SİNİR KONDÜİTİ OLARAK METAKRİLATLANMIŞ JELATİN MODİFİYE HÜCRESİZLEŞTİRİLMİŞ KOYUN İNCE BAĞIRSAK SUBMUKOZASININ GELİŞTİRİLMESİ

THE DEVELOPMENT OF METHACRYLATED GELATIN MODIFIED DECELLULARIZED SHEEP SMALL INTESTINAL SUBMUCOSA AS A NERVE CONDUIT

ZEYNEP ÇAĞLAR

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.

2023

ÖZET

SİNİR KONDÜİTİ OLARAK METAKRİLATLANMIŞ JELATİN MODİFİYE HÜCRESİZLEŞTİRİLMİŞ KOYUN İNCE BAĞIRSAK SUBMUKOZASININ GELİŞTİRİLMESİ

Zeynep ÇAĞLAR

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

Nisan 2023, 95 sayfa

Periferal sinir hasarı travmatik yaralanmalar sonucu yaygın olarak görülmektedir. Periferik sinir sisteminin karmaşık yapısının rejenerasyonunun yavaş olması hasar sonrası fonksiyon geri kazanımını yüksek oranda etkilemektedir. Bu kapsamda sinir doku mühendisliği çalışmaları önem arz etmektedir.

Tez kapsamında periferik sinir hasarı rejenerasyonuna yönelik koyun ince bağırsak submukozasının (SIS) metakrilatlanmış jelatin (GelMA) ile hibrit doku iskeleleri tasarlanmıştır. Öncelikli olarak çalışma kapsamında SIS deselülerizasyonu iki farklı metotla gerçekleştirilmiştir. Birincil metot olarak fiziksel, kimyasal ve enzimatik uygulamaların kombinasyonu olan konvansiyonel bir metot kullanılmış olup süperkritik karbon dioksit ($scCO_2$) teknolojisinin SIS deselülerizasyonuna yönelik özgün protokolünün geliştirilmesinde kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Konvansiyonel

yöntem ile deselülerizasyon sonrası %91,13 genomik DNA azalması gerçekleştirilmiştir. $ScCO_2$ deselülerizasyonunda ise %92,77 genomik DNA azalması gerçekleştirilerek optimum metot belirlenmiştir. Uygulanan metotlar H&E ve DAPI histolojik boyamaları kullanılarak karşılaştırılmış olup hem hücresizleştirmenin gerçekleştiği hem de hücresizleştirme yöntemlerinin ECM üzerindeki etkileri kalitatif olarak incelenmiştir. GAG miktar tayini çalışmalarında konvansiyonel metot uygulanan grupta %75,47 azalma gerçekleşmiş olup $scCO_2$ grubunda GAG miktarında azalma gözlemlenmemiştir. Bu bağlamda $scCO_2$ teknolojisinin SIS hücresizleştirme uygulamalarında etkili ve veriminin yüksek bir metot olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmalar sonrası deselülerizasyon tekniklerinin morfolojik ve mekanik özelliklere etkisi taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve çekme testi ile karakterize edilmiştir.

Tez çalışmasının ikinci kısmında hibrit membran eldesine yönelik GelMA pre-polimeri sentezlenmiş, hidrojel parametreleri optimize edilmiştir. Jelatin farklı oranlarda metakrilik anhidrit (MA) ile fonksiyonelleştirilerek ideal modifikasyon derecesi (MD) ^{1}H-NMR ile belirlenmiştir. Bu kapsamda %75,76 MD gerçekleşmiş olan grup hidrojel sentezi için seçilmiştir. Devamında I2959 foto-başlatıcı kullanılarak farklı konsantrasyonlarda GelMA içeren pre-jel solüsyonlarının *in situ* çapraz bağlanması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hidrojeller FT-IR, şişme ve mekanik analizler ile karakterize edilmiştir. Hidrojellerde gelMA konsantrasyonunun arttırılmasının mekanik dayanımı arttırdığı gösterilmiştir.

