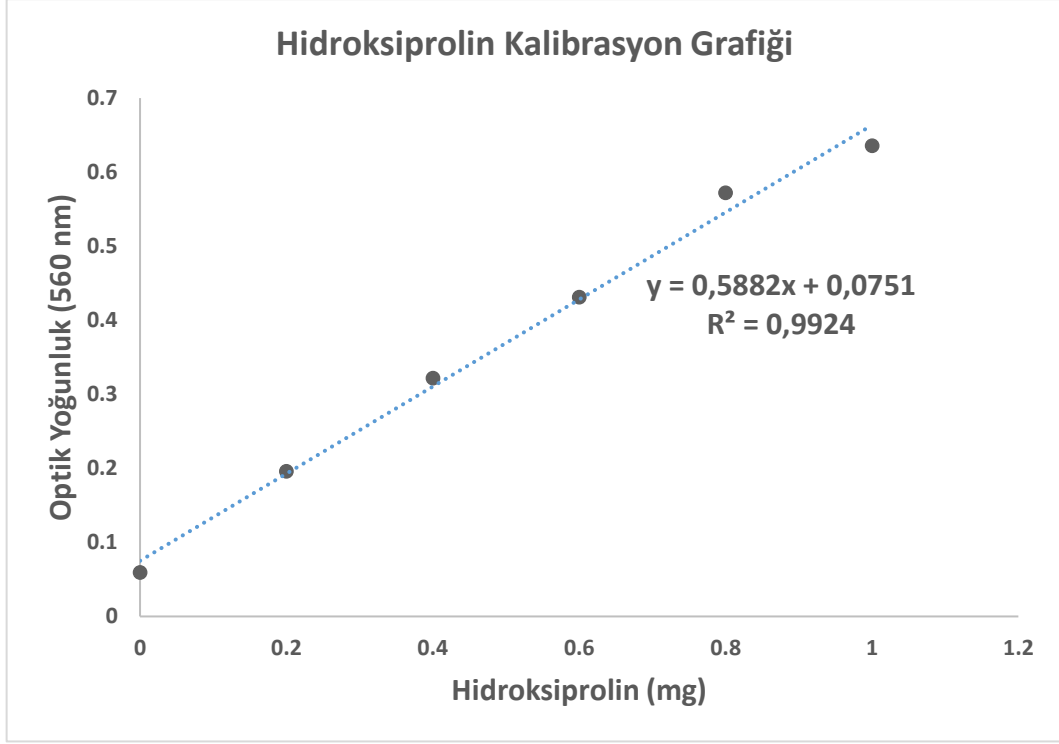
159. Yue, K., et al., *Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels*. *Biomaterials*, 2015. **73**: p. 254-271.
160. Rahali, K., et al., *Synthesis and Characterization of Nanofunctionalized Gelatin Methacrylate Hydrogels*. *International journal of molecular sciences*, 2017. **18**(12): p. 2675.
161. Klotz, B.J., et al., *Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair*. *Trends in biotechnology*, 2016. **34**(5): p. 394-407.
162. Noshadi, I., et al., *In vitro and in vivo analysis of visible light crosslinkable gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels*. *Biomater Sci*, 2017. **5**(10): p. 2093-2105.
163. Aldana, A.A., et al., *Fabrication of Gelatin Methacrylate (GelMA) Scaffolds with Nano- and Micro-Topographical and Morphological Features*. *Nanomaterials*, 2019. **9**(1): p. 120.
164. Hoch, E., et al., *Stiff gelatin hydrogels can be photo-chemically synthesized from low viscous gelatin solutions using molecularly functionalized gelatin with a high degree of methacrylation*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2012. **23**(11): p. 2607-2617.
165. Zhao, D., et al., *GelMA combined with sustained release of HUVECs derived exosomes for promoting cutaneous wound healing and facilitating skin regeneration*. *Journal of Molecular Histology*, 2020. **51**.
166. Xiao, L., et al., *Sustained Release of Melatonin from GelMA Liposomes Reduced Osteoblast Apoptosis and Improved Implant Osseointegration in Osteoporosis*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. **2020**: p. 1-20.
167. Kapuscinski, J., *DAPI: a DNA-specific fluorescent probe*. *Biotech Histochem*, 1995. **70**(5): p. 220-33.
168. Chazotte, B., *Labeling nuclear DNA using DAPI*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2011. **2011**(1): p. pdb.prot5556.
169. Feldman, A.T. and D. Wolfe, *Tissue processing and hematoxylin and eosin staining*. *Methods Mol Biol*, 2014. **1180**: p. 31-43.
170. Yue, K., et al., *Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels*. *Biomaterials*, 2015. **73**: p. 254-71.
171. Flory, P.J., *Statistical Mechanics of Swelling of Network Structures*. *The Journal of Chemical Physics*, 1950. **18**(1): p. 108-111.
172. Keane, T.J., I.T. Swinehart, and S.F. Badylak, *Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance*. *Methods*, 2015. **84**: p. 25-34.
173. Garreta, E., et al., *Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting*. *Materials Today*, 2017. **20**(4): p. 166-178.
174. Costa, A., et al., *Biologic Scaffolds*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017. **7**(9).
175. Ghosh, S., et al., *Preservation of biomacromolecular composition and ultrastructure of decellularized cornea using perfusion bioreactor*. *RSC Adv.*, 2015. **6**.
176. Aslan, B., et al., *Evaluation of collagen foam, poly(l -lactic acid) nanofiber mesh, and decellularized matrices for corneal regeneration: EVALUATION OF COLLAGEN FOAM, PLLA, AND DECELLULARIZED MATRICES*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2017. **106**.
177. Musselmann, K., et al., *Stimulation of Collagen Synthesis by Insulin and Proteoglycan Accumulation by Ascorbate in Bovine Keratocytes In Vitro*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006. **47**(12): p. 5260-5266.
178. Pacella, E., et al., *Glycosaminoglycans in the Human Cornea: Age-Related Changes*. *Ophthalmology and Eye Diseases*, 2014. **7**.

179. Nara, S., et al., *Preservation of biomacromolecular composition and ultrastructure of a decellularized cornea using a perfusion bioreactor*. RSC Advances, 2016. **6**(3): p. 2225-2240.
180. Siddiqi, N.J., A.A. Al-jafari, and A.S. Alhomida, *Investigation of total, free, peptide-bound, protein-bound, soluble and insoluble collagen hydroxyproline content in tissues from the arabian camel (Camelus dromedarius)*. Cell Biochemistry and Function, 2000. **18**(4): p. 243-248.
181. Edwards, C.A. and W.D. O'Brien, Jr., *Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate*. Clin Chim Acta, 1980. **104**(2): p. 161-7.
182. Yin, Z., et al., *The effect of decellularized matrices on human tendon stem/progenitor cell differentiation and tendon repair*. Acta Biomater, 2013. **9**(12): p. 9317-29.
183. Ghosh, S., *Impact of osmoregulatory agents on recovery of native macromolecular properties of decellularized cornea*. Biomedical Materials, 2016. **11**: p. 0650 05.
184. Meek, K.M., *Corneal collagen-its role in maintaining corneal shape and transparency*. Biophys Rev, 2009. **1**(2): p. 83-93.
185. Lanza, R., R. Langer, and J.P. Vacanti, *Principles of Tissue Engineering*. 2000: Elsevier Science.
186. Oudshoorn, M.H.M., et al., *Synthesis of methacrylated hyaluronic acid with tailored degree of substitution*. Polymer, 2007. **48**(7): p. 1915-1920.
187. Kilic Bektas, C. and V. Hasirci, *Mimicking corneal stroma using keratocyte-loaded photopolymerizable methacrylated gelatin hydrogels*. J Tissue Eng Regen Med, 2018. **12**(4): p. e1899-e1910.
188. Garcia-Porta, N., et al., *Corneal biomechanical properties in different ocular conditions and new measurement techniques*. ISRN Ophthalmol, 2014. **2014**: p. 724546.
189. Du, L., et al., *Histological evaluation and biomechanical characterisation of an acellular porcine cornea scaffold*. Br J Ophthalmol, 2011. **95**(3): p. 410-4.
190. Sasaki, S., et al., *In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas*. Molecular vision, 2009. **15**: p. 2022-2028.
191. Aldana, A.A., et al., *Fabrication of Gelatin Methacrylate (GelMA) Scaffolds with Nano- and Micro-Topographical and Morphological Features*. Nanomaterials (Basel), 2019. **9**(1).
192. Sadeghi, M. and B. Heidari, *Crosslinked Graft Copolymer of Methacrylic Acid and Gelatin as a Novel Hydrogel with pH-Responsiveness Properties*. Materials (Basel), 2011. **4**(3): p. 543-552.
193. Uyaniklar, M., et al., *Hybrid Cornea: Cell Laden Hydrogel Incorporated Decellularized Matrix*. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2020. **6**(1): p. 122-133.
194. Ojeda, J.L., J.A. Ventosa, and S. Piedra, *The three-dimensional microanatomy of the rabbit and human cornea. A chemical and mechanical microdissection-SEM approach*. Journal of anatomy, 2001. **199**(Pt 5): p. 567-576.
195. Poole, C.A., N.H. Brookes, and G.M. Clover, *Confocal imaging of the human keratocyte network using the vital dye 5-chloromethylfluorescein diacetate*. Clinical & Experimental Ophthalmology, 2003. **31**(2): p. 147-154.