Çalışmanın üçüncü bölümünde GelMA çözeltileri SIS ile inkübe edilip I2959 foto-başlatıcı kullanılarak UV ışık altında çapraz bağlanmıştır. FT-IR ve SEM analizleri ile hibrit doku iskelesi eldesi kanıtlanmış olup yapısal değişiklikler incelenmiştir. Su tutma kapasiteleri, degradasyon özellikleri, mekanik dayanımları ve yüzey ıslatılabilirlikleri incelenerek aselüler SIS ve GelMA hidrojelleri ile karşılaştırılmıştır. Son olarak elde edilen hibrit membranların nöral hücreler ile etkileşimleri hücre canlılığı, proliferasyonu ve morfolojik değişimleri açısından *in vitro* kültür çalışması ile karakterize edilerek SIS/GelMA hibrit membranlarının nöral hücre proliferasyonunu indüklediği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: GelMA, Deselülerizasyon, SIS, Membran, Süperkritik Akışkan

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF METHACRYLATED GELATIN MODIFIED DECELLULARIZED SHEEP SMALL INTESTINAL SUBMUCOSA AS A NERVE CONDUIT

Zeynep ÇAĞLAR

Master of Science, Division of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

April 2023, 95 pages

Peripheral nerve damage is a common injury because of trauma. The slow regeneration of the complicated structure of the peripheral nervous system highly affects the regainment of function. Hence nerve tissue engineering studies regarding peripheral nerve injury have importance.

GelMA-modified decellularized SIS hybrid scaffolds have been designed for peripheral nerve injury. The first part of the thesis is about the decellularization of sheep SIS by two methods. A conventional method involving the combinations of physical, chemical, and enzymatic applications, which is also used as a control group to develop an original $scCO_2$ technology for SIS decellularization. The genomic DNA decrement was %91,13 after conventional method decellularization. The optimum method for $scCO_2$ decellularization was decided with the genomic DNA decrease of %92,77. Both protocols were

characterized and compared by H&E and DAPI histological stainings to investigate the qualitative effect of the used protocols and to assess the ECM after decellularization. GAG amount assay showed a %75,47 decrease in the conventional method decellularization group whereas no decrement was observed in the $scCO_2$ decellularization group. In this regard, it was shown that the $scCO_2$ technology was an efficient and high-yielding method for the decellularization of SIS. SEM and tensile testing were used to assess the morphologic and mechanical effects of the decellularization methods.

The synthesis of GelMA prepolymer is conducted in the second part of the study which is followed by the optimization of hydrogel synthesis parameters. Gelatin is modified with varying ratios of MA and the ideal MD was determined by ^{1}H-NMR. The pre-polymer group with %75,76 MD was used for hydrogel synthesis. Then the *in situ* crosslinking of GelMA pre-gels with varying GelMA concentrations was carried out by photo-initiator I2959 under UV irradiation. The obtained hydrogels are characterized by FT-IR, swelling, and mechanical analyses. The direct proportion between the increasing gelMA concentration and mechanical strength was shown.

In the third part of the study SIS was incubated with GelMA solutions for UV crosslinking using I2959 photo-initiator. FT-IR and SEM were used as a means to prove the success of hybrid tissue scaffold synthesis as well as to investigate structural changes. The water retention capacity, degradation properties, surface wettability and mechanical strength of the hybrid scaffolds were investigated and compared with the GelMA hydrogels and acelluar SIS. Lastly the ability of hybrid membranes to induce neural cell adhesion and proliferation is proved via *in vitro* cell cultre of PC12 cell line in terms of cell viability, proliferation and morphological changes.

Keywords: GelMA, Decellularization, SIS, Membrane, Supercritical Fluid

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürem boyunca bilgi ve deneyimi ile bana her zaman yol gösteren, özveri ile beni destekleyen ve bana yardımcı olan; bilimsel çalışmalarımda beni cesaretlendiren, bana güvenen ve yeni bakış açıları geliştirmemi sağlayan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Halil Murat AYDIN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Cem BAYRAM ve Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında çalışmalarımı destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışması süresince Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FHD-2021-19659) tarafından sağlanan destek için teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreç boyunca her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen canım annem Hatice ŞAFAK'a, kız kardeşlerim Betül ÇAĞLAR, Elif ARSLAN ve Devrim SINGIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

3 yıllık eğitimim boyunca bana destek olan, yardımlarını eksik etmeyen, beni yalnız bırakmayan ve çalışma ortamımızı neşelendiren laboratuvar çalışma arkadaşlarım Gülçin Günal KARATAŞ'a, Gizem ZİHNA'ya, Ahsen SEYREK'e, Selcen GÜLER'e, Tuğçe Çalışkan IŞIK'a ve Orhan Gökalp BÜYÜKUYSAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Arkadaşlıkları ile zorlu zamanlarımda yanımda olan ve beni her zaman motive eden tüm dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep ÇAĞLAR

Nisan 2023, ANKARA

İÇİNDEKİLER

ÖZET i

ABSTRACT iv

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ŞEKİLLER DİZİNİ xi

ÇİZELGELER DİZİNİ xiv

SİMGELER VE KISALTMALAR xv

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. İnsan Sinir Sistemi 3

2.1.1. Periferal Sinir Sistemi 3

2.1.2. Periferal Sinir Hasarı ve Tedavi Yöntemleri 4

2.2. Sinir Doku Mühendisliği Uygulamaları 9

2.2.1. Polimerik Doku İskeleleri 9

2.2.1.1. GelMA 12

2.2.2. Deselülerize Doku İskeleleri 13

2.2.2.1. SIS 16

2.2.3. Hibrit Doku İskeleleri 17

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 18

3.1. Deselülerize Koyun İnce Bağırsak Submukozasının (SIS) Hazırlanması 18

3.1.1. Kimyasal Malzemeler 18

3.1.2. SIS Diseksiyonu 18

3.1.3. SIS Kimyasal Deselülerizasyon Protokolü 19

3.1.4. SIS Süperkritik CO_2 Deselülerizasyon Protokolü Optimizasyonu 21

3.1.5. Deselülerize SIS Karakterizasyonu 23

3.1.5.1. Histolojik Analizler 23

3.1.5.1.1. Hematoksilen & Eozin (H&E) Boyama 24
3.1.5.1.2. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) Boyama 24
3.1.5.2. Biyokimyasal Analizler 25
3.1.5.2.1. Kantitatif Genomik DNA Tayini 25
3.1.5.2.2. Kantitatif Glikozaminoglikan (GAG) Tayini 25
3.1.5.3. Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Analizi 26
3.1.5.4. Mekanik Analiz 26
3.1.5.5. Yaş ve Kuru Ağırlık Değişimi 26
3.1.5.6. *In Vitro* Sitotoksisite Analizi 27
3.2. Metakrilatlanmış Jelatin (GelMA) Prepolimer Sentezi ve GelMA Hidrojeli Eldesi 27
3.2.1. Kimyasal Malzemeler 28
3.2.2. GelMA Prepolimer Sentezi ve Karakterizasyonu 28
3.2.2.1. Proton Nükleer Manyetik Rezonans (^{1}H-NMR) Analizi 29
3.2.2.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi 29
3.2.3. GelMA Hidrojeli Eldesi ve Karakterizasyonu 29
3.2.3.1. Reoloji Analizi 30
3.3. Hibrit Membran Eldesi 31
3.3.1. Hibrit Membran Karakterizasyonu 31
3.3.1.1 FT-IR Analizi 31
3.3.1.2. Şişme Testi 31
3.3.1.3. Mekanik Analiz 32
3.3.1.4. SEM Analizi 32
3.3.1.5 Degradasyon Testi 32
3.3.1.6. Temas Açısı Analizi 33
3.4. *In Vitro* Çalışmalar 33
3.4.1. Kimyasal Malzemeler 33
3.4.2. PC12 Hücre Kültürü 33
3.4.2.1. Hücre Metabolik Aktivite ve Sitotoksisite Analizi 34
3.4.2.2. SEM Analizi 34
3.4.2.3. Hücre Yayılma Alanı Analizi 35
3.5. İstatistiksel Analiz 35
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 36