EKLER

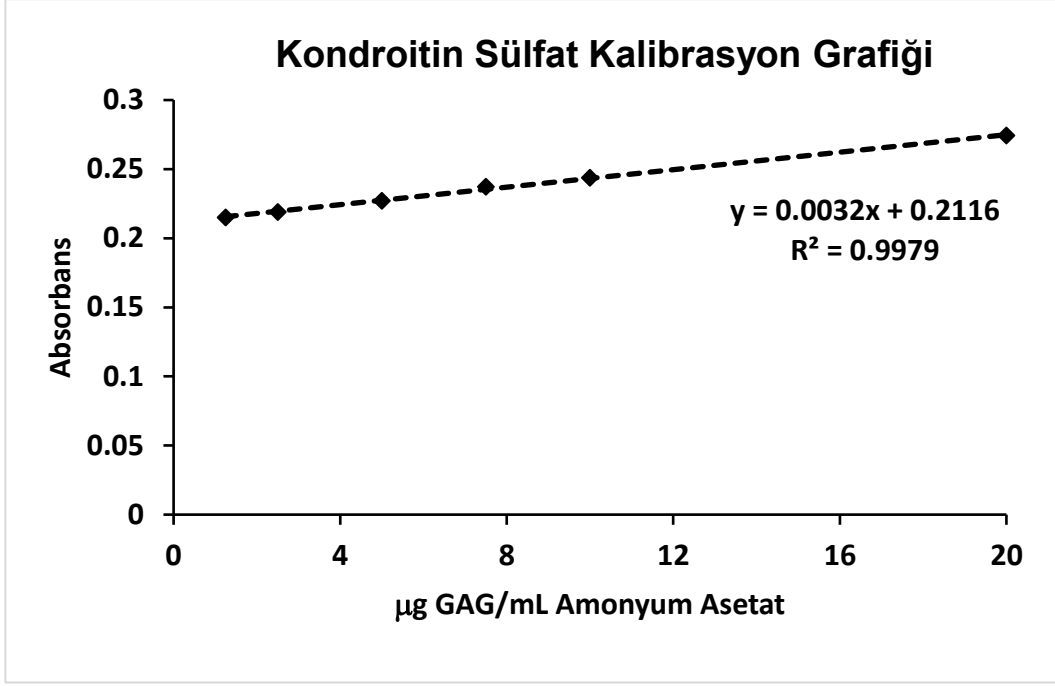
EK 1

Kolajen Miktarı Tayini için Kullanılan Kalibrasyon Grafiği



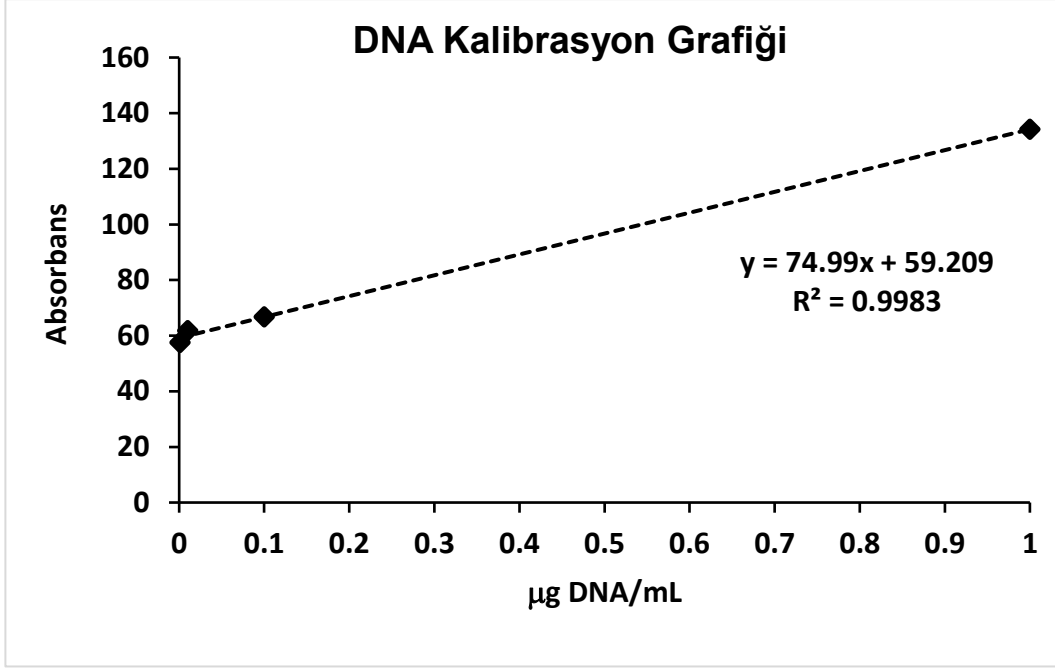
EK 2

sGAG Miktarı Tayini için Kullanılan Kalibrasyon Grafiği



EK 3

DNA Kalibrasyon Grafiği



EK 4

Tezden Türetimifş Yayın

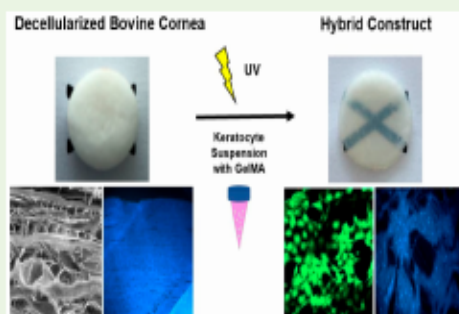
Hybrid Cornea: Cell Laden Hydrogel Incorporated Decellularized Matrix

Merve Uyanıklar,^{†,||} Gülçin Günel,^{†,||} Atakan Tevlek,[†] Pezhman Hosseinian,[‡] and Halil Murat Aydın^{*,†,§}

[†]Bioengineering Division, Institute of Science, [‡]Nanotechnology and Nanomedicine Division, Institute of Science, and [§]Centre for Bioengineering, Hacettepe University, Beytepe 06800, Ankara, Turkey

ABSTRACT: The decellularization protocols applied on the corneal stromal constructs in the literature usually fail to provide a corneal matrix with sufficient mechanical and optical properties since they alter the extracellular matrix (ECM) microstructure. In this study, to overcome these limitations, a hybrid cornea stromal construct was engineered by combining gelatin methacrylate (GelMA) and decellularized ECM. Photo-cross-linking of impregnated cell laden GelMA *in situ* using different UV cross-linking energies (3200, 6210, and 6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) and impregnation times (up to 24 h) within a decellularized bovine cornea enhanced light transmission and restored lost mechanical features following the harsh decellularization protocol. The light transmittance value for optimized hybrid constructs (53.6%) was increased nearly 10 fold compared to that of decellularized cornea (5.84%). The compressive modulus was also restored up to 6 fold with calculated values of 5040 and 870 kPa for the hybrid and decellularized samples, respectively. These values were found to be quite close to that of native cornea (48.5%, 9790 kPa). ATR-FTIR analyses were carried out to confirm the final chemical structure. The degradation profiles showed similar decomposition behaviors to that of native cornea. *In vitro* culture studies showed a high level of cell viability and cell proliferation rate was found remarkable up to the 14th day of the culture period regardless of selected UV energy level. The methodology used in the preparation of the hybrid cornea stromal constructs in this study is a promising approach toward the development of successful corneal transplants.

KEYWORDS: cornea, decellularization, gelatin methacrylate (GelMA), photopolymerization, transparency



1. INTRODUCTION

Corneal disorders are considered to be a worldwide problem due to which 10 million people suffer from vision loss.¹ Attempts toward solving this problem include strategies such as donor replacement or implantation of prosthetic devices.² Transplanting cornea tissues can be applied surgically, e.g., in keratoplasty; however, the reported success rate is around 50% for such operations which result in corneal blindness of the recipient.³ Even though allogeneic materials can be used in keratoplasty operations, the main problem in allograft transplantation for corneal tissue regeneration is that there are a limited number of donors. Moreover, more than 10% of the transplant population rejects the replacement cornea within the first year of implantation.⁴ Thus, researchers have been attempting to produce corneal conjugates to replace pathological corneal tissues to overcome the chronic problems of corneal transplantations.^{5,6}

The principles of corneal tissue engineering aim to produce corneal tissue conjugates for the restoration of partial layers or whole corneal structures containing epithelium, stroma, and endothelial layers. Major progress has been made in obtaining functional corneal structures via either allogeneic or synthetic materials. For this purpose, cell-based approaches, decellular-

ized matrices, and synthetic and natural polymeric structures have all been investigated.⁷ The major disadvantages of the biomaterials used in the development of corneal conjugates are the inability to mechanically mimic the entire corneal structure, insufficient transparency in terms of light transmission, and the failure to ensure corneal integrity. The use of decellularized matrices with the attempt of mimicking 3D and layered structures of the native cornea with a tissue engineering approach to provide corneal integrity has therefore been suggested.⁸ An effective decellularization protocol is based on the removal of the xenogeneic/allogeneic cellular antigen sources that might cause immune reaction and inflammation, while preserving the structural integrity, biological activity, and constituent components of the obtained extracellular matrix.⁹ For an effective removal of cells and cellular materials, physical, chemical, and biological routes or their combinations can be

Special Issue: Biomaterials Science and Engineering in the Middle East

Received: August 20, 2019

Accepted: November 27, 2019

Published: November 27, 2019

applied according to the specific needs of the tissue of interest. The chemical agent sodium dodecyl sulfate (SDS), a widely used ionic detergent, has been reported to effectively remove cells and preserve extracellular matrix integrity in corneal tissue.^{10,11} An ideal decellularized corneal stromal construct should retain the structural integrity of the extracellular matrix in order to mimic it functionally and structurally. It is also desired to have the final structure to be free of cellular residues in order to support adequate cell proliferation and avoid immunogenic effects.¹⁰ However, the applied decellularization protocols for corneal regeneration do not usually provide engineered corneal scaffold with sufficient mechanical and optical properties due to harmful effects of decellularization agents. Chemically decellularized corneas by SDS and Triton X-100 treatment have been shown to have poor transparency due to disruption of corneal structure by decreased glycosaminoglycan (GAG) content.^{11–14} High SDS levels can also lead to disruption of organized stromal collagen associated with reduced mechanical strength values.¹⁵

Biopolymers such as collagen, chitosan, and gelatin have been reported to overcome the light transparency problem, however, cannot provide good mechanical strength and layered organization. Some of them failed to support cell growth due to residual toxic chemicals used in the cross-linking stages.^{16–19} Although some synthetic matrices closely mimicked the physical and chemical infrastructure of the stroma, only a few managed to make a progress toward Phase I clinical trials.²⁰ It has been shown that the cross-linked polymer gelatin methacrylate (GelMA) used for corneal tissue engineering is a highly advantageous choice due to its ease of cross-linking, light transmittance up to 90%, and good cellular response.¹⁹ GelMA hydrogels have been widely applied in recent years.^{19,21–23} In addition to these applications, the use of gel based bioadhesive hydrogel²⁴ and the use of gelatin methacrylate hydrogels have been reported in various tissue engineering applications including 3D production of vascularized tissue structures,^{25,26} cartilage tissue engineering studies to enhance mechanical strength with polycaprolactone²⁷ and bone tissue engineering in with gold nanoparticles.²⁸

GelMA contains natural cell binding motifs since it is composed of modified natural extracellular matrix components.²⁹ Depending on the isoelectric point, gelatin binds to different types of growth factors and promotes the proliferation of various cell types.^{30,31} Cross-linking of GelMA renders this polymer resistance to degradation by proteolytic enzymes and provides enhanced structural properties and stability at physiological temperatures.³² However, even at elevated concentrations, this material falls short in terms of mechanical properties and does not meet the modulus values of the native cornea.

In order to provide an enhanced corneal matrix that can overcome the aforementioned limitations, we suggested a hybrid strategy that joins the forces of natural and synthetic realms, both lack in some desired properties. With this aim, a cell laden hydrogel was combined with a decellularized matrix via *in situ* UV cross-linking to provide a suitable corneal stromal construct with good optical and mechanical properties. The final construct reported in this study has a microstructural organization similar to native cornea and optical properties matching the desired values owing to the employed extracellular matrix (ECM) and hydrogel, respectively. The hydrogel was not only utilized to provide transparency, but also to adjust the modulus and strength values in addition to its

cell-delivery duty. The proposed hybrid material can be produced and tailored easily by altering the cross-linking times, energies, and other process parameters.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials. Sodium dodecyl sulfate SDS was purchased from Serva, Germany. Phosphate buffer saline (PBS), ammonium acetate, chondroitin sulfate, ammonium acetate, glutaraldehyde, hexamethyl-dilazane (HMDS), gelatin, methacrylic anhydride (MA), Irgacure-I2959, haematoxylin & eosin (HE), and collagenase A were purchased from Sigma-Aldrich, USA. Ethanol, paraffin, and xylene were purchased from Merck, USA. Antibiotic, L-glutamine, and fetal bovine serum were purchased from Capricorn, Germany. 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) was purchased from Biotium, USA. Proteinase K was purchased from Nzytech, Portugal. Hydrochloric acid (37%) HCl was purchased from Honeywell, USA. Antibiotic-antimycotic was purchased from Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA. Trypsin EDTA was purchased from Biological Industries, USA.

2.2. Preparation and Characterization of the Decellularized Bovine Corneas. Bovine corneal samples were obtained from a local slaughter house. A modified SDS based decellularization method was applied.¹¹ Briefly, carefully dissected corneas were immersed in 1% (w/v) SDS under orbital shaking for 12 h at room temperature. To remove residual SDS, all samples were washed with PBS for 12 h. Finally, samples were immersed in 75% (v/v) ethanol solution in orbital shaking for 12 h and then were washed with PBS for 1 h.

To assess the efficiency of the decellularization process, histological staining was performed. Specimens of decellularized and native cornea were fixed in 10% formalin at room temperature for 24 h. After the fixation process, specimens were dehydrated by ethanol series, immersed in xylene for 1 h, and embedded in paraffin. Paraffin sections were cut at 5 μ m, deparaffinized with xylene, and stained with DAPI. Sections stained by HE were examined using light microscope (Leica, Germany) while inverted fluorescence microscope (Leica, Germany) was used for DAPI stained sections.

To determine the residual DNA and GAG content of native and decellularized corneas, samples from both groups ($n = 3$) were lyophilized at 0.10 mbar (Labconco, USA) for 16 h. Ten mg of samples were digested with 1 mg/mL proteinase K in ammonium acetate solution for 16 h at 60 °C. DNA quantification was performed with Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, USA) according to instructions. Absorbance values were determined by a fluorescence spectrophotometer (Agilent Cary Eclipse, USA) at an excitation wavelength of 480 nm and emission wavelength of 520 nm. To assess the GAG content, enzymatically digested samples were mixed with dimethylmethylene blue assay (DMMB) reagent solution (sodium chloride 40 mmol/L, glycine 40 mmol/L, DMMB 46 mmol/L, hydrochloride 0.1 M) and absorbance values were obtained by using the Microplate Spectrophotometer (Epoch-BioTek, USA) at 525 nm. For the standard curve of GAG content, chondroitin sulfate was dissolved in ammonium acetate. For the quantification of collagen content, hydroxyproline assay (Biovision, USA) was performed. A 10 mg portion of lyophilized samples of native and decellularized corneas were hydrolyzed with 6 N HCl for 3 h. The amount of 4-hydroxyproline chains bond to collagen molecules (μ g hydroxyproline) was determined according to the manufacturer's instructions. The absorbance was read at 550 nm, and the amount of hydroxyproline present in the test samples was determined by using the standard curve. All absorbance values were normalized according to 10 mg dry weight of sample.

For morphological investigations, scanning electron microscopy (SEM) (Carl Zeiss Evo 50, Germany) was used. The native and decellularized corneas were fixed with 2.5% (w/v) glutaraldehyde for 1 h and dehydrated with ethanol series (50, 60, 70, 80, 90, 100%), followed by HMDS for 5 min. Then, all samples ($n = 3$) were allowed to dry overnight in the fume hood and samples were coated with gold-palladium for imaging.

2.3. Synthesis of Gelatin Methacrylate (GelMA) Hydrogel. The procedure for GelMA synthesis was adapted from the work of

Hosseini et al.³³ The GelMA hydrogels were prepared at a concentration of 8% (w/v) by dissolving 8 g gelatin in PBS (pH 7.5) at 60 °C and adding 8 mL of MA. The solution was magnetically stirred for 2.5 h. In order to remove the excess MA, the resulting solution was dialyzed with using a membrane with a cutoff value of 12–14 kDa (SpectrumLabs, USA) in distilled water for 2 weeks. The prepared solution was lyophilized for 5 days and stored at –80 °C.

2.4. Preparation of Hybrid Cornea Stromal Constructs. The hybrid cornea stromal constructs were prepared by UV photo-cross-linking of GelMA within decellularized bovine cornea matrix. A cross-linkable GelMA solution was obtained by adding 0.5% (w/v) photoinitiator (Irgacure-I2959). First, photoinitiator was dissolved in PBS and lyophilized GelMA was added. Lyophilized-decellularized cornea matrix were impregnated with 100 μ L 8% GelMA (w/v) solution, and the hybrid matrix was kept in room temperature overnight. Then, GelMA impregnated decellularized corneas were exposed to UV radiation at 365 nm in a photo-cross-linking chamber (UVP, Germany) using 3200, 6210, and 6900 μ J/cm² energy densities for 9 min (1.5 min \times 6 times with 10 s intervals).

2.5. Characterization of Hybrid Constructs. To determine the chemical compositions, attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) (Agilent, USA) was employed. All spectra of gelatin methacrylate, decellularized matrix, and hybrid cornea stromal constructs were obtained in the range of 400–4000 cm⁻¹.

In order to obtain the degradation profiles, native, decellularized, and hybrid cornea stromal constructs were immersed in collagenase A solution (1 unit/mL) in 100 mM PBS at pH 7.5 for 4 h.¹³ All samples ($n = 3$) were then lyophilized and weighed to determine the initial weights (W_0). The experiment was carried out in a Thermoshaker (Gerhardt, Germany). The samples were incubated at 37 °C for 4 h at 10 rpm. At every hour, samples were washed with 10 mM PBS and lyophilized for 16 h and weighed (W_d). The degradation rate was calculated based on the following eq 1.

$$D(\%) = [(W_0 - W_d)/W_0] \times 100 \quad (1)$$

where W_0 is the initial dry weight and W_d is the dry weight after degradation.

The degradation behavior was also monitored in PBS for 28 days. All groups were soaked in PBS (10 mM, pH 7.4) and incubated at 37 °C under continuous shaking. At determined time points (days 7, 14, 21, and 28), three samples from each group were lyophilized for 16 h and weighed (W_d). Degradation rates were determined by eq 1.

Hydration profiles of native, decellularized, and hybrid cornea stromal constructs were examined in PBS for 10 h. All samples ($n = 3$) were lyophilized and weighed (W_0), immersed in PBS (10 mM, pH 7.4), and incubated 37 °C under gentle shaking at 20 rpm. At predetermined intervals (1, 3, 6, 10 h), samples were blotted with filter paper and weighed (W_h). Swelling degrees of samples were calculated based on the following eq 2.

$$H(\%) = [(W_h - W_0)/W_0] \times 100 \quad (2)$$

where W_0 is the initial dry weight and W_h is the weight of wet samples.

Light transmittance analyses of native, decellularized, and hybrid cornea stromal constructs were performed with the microplate spectrophotometer in the range of 400–800 nm. The samples ($n = 3$) were immersed in PBS at 37 °C for 1 h, and then were cut into disks with a diameter of 6 mm and transferred to a 96-well plate. The absorbance values of every 50 nm wavelength were obtained, and the average of three measurements was calculated for each sample. Transmittance values were calculated according to eq 3.

$$T(\%) = 10^{(2-A)} \quad (3)$$

where A is the absorbance value and T is the transmittance value.

The thickness values of the native cornea, decellularized cornea, and the hybrid samples ($n = 3$) were measured by a micrometer (Mitutoyo, USA) and calculated as a mean of average and standard deviations. In order to observe transparency microscopically, the

samples were placed on a paper printed with the university logo and name.

Mechanical characterization of the native, decellularized, and hybrid cornea stromal constructs were evaluated in compression mode using CellScale Univert Biomaterial Tester (CellScale, Canada). Four samples of each group (11 \times 2 mm) were tested after having soaked in PBS for 1 h. Compression tests were performed using 50 N load cell at a rate of 2 mm/min. Young's moduli were calculated based on stress–strain curve in the range between 20 and 40% strain. In addition, the molar cross-linking densities of hybrid constructs were calculated using Flory theory,^{34,35} expressed in eq 4.

$$n = E/3RT \quad (4)$$

where n is the molar cross-linking density (mol/m³); E is the compressive modulus of hybrid constructs (N/m²); R is the universal gas constant (Nm/mol-K), and T is the absolute temperature (K).

2.6. Cell Isolation, Maintenance, and Recellularization. The cells used in the recellularization process were obtained from bovine corneas by primary culture method. Here, the bovine cornea was used as a model due to the strict regulations and ethical limitations on the usage of human ones. As for cell selection, keratocytes from bovine corneas were preferred as they were cheap and practical. Also, the performance of these cells was tested in decellularized bovine matrices in this study considering the adaptation of the cells to the matrices was easier due to the common origin thereof. For this purpose, fresh bovine eyes were quickly brought into the laboratory in PBS solution supplemented with 3% antibiotic-antimycotic solution. The corneal layers were then dissected and transferred to the cell culture laboratory in PBS solution. The stromal pieces (2 mm \times 2 mm) were transferred in 6-well plates and washed several times with PBS containing 1% antibiotic-antimycotic solution for 1 h. After the washing process, 8–10 stromal pieces were placed in 25 cm² cell culture flasks and in a CO₂ incubator for 3 h in order to provide adhesion of the tissue pieces.

At the end of the incubation period, freshly prepared DMEM low glucose medium supplemented with 1% antibiotic, 1% L-glutamine, and 10% fetal bovine serum was added to each flask, and the flasks were transferred to an incubator (Memmert, Germany) at 37 °C, supplied with 5% CO₂. The culture medium was replenished in every 3 days, and the keratocyte migration from the stromal tissue pieces was observed at the third day of the culture period. When the cells became confluent, trypsinization was applied by using 0.25% Trypsin EDTA. Following the collecting of the cells from the surface, they were pelleted in a 15 mL falcon tube for 3 min at 2500 rpm. This way, keratocytes were expanded and cryopreserved in FBS containing 10% (v/v) DMSO and were kept at vapor phase of liquid nitrogen.

Decellularized bovine corneas were sterilized using 70% ethanol (v/v) for the recellularization studies. The cell seeding density was determined as $1 \times 10^5/100 \mu$ L GelMA solution for the recellularization. Keratocyte cells were centrifuged and the supernatant was discarded to resuspend the cells in the GelMA solution. Next, 0.006 g of Irgacure was added in 1.2 mL of sterile PBS in a 2 mL Eppendorf tube and allowed to dissolve in a water bath at 80 °C for 30 min. Then, 0.08 g of GelMA was added and kept at 80 °C for 5 min. The final product was thoroughly mixed with vortex and sterilized with a Millipore filter. A total mixture of 1.2 mL of GelMA solution was added to the cell pellet, and the cells were suspended in the solution. A 100 μ L portion of cell suspension was inoculated to each decellularized tissue and incubated for 2 h in a CO₂ incubator to allow cells to attach to the matrices. Lastly, GelMA incorporated decellularized corneas were cross-linked at 6210 and 6900 μ J/cm² for 6 \times 1.5 min and continued to be cultured again in an incubator containing 5% CO₂ at 37 °C for 3 days. Non-UV treated ones were considered as the control groups (DBC+GelMA).