4.1. Deselülerize İnce Bağırsak Submukoza Eldesi 36
4.1.1. SIS Kimyasal Deselülerizasyon Protokolü ve Karakterizasyonları 36
4.1.2. SIS Süperkritik CO_2 Deselülerizasyon Protokolü ve Karakterizasyonları ... 41
4.1.3. SIS Deselülerizasyon Metotlarının Karşılaştırılması 48
4.1.3.1. SEM Karakterizasyonu 49
4.1.3.2. Mekanik Analiz 50
4.1.3.3. Yaş ve Kuru Ağırlık Değişimi Analizi 50
4.1.3.4. *In Vitro* Sitotoksisite Analizi 52
4.2. GelMA Sentezi ve Hidrojeli Eldesi 53
4.2.1. GelMA Prepolimer Karakterizasyonu 53
4.2.2. GelMA Hidrojel Karakterizasyonu 56
4.2.2.1. Şişme Testi 57
4.2.2.2. Reoloji Analizi 58
4.2.2.3. FT-IR Analizi 60
4.2.2.4. SEM Analizi 61
4.3. Hibrit Membran Eldesi ve Karakterizasyonu 62
4.3.1. FT-IR Analizi 62
4.3.2. Şişme Testi 64
4.3.3.Mekanik Analiz 65
4.3.4. SEM Analizi 66
4.3.5. Degradasyon Testi 68
4.3.6. Temas Açısı Analizi 69
4.4. *In vivo* Hücre Kültürü 71
4.4.1. Hücre Metabolik Aktivite ve Sitotoksisite Analizi 71
4.4.2. SEM Analizi 72
4.4.3. Hücre Yayılma Analizi 75
5. YORUM 77
6. KAYNAKLAR 79
EKLER 94
EK 1 – KALİBRASYON GRAFİKLERİ 94
ÖZGEÇMİŞ 95

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Periferal sinir anatomik yapısı [6] 4

Şekil 2.2. Sinir hasarı oluşumu ve rejenerasyon mekanizması [11]. 5

Şekil 2.3. GelMA Doku Mühendisliği Uygulamaları [63]. Belirtilen kaynaktan uyarlanmıştır. 13

Şekil 3.1. SIS Diseksiyonu. (A) Enine kesilmiş ince bağırsak, (B) Disekte edilmiş işlem görmemiş SIS. 19

Şekil 4.1. Doğal ve Aselüler SIS. (A) İşlem Görmemiş SIS (B) SDS Muamele SIS (C) $ScCO_2$ Mumele SIS 36

Şekil 4.2. İşlem görmemiş SIS ve deselülerize grupların H&E boyama sonuçları. (A) Kontrol grubu, (B) D1 Grubu, (C) D2 Grubu, (D) D3 Grubu (20X). 37

Şekil 4.3. İşlem görmemiş SIS ve deselülerize grupların DAPI boyama sonuçları. (A) Kontrol grubu, (B) D1 Grubu, (C) D2 Grubu, (D) D3 Grubu (20X). 38

Şekil 4.4. İşlem görmemiş SIS ve deselülerize grupların genomik DNA miktar analizi histogramı. **** $P < 0.0001$. 39

Şekil 4.5. İşlem görmemiş SIS ve deselülerize grupların GAG miktar analizi histogramı. **** $P < 0.0001$. 40