2.7. Cell Viability and Staining Studies. The cell viability analysis was performed with an Alamar Blue assay (Thermo Fisher Scientific, USA) on the first, third, seventh, and 14th days of the culture period to evaluate the keratocyte proliferation on materials. Briefly, the 10% (v/v) Alamar Blue test solution of culture medium was added to the wells on each analysis day and incubated for 4 h. At

the end of the incubation period, 200 μL of test solution was taken from each well ($n = 3$ and 5 parallel) and transferred to a 96-well plate. Using the microplate reader, values were determined in the range of 570–600 nm.

Live/dead cell staining analysis was conducted to investigate the cell survival and cellular behavior on the first, seventh, and 14th day of the culture period. For this purpose, a live/dead cell double staining kit (Thermo Fisher Scientific, Germany) was used. According to the instruction manual, calcein AM and ethidium homodimer-1 (EthD-1) fluorescent dyes were mixed in a ratio of 2 μL :1 μL in 1 mL PBS. On the analysis days, the culture medium was discarded from each well and samples were washed gently with PBS. Then, 1 mL of PBS and 100 μL of the final dye mixture were added. Subsequently, the samples were kept in a dark, humidified atmosphere at 37 $^{\circ}\text{C}$ with 5% CO_2 for 20 min. The dye mixture was discarded from the wells, and samples were washed gently with 1 mL PBS twice. Confocal microscopy (Zeiss, Germany) was employed to observe the cells on the constructs at the excitation wavelengths of 505–550 and 525 nm for Calcein AM and EthD-1, respectively.

In order to reveal the success of the recellularization process, the DAPI staining protocol was conducted on the recellularized hybrid constructs (DBC+GelMA+6210 μJ UV) cultured for 7 days. For this, the fixated samples were embedded in paraffin and tissue sections with 10 μm thickness were stained with DAPI and imaged with the inverted fluorescence microscope.

2.8. Statistical Analysis. All data are expressed as mean \pm SD. Welch's *t* test and two-way ANOVA were used to determine the statistical differences among the groups. The level of significance was represented as follows: $p > 0.05$ as not significant (ns), $p > 0.05$ as not significant (ns), $p \leq 0.05$ as *, $p \leq 0.01$ as **, $p \leq 0.001$ as ***, $p \leq 0.0001$ as ****.

3. RESULTS

3.1. Characterization of Decellularized Matrix.

3.1.1. Histological and Biochemical Examination. In order to evaluate the decellularization process, histological analysis of native and decellularized corneas were performed using HE and DAPI staining methods. The applied decellularization method was found to be successful in removing the keratocytes from stroma and epithelial layers of cornea. HE and DAPI staining revealed that SDS and ethanol treatments were sufficient enough to remove the entire cell from the tissue (Figure 1). The structure of the ECM and the orientation of the ECM components were successfully preserved in cornea

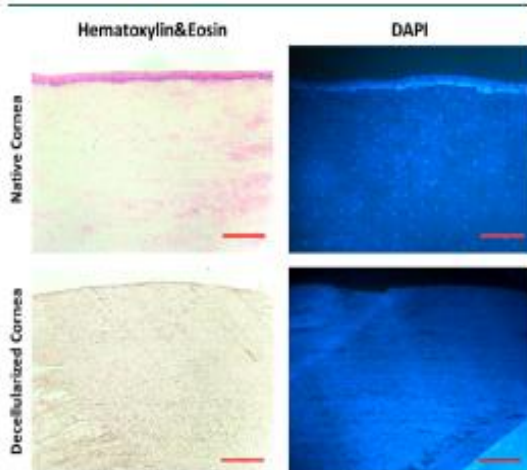


Figure 1. Hematoxylin & eosin staining and DAPI staining of native and decellularized cornea. Scale bar: 200 μm .

stromal constructs despite the devastating effects of SDS (Figure 1B, D). The collagen fibers of the decellularized cornea ECM were stained pink using eosin. The epithelial layer of cornea samples was disintegrated from stroma following the decellularization process.

In addition to histological assessment of the decellularization process, biochemical testing was also performed to evaluate the residual amounts of DNA, sGAG and collagen compared to nontreated cornea group. The residual amount of DNA is given in Figure 2A. DNA content of the native cornea was determined as 81.67 ± 4.9 ng, while it was calculated as 24.39 ± 2.5 ng for the decellularized matrices per 1 mg dry weight tissue. In Figure 2B, the sGAG content of the decellularized matrix was determined as 3.47 ± 0.12 μg , indicating a 40% reduction in sGAG content compared to that of native cornea (5.78 ± 0.1 μg). The collagen content of native and decellularized cornea samples were also evaluated with hydroxyproline assay (Figure 2C) and determined as 0.65 ± 0.01 mg and 0.74 ± 0.01 mg, respectively. Statistically, significant differences were observed in the DNA, GAG, and collagen content of the decellularized matrices with respect to native cornea (***) $p < 0.001$.

3.1.2. Matrix Characterization. SEM images were taken for both native and decellularized cornea samples to evaluate the morphology of the stroma layers after the decellularization process. The images from longitudinal sections of the native cornea (Figure 3B) revealed a protected structure compared to the decellularized samples (Figure 3D). Surface topography of the stroma layers showed the devastating effect of SDS on the corneal structure. Also, a cross-section from the decellularized cornea (Figure 3C) indicated a delaminated structure as a result of the decellularization process compared to the native counterpart (Figure 3A). The effects of the decellularization process were also clearly seen by the transparency comparison of the native and the decellularized cornea via macroscopic images (Figure 3E, 3F). As seen in Figure 3F, the decellularized cornea stromal constructs displayed opaque appearance.

ATR-FTIR spectroscopy of the decellularized and the native corneas was also performed to investigate the collagen and proteoglycan alterations that are observable between 650 and 4000 cm^{-1} (Figure 3G). The Amid-I band appeared at 1640 and 1628.8 cm^{-1} which corresponds to the C–O bond stretching vibration of collagen. A peak positioned at 1539.4 cm^{-1} refers to the amide-II bonds due to N–H bending vibration. The peaks at 1230 cm^{-1} attributed to the polar region of collagen. Furthermore, the peaks appeared at 1043.7 and 1028.7 cm^{-1} refers to the C–OH stretching vibrations of GAG.³⁰ The C–H backbone absorption region of native and decellularized cornea also appeared at 2922.2 cm^{-1} .

3.2. Characterization of The Hybrid Cornea Stromal Constructs.

3.2.1. Photo-cross-linked Hybrid Constructs. The decellularized cornea samples treated with SDS were modified with GelMA to obtain photo-cross-linked hybrid cornea stromal constructs. The thickness of the dried-decellularized matrix was determined as 0.83 ± 0.2 mm by the micrometer. The dried-decellularized matrices were impregnated with 8% GelMA (w/v) solution (100 μL) and cross-linked immediately (denominated with 1), after 5 min (denominated with 2) and 24 h (denominated with 3).

The hybrid construct groups were also classified according to the UV energy densities at 365 nm as A, B, and C (3200, 6210, and 6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, respectively). These energy densities

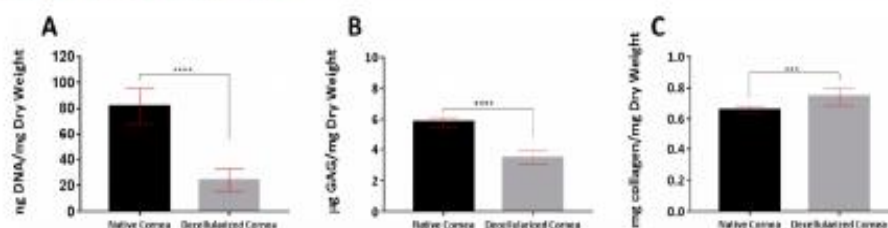


Figure 2. Quantitative analysis of the amount of residual DNA (A), sulfated-glycosaminoglycan (sGAG) (B), and collagen (C) of native and decellularized cornea. All measurements were normalized to mg dry weight (*** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, $n = 3$).

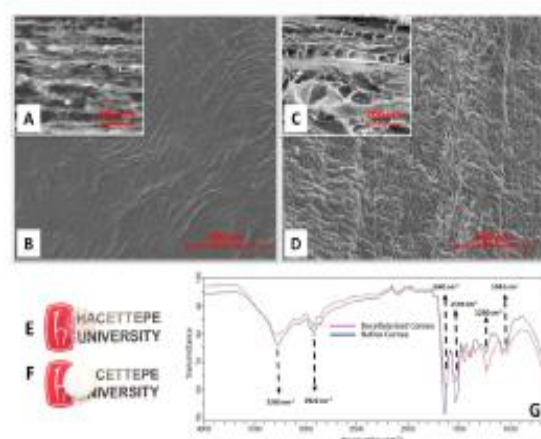


Figure 3. SEM images showing the stroma layers by cross and longitudinal section of nontreated cornea (A, B) and decellularized cornea (C, D). Macroscopic images of native (E) and decellularized cornea (F). ATR-FTIR spectrum of native and decellularized cornea (G).

were chosen to monitor the effects of UV treatment energies on the methacrylation degree since increasing the density of the cross-linked GelMA network can alter the transparency, hydration, degradation, and mechanical properties of the final constructs. The summary of the hybrid cornea groups is given in Table 1.

Table 1. Denomination of Groups According to Optimized Crosslinking Process Conditions

UV energy ($\mu\text{J}/\text{cm}^2$)	impregnation time		
	immediately	5 min	24 h
3200	A1	A2	A3
6210	B1	B2	B3
6900	C1	C2	C3

The transparency results are given in Figure 4. The hybrid cornea stromal constructs cross-linked immediately after impregnation with the hydrogel and cross-linked with different UV energies (3200, 6210, and 6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) showed similar transparencies (Figure 4A). The hybrid cornea stromal constructs that were impregnated with GelMA for 5 min prior to the cross-linking showed more transparency compared to the immediately cross-linked group at three different UV densities (Figure 4B). However, the best transparency was observed in the groups which were cross-linked for 24 h following impregnation with GelMA (Figure 4C) showing the positive effects of hydrogel impregnation time. The photopolymerization treatment at 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ energy after 24 h

impregnation was found as the most favorable protocol according to the macroscopic investigations. It was also observed that there might be polymer degradation with the highest UV energy utilized and it is reflected in strain and compressive strength values which rules out using Group C. These findings were also supported with the transmittance measurements given in section 3.1.2.

3.2.2. Transmittance. Transmittance evaluation of cornea is one of the remarkable criteria for the improvement of the corneal transplants. In this study, light transmission of the native, decellularized and cross-linked hybrid constructs were determined by UV absorbance at 400–800 nm. According to the thickness measurements (Figure 5), the average thickness of the native cornea was found as 1.52 ± 0.08 mm. After the decellularization process, the thickness of the corneas was increased approximately for 4-folds. The lyophilization process of the decellularized corneas was also applied to reduce their thickness. The average thickness of the hybrid constructs was determined as 1.47 ± 0.2 mm. According to Figure 5, there was no significant difference between the native cornea and hybrid construct. However, decellularization process significantly changed the thickness of the cornea due to swelling compared to native cornea. The light transmittance of native cornea samples was found to be between $59.51 \pm 5.19\%$ and $94.08 \pm 0.97\%$ (Figure 6). The light transmittance of the native bovine cornea samples was found to be $91.42 \pm 1.47\%$ at 700 nm. The transparency was lost in the decellularized cornea samples, which was found as $5.84 \pm 1.01\%$ at 700 nm. It is clear that the transmittance of decellularized cornea samples decreased with increased corneal thickness.

In situ cross-linking of GelMA within the decellularized cornea matrices immediately and after impregnation for different times (subsets 1, 2, and 3) at different densities, namely 3200 (Figure 6A), 6210 (Figure 6B), and 6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ (Figure 6C) was shown to be highly effective in enhancing the transparency compared to decellularized cornea stromal constructs.

Group B3 (6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ —impregnated 24 h) was found to have the highest transparency when all other hybrid groups showed similar values. Therefore, the remarkable transmittance values (i.e., $55.05 \pm 6.74\%$ at 700 nm) for group B3 were also plotted against that of the native and the decellularized ones for comparison (Figure 6D). Also, the transmittance values of all hybrid groups at 700 nm are provided in Table 2 as a reference. All the light transmittance results were in good agreement with the findings of gross transparency evaluations (Figure 4).

3.2.3. Mechanical Evaluation. Mechanical behavior of the hybrid cornea stromal constructs was investigated to determine the differences due to different cross-linking densities attained by different UV energies applied. The mechanical data was



Figure 4. Gross images indicative of the effects of different exposure densities and impregnation times on transparency. Materials were exposed to 3200, 6210, and 6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV light (365 nm) for 1.5 min with 10 s intervals up to 6 times: immediately cross-linked constructs after impregnation on GelMA solution (Immediately), cross-linked constructs after 5 min (5 minutes), and after 24 h of impregnation (24 hours).

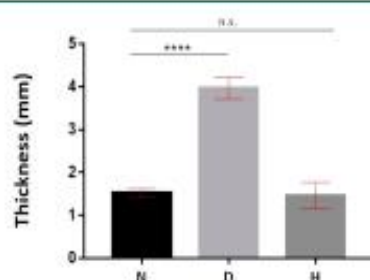


Figure 5. Average thickness measurement of native cornea (N), decellularized cornea (D), and hybrid construct (H) ($n = 5$, **** $p < 0.001$).

summarized considering three properties: compression modulus and strain. The stress–strain curves of the hybrid cornea stromal construct of each group and native and decellularized cornea as controls were given in Figure 7. Group A (3200 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV energy) showed similar compression strain in the range of 20–25% for all impregnation subsets (namely A1, A2, and A3). However, this value increased up to the range of 30–40% in Group B (6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV energy) for all impregnation subsets (namely B1, B2, and B3), possibly due to the increased cross-link density (Figure 7B). A similar trend

Table 2. Transmittance (%) of Hybrid Constructs at 700 nm

group	transmittance (%)
A1	13.79 \pm 6.13
A2	10.40 \pm 0.82
A3	15.47 \pm 2.69
B1	11.41 \pm 3.83
B2	13.76 \pm 2.96
B3	53.60 \pm 6.50
C1	9.43 \pm 2.15
C2	14.98 \pm 4.14
C3	18.38 \pm 8.44

was observed for Group C (Figure 7C). The stress–strain curve of the hybrid cornea stromal construct that exhibited the highest transmittance value (B3) was plotted against the those of native and decellularized cornea stromal constructs and found in between those values (Figure 7D).

From the stress–strain plots, compression modulus data was also shown in Table 3. The compression moduli were calculated from the linear region of the curves. There was no significant difference among all hybrid groups compared to that of native cornea (\sim 520 kPa). A slight decrease observed in the UV highest energy (Group C) was believed to be stemmed

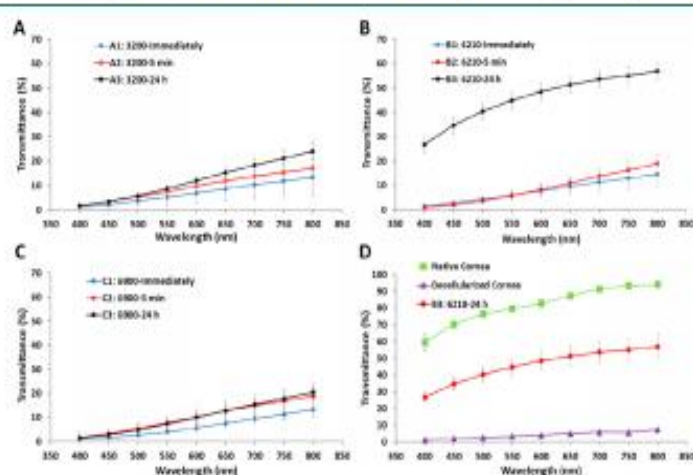


Figure 6. Transmittance values of hybrid materials that were cross-linked using different energy densities and impregnation times: 3200 (A), 6210 (B), and 6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ (C). Comparison of the transmittance values of the native, decellularized, and B3 hybrid cornea stromal constructs (D). All samples were embedded in PBS for 1 h ($n = 3$) prior to measurements.

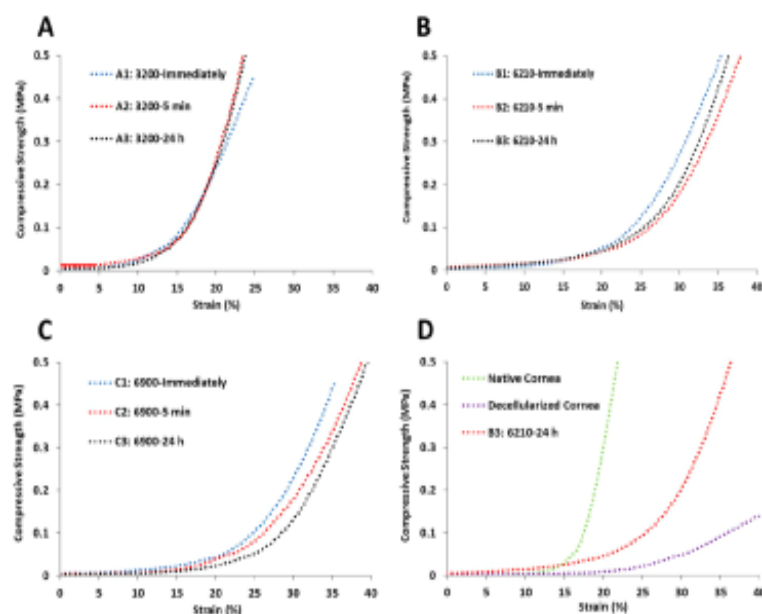


Figure 7. Compression stress–strain curves of hybrid materials that were cross-linked using different energy densities and impregnation times: 3200 (A), 6210 (B), and 6900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ (C). Comparison of the native, decellularized, and B3 hybrid cornea stromal constructs (D).

Table 3. Compressive Modulus Values of Native, Decellularized, and Hybrid Cornea Stromal Constructs

groups	compressive modulus (kPa)
native	9790 \pm 560
decellularized	870 \pm 150
A1	4190 \pm 560
A2	4140 \pm 520
A3	4850 \pm 820
B1	4370 \pm 970
B2	4470 \pm 850
B3	5040 \pm 680
C1	3930 \pm 430
C2	4330 \pm 820
C3	4800 \pm 260

from a possible polymer degradation. However, it was calculated as 70 kPa for the decellularized matrices. Also, the modulus of the native cornea was determined as 9790 \pm 560 kPa, while it was 870 \pm 150 kPa for the decellularized cornea. The low mechanical strength values obtained for the decellularized group was the indication of severe deteriorative effects of the decellularization protocol employed. Again, it was shown that the *in situ* cross-linking of GelMA significantly enhanced the mechanical properties, matching that of native tissue. Nonetheless, the compression modulus of B3 group was the highest among the hybrid cornea stromal constructs (5040 \pm 680 kPa).

The molar cross-linking densities of hybrid constructs were calculated as 559.9 \pm 34.8, 553.28 \pm 69.5, and 648.2 \pm 49.5 mol/m³ for A1, A2, and A3 groups, 584.0 \pm 39.6, 597.4 \pm 79.6, and 673.6 \pm 30.8 mol/m³ for B1, B2, and B3 groups, and 525.2 \pm 57.5, 578.7 \pm 79.6, and 641.5 \pm 34.7 mol/m³ for C1, C2 and C3 groups, respectively. According to these findings, molar cross-linking density was increased due to UV exposure time in each UV densities. Also, there was no significance increase observed with the increased UV densities for immediately

impregnated groups. However, molar cross-linking density was improved in the 5 min impregnated groups.

3.2.4. ATR-FTIR Analysis. ATR-FTIR analysis were performed to investigate the chemical background of GelMA alone and within the decellularized matrix. Both spectra were obtained between the range of 650–4000 cm^{-1} (Figure 8A).

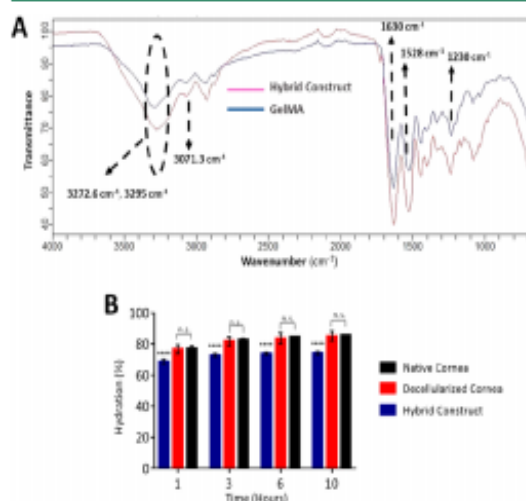


Figure 8. Representative ATR-FTIR spectra of gelatin methacrylate and photo-cross-linked hybrid constructs (A). Swelling ratio of native, decellularized, and hybrid cornea stromal constructs ($n = 3$ and **** $p < 0.0001$).

For the ATR-FTIR spectra of GelMA, characteristic peaks observed at 3295 cm^{-1} were associated with O–H stretching and N–H stretching which are related to the peptide bonds (Amide A). The peak at 3071.3 cm^{-1} corresponds to the C–H stretching groups. The C=O stretching groups are related to the amide I bonds depicted at 1632.6 cm^{-1} while C–N–H

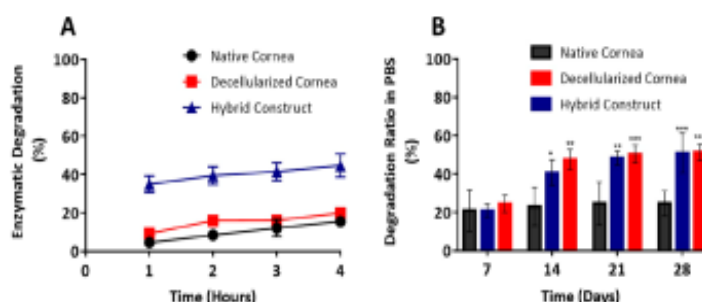


Figure 9. Enzymatic degradation profiles of native, decellularized, and hybrid cornea stromal constructs in 1 unit/mL collagenase solution in 4 h ($n = 3$) (A). Degradation in PBS at 37 °C up to 28 days ($n = 3$ and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$) (B).