Şekil 4.6 İşlem görmemiş SIS ve scCO2 deselülerize grupların H&E analizi. (A) Kontrol Grubu. (B) SCSIS-1 Grubu. (C) SCSIS-2 Grubu. (D) SCSIS-3 Grubu. (E) SCSIS-4 Grubu (F) SCSIS-5 Grubu (G) SCSIS-6 grubu. Görüntülemeler 20x büyütmede alınmıştır. 42

Şekil 4.7. Doğal SIS ve SCSIS gruplarının DAPI boyama görüntüleri. (A) Kontrol Grubu. (B) SCSIS-1 Grubu. (C) SCSIS-2 Grubu. (D) SCSIS-3 Grubu. (E) SCSIS-4 Grubu (F) SCSIS-5 Grubu (G) SCSIS-6 Grubu. 44

Şekil 4.8. Kontrol grubu ve $scCO_2$ grupları DNA miktar histogramı. **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$. 45

Şekil 4.9. Kontrol grubu ve scCO2 gruplarının GAG miktarları. *** P < 0.001, ** P < 0.01. 47

Şekil 4.10: Kontrol ve deselülerize örneklerin SEM görüntüleri. A1) Kontrol grubu 100X büyütme, A2) Kontrol grubu 500X büyütme, B1) D3 grubu 500X büyütme, B2) D3 grubu 1000X büyütme, C1) SCSIS-6 grubu 500X büyütme, C2) SCSIS-6 grubu 1000X büyütme..... 49

Şekil 4.11. Kontrol Grubu ve Deselülerize Grupların Yaş ve Kuru Ağırlık Değişimleri. (** P < 0,01, *** P < 0,001). 51

Şekil 4.12. Deselülerize Grupların % Canlılık Analizi. **** P < 0,0001 52

Şekil 4.13. Jelatin ve GelMA Prepolimer Grupları ^{1}H-NMR Spektrumu. 54

Şekil 4.14. Jelatin ve GelMA Pre-polimer FT-IR Spektrumu 55

Sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek MD oranı gözlemlenen G1 grubu hidrojel sentezi için seçilmiştir. 56

Şekil 4.15. Liyofilize GelMA hidrojeli. (A) J10 Grubu (B) J15 Grubu 57

Şekil 4.16. J10 ve J15 Hidrojellerinin Şişme Oranı. * P <0,05. 57

Şekil 4.17. Hidrojel Reoloji Sonuç Grafikleri. (A) J10 Grubu (B) J15 Grubu. 59

Şekil 4.18. GelMA Prepolimer ve GelMA Hidrojelleri FT-IR Spektrumları. (A) G1 GelMA Prepolimer (B) J10 Grubu (C) J15 Grubu. 60

Şekil 4.19. GelMA Hidrojelleri SEM Görüntüleri. (A) J10 Grubu (B) J15 Grubu. 61

Şekil 4.20. Hibrit Membranlar. (A) H1 Grubu (B) H2 Grubu..... 62

Şekil 4.21. Hibrit Membran FT-IR Spektrumları. (A) SCSIS-6 Grubu (B) H1 Grubu (C) H2 Grubu. 63

Şekil 4.22. Hibrit Membran Şişme Testi Sonuçları. 64

Şekil 4.23. Hibrit Membran SEM Görüntüleri. (A1) J10 Kesit Alanı (A2) H1 Kesit Alanı (A3) SCSIS-6 Kesit Alanı (B1) J15 Kesit Alanı (B2) H2 Kesit Alanı (B3) SCSIS-6 Kesit Alanı (C1) J10 Yüzeyi (C2) H1 Yüzeyi (C3) SCSIS-6 Yüzeyi (D1) J15 Yüzeyi (D2) H2 Yüzeyi (D3) SCSIS-6 Yüzeyi. 67

Şekil 4.24. Doğal Doku, Aselüler SIS, GelMA ve Hibrit Hidrojellerin *In Vitro* Enzimatik Bozunmaya Bağlı % Kütle Kaybı. 68