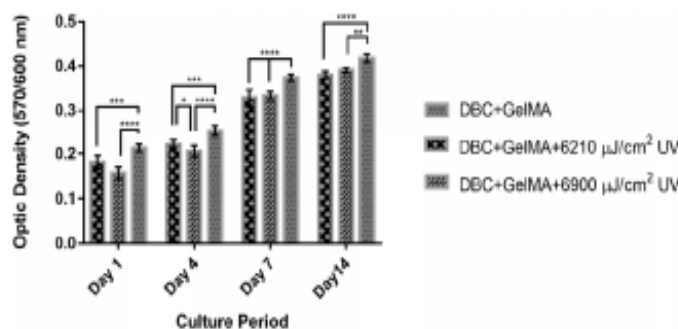


Figure 10. Proliferation of bovine keratocytes on the hybrid materials cultured for 14 days.

stretching referring to amide II and C–H stretching referring to amide III bonds appeared at 1524.5 and 1230 cm^{-1} , respectively.³⁷ The peak at 1632.6 cm^{-1} (carbon double bond) indicated the interaction between gelatin and methacrylate anhydride.³⁸ The peaks assignments of hybrid construct were also confirmed that the GelMA stayed within the matrix.

3.2.5. Swelling Behavior. Swelling behavior of the hybrid cornea stromal construct with the highest transparency and mechanical strength (Group B3) was investigated and compared to the positive (native cornea) and negative (decellularized cornea) control groups (Figure 8B). For this, all three groups were treated in PBS up to 10 h. Swelling ratios for both native and decellularized cornea ($85.7 \pm 0.22\%$ and $85.2 \pm 3.09\%$, respectively) were found to be higher (** $p < 0.01$) than that of the hybrid constructs ($74.2 \pm 1.03\%$) after 10 h of treatment, possibly due to the hydrogel nature of the impregnated GelMA. There was no significant difference observed between the native and decellularized cornea stromal constructs ($p = 0.93$).

3.2.6. Degradation Characteristics. Proteolytic enzymes such as pepsin, trypsin, and collagenase can be used to assess the stability of collagen based biomaterials.³⁹ In this study, degradation behavior of the prepared constructs was investigated to evaluate the stability of the final matrix using collagenase A solution and PBS for 4 h and 28 days, respectively. Figure 9A shows the mass loss in hybrid samples (B3) compared to those of native and decellularized cornea stromal constructs. At the end of the 4 h duration, total degraded mass was calculated as $44.68 \pm 5.99\%$ for the hybrid constructs, mostly due to the gelatin-based hydrogel phase. This value was calculated as $15.56 \pm 2.84\%$ and $19.98 \pm 2.56\%$ for native and decellularized cornea stromal constructs, respectively.

The degradation profile in PBS (Figure 9B) was monitored for 4 weeks. Significances were determined among each time point and compared to native cornea ($n = 3$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). At day 7, the degraded mass values were calculated as $20.98 \pm 10.83\%$, $24.55 \pm 4.53\%$, and $20.87 \pm 3.51\%$ for native, decellularized, and hybrid cornea stromal constructs, respectively, and there was no significant difference between the groups compared to native cornea. Decellularized and hybrid cornea stromal constructs were shown to be unstable in PBS at day 28 with increased degradation rates of $51.37 \pm 4.29\%$ and $50.9 \pm 10.34\%$, respectively. The degradation was calculated as $24.73 \pm 6.55\%$ for native cornea at day 28.

3.3. Cell Culture Studies. **3.3.1. Keratocyte Proliferation on Materials.** Based on the proliferation data obtained (Figure 10), the highest cell viability was observed in the DBC+GelMA group. Although equal amounts of cell seeding was initially performed on all materials, low cell viability was observed in the UV treated groups compared to non-UV treated ones on the first day of culture, which is due to the negative effects of UV on cells. The DBC+GelMA (non-UV treated) group was found to preserve its superiority in terms of cell viability throughout the culture period. However, the proliferation rate was found remarkable in the group containing cross-linked GelMA groups especially on the seventh and 14th day of the culture period.

It is concluded that the cross-linking of GelMA reduced the viability of the cells on the beginning of the culture period. However, it showed a good cell proliferation due to its biological origin.²² On the other hand, the negative effects of the photo-cross-linking on the cell viability were also found to be dependent upon the UV energies. Groups treated with 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV energy exhibited better cell viability particularly in the early stages of the culture compared to the group cross-

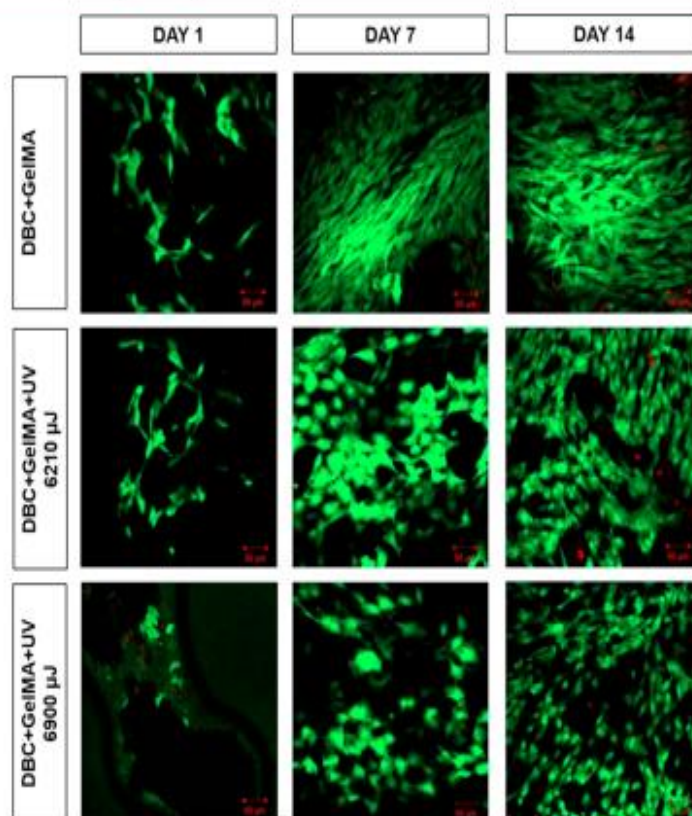


Figure 11. Determination of the cell viability and the cell morphology on the hybrid materials by live/dead assay.

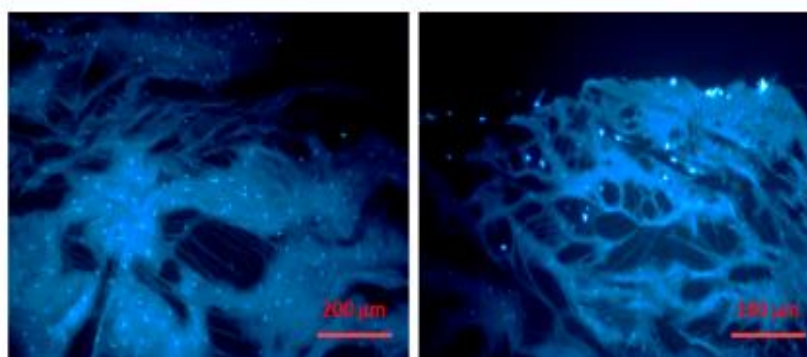


Figure 12. Determination of cell nucleus distribution in the 7-day cultured hybrid constructs: (A) 200, (B) 100 μm .

linked with the $6900 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV energy. In the later stages of the culture, however, the proliferative effect of cross-linked GelMA exhibited similarity regardless of the utilized UV energies.

3.3.2. Live/Dead Analysis. Figure 11 shows the confocal microscopy images taken after Live/Dead assay. In the first day of the culture, least number of cells were observed in the group treated with $6900 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV energy. Also, it was noteworthy that the cells were observed in nearly round shape throughout the matrix–hydrogel combination. This might be due to the detrimental effects of the UV light. In the other groups, cells were observed in their original morphology on the same day. No significant number of dead cells was observed during the 14 day culture period in any group.

3.3.3. Recellularization Efficacy Determined with DAPI Staining. Recellularization efficacy was evaluated with DAPI staining on the obtained sections. In Figure 12, dark blue stained cell nuclei distributed in the materials are clearly visible. On the other hand, depending on the static cultivation, the presence of more nuclei in the upper part of the hybrid constructs is worthy of attention. These findings indicated that the recellularization process was carried out effectively.

4. DISCUSSION

Various decellularization methods for corneal regeneration have been developed using bovine cornea in tissue engineering applications.^{10,39,40} For the assessment of effective decellularization protocol, histological and biochemical analyses are

performed on native and decellularized tissues. In this study, histological assessment supported by SEM images revealed the success of decellularization protocol used in the removal of the cells.

The residual DNA after decellularization is an important issue in order to produce a safe transplant. It has been reported that this amount should be less than 50 ng dsDNA per mg of dry tissue.^{41,42} Here we achieved a lower value of 24.39 ng residual DNA, meaning that 70.1% of the DNA fragments were removed with the applied protocol. sGAG is an important part of the ECM structure and is reported to be depleted up to 47%, especially in protocols using SDS.^{13,36} A GelMA network was supplemented here, knowing the reported potential to synthesize biglycan and decorin motives and its abilities toward keratocyte compatibility.¹⁹ Hydroxyproline, the major component of collagen, also plays a key role in the stability of the collagen triple helix structure and comprises 12.5% of collagen.^{43,44} Here, we analyzed the hydroxyproline levels for the assessment of collagen content following decellularization. The small increase in the collagen content (0.09 mg/10 mg dry weight) calculated with the assay was associated with the loss of proteoglycans that played a role in arrangements of collagen fibrils and ECM network.⁴⁵ In addition, chemical characterization of the native and the decellularized cornea revealed the vibrational modes of collagen both in native and decellularized cornea. Amide-I, Amide-II, Amide-III, and Amide A were depicted on the peak regions at 1600–1700, 1500–1600, 1200–1300, and 3200–3300 cm^{-1} , respectively.^{36,46}

Corneal transparency and strength depend on collagen orientation and structure of stromal ECM which is controlled by the presence of interfibrillar proteoglycans.^{10,47} Due to the detrimental effects of the available decellularization processes, corneal opacity and strength are decreased in consequence of disrupted ECM^{11,48} and corneal opacity also increased due to thickness of the swelled tissue. To improve the transparency and mechanical strength of decellularized corneas, a second hydrogel matrix was impregnated here within the decellularized cornea stromal constructs and the final hybrid material was cross-linked. As the hydrogel, GelMA was employed since it has a reported biocompatibility and tunable cross-linking capabilities.³⁹ Transparency characteristic of GelMA hydrogel was also believed to be suitable for this aim.¹⁹ The light transmittance of native human cornea is around 90% at 700 nm.⁵⁰ And the light transmittance of native bovine cornea used in this study was found to be 91.4%.

In the present study, three different impregnation times were used prior to the cross-linking, namely immediate, 5 min, and 24 h. It was shown that the impregnation time did enhance the optical properties, possibly due to allowing more time for the penetration of the polymer chains through the ECM matrix. Also, three different UV treatment energies were employed, and it was revealed that the best value was 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ to achieve the highest transmittance. On the other hand, lower UV intensity did not affect the transparency of the hybrid construct and all the transmittance values were remained under 20%. The transparency was improved with 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ UV after 24 h impregnation. The significant improvement in light transmission between 3200 and 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ was reasoned by the increased cross-link density between the methacrylated gelatin chains and the ECM proteins. However, increase in the UV intensity (3900 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) caused decrease in the light transmittance even with the increasing impregnation time that might have affected by the densification of the network

between the ECM protein and the methacrylated polymer chains.

The mechanical analyses of the hybrid cornea stromal constructs also revealed that increasing the UV exposure time improved the compression moduli compared to that of decellularized cornea. Compressive moduli of decellularized cornea matrices are reported to be in the range of 0.1 to 57 MPa depending on the applied protocol, test conditions, or age and health of the animal.⁵¹ The transparency and compressive modulus of the constructs are inferior to the native cornea. However, the main objective of the proposed method is improving the transparency and mechanical properties of decellularized cornea. The harmful effects of SDS treatment on the transparency and mechanical properties of decellularized cornea have already been reported in the literature.^{12,15} In this manner, the mechanical properties and transparency of the decellularized cornea were improved with GelMA impregnation and cross-linking within the matrix even with the devastating effect of the applied decellularized protocol.

The hydration and degradation characteristics of the hybrid cornea stromal constructs also differed from those of decellularized cornea. The main characteristic of hydrogels was associated with their swelling degree, a capability of retaining large amounts of water. Increasing the cross-link density of GelMA led to a decrease in hydration ratio due to obtained tight junctions of 3D networks.⁵² The hydration ratios of the hybrid cornea stromal constructs were decreased after impregnation of GelMA hydrogel as expected. The degradation profile can give an idea about the stability of the constructs and is an important factor to consider whether the degradation and regeneration rate of the final construct match or not.¹³ Here, this synchronization was also tuned easily by changing the hydrogel/decellularized matrix ratio and cross-linking density. For example, for the hybrid cornea stromal constructs, Group B3 showed high degradation rates compared to native cornea, both in enzymatic and PBS degradation studies which was possibly due to the presence and the concentration of the GelMA used (8% (w/w)). According to the degradation reports on GelMA using collagenase, it was reported that higher GelMA concentrations alone (10% (w/w)) showed similar degradation rates of around 30% following 4 h treatment.¹⁹ It is also known that the degradation rate can be adjusted simply by changing the GelMA concentration.⁵³

The cell proliferation was found notable and alike in all groups, and the difference in the cell morphology was noticeable on the seventh day of the culture period. Keratocytes in the native corneal stroma have a large, rounded cell body together with excessive lamellipodia.^{54,55} It was observed that the non-UV treated groups exhibited a fibroblastic morphology in the later days of the culture, while the cells retained their original morphologies in the UV treated groups (Figure 11). The cross-linked GelMA was found to create a positive effect on the cell behavior when it remained longer within the decellularized cornea structure. Better cell morphology and distribution was observed in the UV treated group at 6210 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$.

There were, however, several drawbacks of this study showing the full potential of the prepared constructs. First of all, even though delivering cells, especially stem cells along with the actual transplant would provide beneficial outcomes, it is believed that this may not be a prerequisite since the constructs can maintain their transparency and integrity without severe adverse effects which stemmed from a foreign

cell source used. Instead, the patient's own cells can repopulate the implant by time. Second, the fate of the cells is also controversial, and there has always been a tool needed to identify the keratocyte nature using protein/immunohistochemical analyses. However, within the ECM structure and GelMA, it is highly difficult to observe these changes. The interpretation of the residual cells and/or nuclei has been also a problem in the decellularization field. To date, there has been no report of a fully successful decellularization protocol capable of effectively removing all cell and DNA fragments. In this study, commonly followed assays were utilized to identify the extent of these remnants to minimize possible immune reactions. Lastly, an *in vivo* study comparing both cell-free and recellularized constructs would provide better understanding toward the effectiveness of the proposed approach.

In summary, the level of transparency and mechanical properties of the hybrid construct is not high enough to warrant further *in vivo* tests, but the hybrid cornea stromal construct obtained by the proposed method could potentially increase the supply of transplantable decellularized tissue and overcome the limitations of decellularization protocols. This approach can be applied on other decellularized scaffolds or combined with other gel systems to improve the mechanical properties and transparency of the materials.

5. CONCLUSION

In this study, a hybrid corneal matrix was established for the first time. GelMA polymer was impregnated into a decellularized cornea followed by cross-linking *in situ* to enhance the optical and mechanical performance of the final construct. The keratocytes loaded into the GelMA hydrogel were found to be viable after the UV treatment. When compared to the reported values, the highest transparency for the decellularized cornea was achieved. This approach, where the impregnated polymer is cross-linked *in situ* within an ECM structure, is also applicable to other soft tissues to achieve the desired mechanical properties and to deliver the cells homogeneously throughout the matrix. The final construct is therefore benefitting from both the flexibility of the adjustable properties of the synthetic materials and the native micro-architecture and composition of the decellularized tissue.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: hmaydin@hacettepe.edu.tr. Tel: (+90) 533 551 58 30. Fax: (+90) 312 299 20 53.

ORCID

Halil Murat Aydin: 0000-0003-4107-4324

Author Contributions

[†]These authors contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank B. Topuz for her assistance in mechanical tests. This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (BAP) (Project No: 16688).

REFERENCES

- Whitcher, J. P.; Srinivasan, M.; Upadhyay, M. P. Corneal Blindness: A Global Perspective. *Bull. World Health Organ.* **2001**, *79* (3), 214–221.
- Carlsson, D. J.; Li, F.; Shimmura, S.; Griffith, M. Bioengineered Corneas: How Close Are We? *Curr. Opin. Ophthalmol.* **2003**, *14* (4), 192–197.
- Pascolini, D.; Mariotti, S. P. Global Estimates of Visual Impairment: 2010. *Br. J. Ophthalmol.* **2012**, *96* (5), 614–618.
- Price, F. W. J.; Whitson, W. E.; Johns, S.; Gonzales, J. S. Risk Factors for Corneal Graft Failure. *J. Refract. Surg.* **1996**, *12* (1), 134–137.
- Zhang, Z.; Niu, G.; Choi, J. S.; Giegegack, M.; Atala, A.; Soker, S. Bioengineered Multilayered Human Corneas from Discarded Human Corneal Tissue. *Biomed. Mater.* **2015**, *10* (3), 35012.
- Xiao, X.; Pan, S.; Liu, X.; Zhu, X.; Connon, C. J.; Wu, J.; Mi, S. In Vivo Study of the Biocompatibility of a Novel Compressed Collagen Hydrogel Scaffold for Artificial Corneas. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2014**, *102* (6), 1782–1787.
- Ghezzi, C. E.; Rnjak-Kovacic, J.; Kaplan, D. L. Corneal Tissue Engineering: Recent Advances and Future Perspectives. *Tissue Eng., Part B* **2015**, *21* (3), 278–287.
- Luo, H.; Lu, Y.; Wu, T.; Zhang, M.; Zhang, Y.; Jin, Y. Construction of Tissue-Engineered Cornea Composed of Amniotic Epithelial Cells and Acellular Porcine Cornea for Treating Corneal Alkali Burn. *Biomaterials* **2013**, *34* (28), 6748–6759.
- Gilbert, T. W.; Sellaro, T. L.; Badyal, S. F. Decellularization of Tissues and Organs. *Biomaterials* **2006**, *27* (19), 3675–3683.
- Lynch, A. P.; Ahearne, M. Strategies for Developing Decellularized Corneal Scaffolds. *Exp. Eye Res.* **2013**, *108*, 42–47.
- Aslan, B.; Guler, S.; Tevlek, A.; Aydin, H. M. Evaluation of Collagen Foam, Poly(L-Lactic Acid) Nanofiber Mesh, and Decellularized Matrices for Corneal Regeneration. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2018**, *106* (6), 2157–2168.
- Sasaki, S.; Funamoto, S.; Hashimoto, Y.; Kimura, T.; Honda, T.; Hattori, S.; Kobayashi, H.; Kishida, A.; Mochizuki, M. In Vivo Evaluation of a Novel Scaffold for Artificial Corneas Prepared by Using Ultrahigh Hydrostatic Pressure to Decellularize Porcine Corneas. *Mol. Vis.* **2009**, *15*, 2022–2028.
- Wilson, S. L.; Sidney, L. E.; Dunphy, S. E.; Dua, H. S.; Hopkinson, A. Corneal Decellularization: A Method of Recycling Unsuitable Donor Tissue for Clinical Translation? *Curr. Eye Res.* **2016**, *41* (6), 769–782.
- Oh, J. Y.; Kim, M. K.; Lee, H. J.; Ko, J. H.; Wee, W. R.; Lee, J. H. Processing Porcine Cornea for Biomedical Applications. *Tissue Eng., Part C* **2009**, *15* (4), 635–645.
- Du, L.; Wu, X.; Pang, K.; Yang, Y. Histological Evaluation and Biomechanical Characterisation of an Acellular Porcine Cornea Scaffold. *Br. J. Ophthalmol.* **2011**, *95* (3), 410–414.
- Mimura, T.; Amano, S.; Yokoo, S.; Uchida, S.; Yamagami, S.; Usui, T.; Kimura, Y.; Tabata, Y. Tissue Engineering of Corneal Stroma with Rabbit Fibroblast Precursors and Gelatin Hydrogels. *Mol. Vis.* **2008**, *14*, 1819–1828.
- Rafat, M.; Li, F.; Fagerholm, P.; Lagali, N. S.; Watsky, M. A.; Munger, R.; Matsuura, T.; Griffith, M. PEG-Stabilized Carbodiimide Crosslinked Collagen-Chitosan Hydrogels for Corneal Tissue Engineering. *Biomaterials* **2008**, *29* (29), 3960–3972.
- Lai, J.-Y.; Li, Y.-T.; Cho, C.-H.; Yu, T.-C. Nanoscale Modification of Porous Gelatin Scaffolds with Chondroitin Sulfate for Corneal Stromal Tissue Engineering. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 1101–1114.
- Kilic Bektas, C.; Hasirci, V. Mimicking Corneal Stroma Using Keratocyte-Loaded Photopolymerizable Methacrylated Gelatin Hydrogels. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *12* (4), e1899–e1910.
- Fagerholm, P.; Lagali, N. S.; Merrett, K.; Jackson, W. B.; Munger, R.; Liu, Y.; Polarek, J. W.; Soderqvist, M.; Griffith, M. A Biosynthetic Alternative to Human Donor Tissue for Inducing Corneal Regeneration: 24-Month Follow-up of a Phase 1 Clinical Study. *Sci. Transl. Med.* **2010**, *2* (46), 46ra61.

- (21) Kwon, S.; Lee, S. S.; Sivashanmugam, A.; Kwon, J.; Kim, S. H. L.; Noh, M. Y.; Kwon, S. K.; Jayakumar, R.; Hwang, N. S. Bioglass-Incorporated Methacrylated Gelatin Cryogel for Regeneration of Bone Defects. *Polymers (Basel, Switz.)* **2018**, *10* (8), 914.
- (22) Nichol, J. W.; Koshy, S. T.; Bae, H.; Hwang, C. M.; Yamanlar, S.; Khademhosseini, A. Cell-Laden Microengineered Gelatin Methacrylate Hydrogels. *Biomaterials* **2010**, *31* (21), 5536–5544.
- (23) Monteiro, N.; He, W.; Franca, C. M.; Athirasala, A.; Bertassoni, L. E. Engineering Microvascular Networks in LED Light-Cured Cell-Laden Hydrogels. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4* (7), 2563–2570.
- (24) Shirzaei Sani, E.; Kheirkhah, A.; Rana, D.; Sun, Z.; Foulsham, W.; Shekhi, A.; Khademhosseini, A.; Dana, R.; Annabi, N. Sutureless Repair of Corneal Injuries Using Naturally Derived Bioadhesive Hydrogels. *Sci. Adv.* **2019**, *5* (3), No. eaav1281.
- (25) Kolesky, D. B.; Truby, R. L.; Gladman, A. S.; Busbee, T. A.; Homan, K. A.; Lewis, J. A. 3D Bioprinting of Vascularized, Heterogeneous Cell-Laden Tissue Constructs. *Adv. Mater.* **2014**, *26* (19), 3124–3130.
- (26) Bertassoni, L. E.; Cecconi, M.; Manoharan, V.; Nikkha, M.; Hjortnaes, J.; Cristino, A. L.; Barabaschi, G.; Demarchi, D.; Dokmeci, M. R.; Yang, Y.; Khademhosseini, A. Hydrogel Bioprinted Microchannel Networks for Vascularization of Tissue Engineering Constructs. *Lab Chip* **2014**, *14* (13), 2202–2211.
- (27) Schuurman, W.; Levett, P. A.; Pot, M. W.; van Weeren, P. R.; Dhert, W. J. A.; Hutmacher, D. W.; Melchels, F. P. W.; Klein, T. J.; Malda, J. Gelatin-Methacrylamide Hydrogels as Potential Biomaterials for Fabrication of Tissue-Engineered Cartilage Constructs. *Macromol. Biosci.* **2013**, *13* (5), 551–561.
- (28) Heo, D. N.; Ko, W. K.; Bae, M. S.; Lee, J. B.; Lee, D. W.; Byun, W.; Lee, C. H.; Kim, E. C.; Jung, B. Y.; Kwon, I. K. Enhanced Bone Regeneration with a Gold Nanoparticle-Hydrogel Complex. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (11), 1584–1593.
- (29) Galis, Z. S.; Khatri, J. J. Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling and Atherogenesis: The Good, the Bad, and the Ugly. *Circ. Res.* **2002**, *90* (3), 251–262.
- (30) Kimura, Y.; Ozeki, M.; Inamoto, T.; Tabata, Y. Adipose Tissue Engineering Based on Human Preadipocytes Combined with Gelatin Microspheres Containing Basic Fibroblast Growth Factor. *Biomaterials* **2003**, *24* (14), 2513–2521.
- (31) Dreesmann, L.; Ahlers, M.; Schlosshauer, B. The Pro-Angiogenic Characteristics of a Cross-Linked Gelatin Matrix. *Biomaterials* **2007**, *28* (36), 5536–5543.
- (32) Kuijpers, A. J.; Engbers, G. H. M.; Feijen, J.; De Smedt, S. C.; Meyvis, T. K. L.; Demeester, J.; Krijgsveld, J.; Zaat, S. A. J.; Dankert, J. Characterization of the Network Structure of Carbodiimide Cross-Linked Gelatin Gels. *Macromolecules* **1999**, *32* (10), 3325–3333.
- (33) Hosseini, V.; Ahadian, S.; Ostrovidov, S.; Camci-Unal, G.; Chen, S.; Kaji, H.; Ramalingam, M.; Khademhosseini, A. Engineered Contractile Skeletal Muscle Tissue on a Microgrooved Methacrylated Gelatin Substrate. *Tissue Eng., Part A* **2012**, *18* (23–24), 2453–2465.
- (34) Flory, P. J. Statistical Mechanics of Swelling of Network Structures. *J. Chem. Phys.* **1950**, *18* (1), 108–111.
- (35) Flory, P. J. *Principles of Polymer Chemistry*; Cornell University Press, 1953.
- (36) Nara, S.; Chameettachal, S.; Midha, S.; Murab, S.; Ghosh, S. Preservation of Biomacromolecular Composition and Ultrastructure of a Decellularized Cornea Using a Perfusion Bioreactor. *RSC Adv.* **2016**, *6* (3), 2225–2240.
- (37) Aldana, A. A.; Malatto, L.; Rehman, M. A. U.; Boccaccini, A. R.; Abraham, G. A. *Nanomaterials* **2019**, *9* (1), 120.
- (38) Rahali, K.; Ben Messaoud, G.; Kahn, C.; Sanchez-Gonzalez, L.; Kaci, M.; Cleymand, F.; Fleutot, S.; Linder, M.; Desobry, S.; Arab-Tehrany, E. Synthesis and Characterization of Nanofunctionalized Gelatin Methacrylate Hydrogels. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (12), 2675.
- (39) Ponce Márquez, S.; Martínez, V. S.; McIntosh Ambrose, W.; Wang, J.; Gantzegui, N. G.; Schein, O.; Elisseeff, J. Decellularization of Bovine Corneas for Tissue Engineering Applications. *Acta Biomater.* **2009**, *5* (6), 1839–1847.
- (40) He, Z.; Forest, F.; Bernard, A.; Gauthier, A. S.; Montard, R.; Peoc'h, M.; Jumelle, C.; Courrier, E.; Perrache, C.; Gain, P.; Thuret, G. Cutting and Decellularization of Multiple Corneal Stromal Lamellae for the Bioengineering of Endothelial Grafts. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2016**, *57* (15), 6639–6651.
- (41) Crapo, P. M.; Gilbert, T. W.; Badylak, S. F. An Overview of Tissue and Whole Organ Decellularization Processes. *Biomaterials* **2011**, *32* (12), 3233–3243.
- (42) Faulk, D. M.; Badylak, S. F. Natural Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Regen. Med. Appl. Organ Transplant.* **2014**, 101–112.
- (43) Siddiqi, N. J.; Alhomida, A. S. Hydroxyproline Concentrations in Ocular Tissues of Arabian Camel (*Camelus Dromedarius* Linn.). *Indian J. Biochem. Biophys.* **2003**, *40* (6), 451–454.
- (44) Edwards, C. A.; O'Brien, W. D. Modified Assay for Determination of Hydroxyproline in a Tissue Hydrolyzate. *Clin. Chim. Acta* **1980**, *104* (2), 161–167.
- (45) Du, L.; Wu, X. Development and Characterization of a Full-Thickness Acellular Porcine Cornea Matrix for Tissue Engineering. *Artif. Organs* **2011**, *35* (7), 691–705.
- (46) Chang, S.-H.; Mohammadvali, A.; Chen, K.-J.; Ji, Y.-R.; Young, T.-H.; Wang, T.-J.; Willoughby, C. E.; Hamill, K. J.; Elsheikh, A. The Relationship Between Mechanical Properties, Ultrastructural Changes, and Intrafibrillar Bond Formation in Corneal UVA/Riboflavin Cross-Linking Treatment for Keratoconus. *J. Refract. Surg.* **2018**, *34* (4), 264–272.
- (47) White, T. L.; Lewis, P. N.; Young, R. D.; Kitazawa, K.; Inatomi, T.; Kinoshita, S.; Meek, K. M. Elastic Microfibril Distribution in the Cornea: Differences between Normal and Keratoconic Stroma. *Exp. Eye Res.* **2017**, *159*, 40–48.
- (48) Hashimoto, Y.; Funamoto, S.; Sasaki, S.; Honda, T.; Hattori, S.; Nam, K.; Kimura, T.; Mochizuki, M.; Fujisato, T.; Kobayashi, H.; Kishida, A. Preparation and Characterization of Decellularized Cornea Using High-Hydrostatic Pressurization for Corneal Tissue Engineering. *Biomaterials* **2010**, *31* (14), 3941–3948.
- (49) Yue, K.; Trujillo-de Santiago, G.; Alvarez, M. M.; Tamayol, A.; Annabi, N.; Khademhosseini, A. Synthesis, Properties, and Biomedical Applications of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels. *Biomaterials* **2015**, *73*, 254–271.
- (50) Mallet, J. D.; Rochette, P. J. Wavelength-Dependent Ultraviolet Induction of Cyclobutane Pyrimidine Dimers in the Human Cornea. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12* (8), 1310–1318.
- (51) Garcia-Porta, N.; Fernandes, P.; Queiros, A.; Salgado-Borges, J.; Parafita-Mato, M.; González-Méjome, J. M. Corneal Biomechanical Properties in Different Ocular Conditions and New Measurement Techniques. *ISRN Ophthalmol.* **2014**, *2014*, 1–19.
- (52) Oudshoorn, M. H. M.; Rissmann, R.; Bouwstra, J. A.; Hennink, W. E. Synthesis of Methacrylated Hyaluronic Acid with Tailored Degree of Substitution. *Polymer* **2007**, *48* (7), 1915–1920.
- (53) Zhao, X.; Lang, Q.; Yildirim, L.; Lin, Z. Y.; Cui, W.; Annabi, N.; Ng, K. W.; Dokmeci, M. R.; Ghaemmaghami, A. M.; Khademhosseini, A. Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering. *Adv. Healthcare Mater.* **2016**, *5* (1), 108–118.
- (54) Ojeda, J. L.; Ventosa, J. A.; Piedra, S. The Three-Dimensional Microanatomy of the Rabbit and Human Cornea. A Chemical and Mechanical Microdissection-SEM Approach. *J. Anat.* **2001**, *199* (5), 567–576.
- (55) Poole, C. A.; Brookes, N. H.; Clover, G. M. Confocal Imaging of the Human Keratocyte Network Using the Vital Dye 5-Chloromethylfluorescein Diacetate. *Clin. Exp. Ophthalmol.* **2003**, *31* (2), 147–154.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Merve UYANIKLAR

ARAŞTIRMA KONULARI:

- Rekombinant enzim üretimi ve karakterizasyon teknikleri
- Doku mühendisliği uygulamalarına yönelik polimerik biyomalzemelerin sentezi ve karakterizasyonu
- Laparoskopik Apendektomi için biyomateryallerin geliştirilmesi
- Biyomalzemelerin çeşitli hücreler ile kombine edilerek in vitro ve in vivo ortamlarda etkinliklerinin araştırılması
- GelMA polimerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

YABANCI DİL DÜZEYİ

İleri derece İngilizce

DENEYİM ALANLARI

- Kornea doku mühendisliği
- Hidrojellerin üretimi ve karakterizasyonu
- GelMA polimerinin Üretimi ve Karakterizasyonu
- Deselülerizasyon
- Rekombinant enzim üretimi ve karakterizasyonu
- Moleküler Hastalıkların Tanısı
- Moleküler ve Genetik Analizler
- Apandisit Ameliyatı için Biyobozunur Kelepçe ve Uygulama Aparatının Üretimi

Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçeler

1.Hacettepe BAP Koordinasyon Birimi, FBB-2018-16688 numaralı Bilimsel Başarı Desteği.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

1. Uyanıklar, M., et al., Hybrid Cornea: Cell Laden Hydrogel Incorporated Decellularized Matrix. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2020. 6(1): p. 122-133