Şekil 4.25 Temas Açısı Analizi. (A) H1 Grubu, (B) H2 Grubu (C) J15 Grubu. Tüm görüntüler soldan sırasıyla 1.s, 3.s, 6.s ve 10.s anlarına aittir. 70

Şekil 4.26. SCSIS-6, J10, J15, H1 ve H2 Gruplarının Proliferasyon Analizi. 71

Şekil 4.27. PC12 Hücre Kültürünün 1., 4. ve 7. Günlerinde Elde Edilen SEM Görüntüleri. (A1 - A2 – A3) 1., 4. ve 7. günler SCSIS-6 Grubu (B1 - B2 – B3) 1., 4. ve 7. günler J10 Grubu, (C1 – C2 – C3) 1., 4. ve 7. günler J15 Grubu, (D1 – D2 – D3) 1., 4. ve 7. günler H1 Grubu ve (E1- E2 – E3) 1., 4. ve 7. günler H2 Grubu. 74

Şekil 4.28. Kültürün 1. ve 7. Günlerinde Alınan DAPI-Phalloidin 594 Boyama Sonuçları. (A1- A2) SCSIS-6 Grubu (B1 – B2) J10 Grubu (C1- C2) J15 Grubu (D1 – D2) H1 Grubu (E1-E2) H2 Grubu. 75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. PSS Yaralanmalarında Kullanılan Kondüit ve Allogreftlar [18]..... 7

Çizelge 3.1. SIS Kimyasal Deselülerizasyon Grupları. 20

Çizelge 3.2. Süperkritik CO_2 ile Deselülerizasyon Optimizasyon Grupları. 22

Çizelge 3.3. GelMA Prepolimer Sentezi. 29

Çizelge 3.4. GelMA Hidrojel Sentez Parametreleri. 30

Çizelge 3.5. SIS/GelMA Hibrit Membran Grupları. 31

Çizelge 4.1. Kontrol Grubu ve Deselülerize Grupların Genomik DNA miktarı ve Azalma Yüzdeleri. 46

Çizelge 4.2. Kontrol Grubu ve SCSIS Grupları GAG Miktarı ve Azalma Yüzdeleri. ... 48

Çizelge 4.3. İşlem Görmemiş ve Deselülerize Grupların Çekme Dayanımı (kPa), % Uzaması ve Elastik Modülü (kPa). 50

Çizelge 4.4. GelMA Prepolimer Fonksiyonelleşme Derecesi. 55

Çizelge 4.5. J10 ve J15 Hidrojelleri Reolojik Ölçüm Sonuçları (*** P <0,001)..... 58

Çizelge 4.6 Hibrit Membran Çekme Testi Sonuçları. (*** P < 0,001 , **** P < 0,0001) 65

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

DI	Deiyonize Su
MD	Modifikasyon Derecesi
M	Molarite

Kısaltmalar

AA	Antibiyotik – Antimikotik 100x Solüsyonu
BSA	Bovin Serum Albumin
DAPI	4’,-6-diamino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit Disodyum Dihidrat
EtOH	Etanol
DMMB	1,9-Dimetil Metilen Mavisi
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNAaz	Deoksiribonükleaz
ECM	Ekstraselüler Matriks
FBS	Fetal Sığır Serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GAG	Glikozaminoglikan

GelMA	Metakrilatlanmış Jelatin
HA	Hyaluronik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
HMDS	Hekzametil Disilazan
HNMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
H&E	Hematoksilen & Eozin
I2959	2-Hydroxy-4’-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone
MA	Metakrilik Anhidrit
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NaCl	Sodyum Klorür
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PCL	Poli kaprolakton
PGS	Poligliserol Sebakat
PLCL	Poli (laktik-ko-kaprolakton)
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PPY	Polipirol
$scCO_2$	Süperkritik Karbondioksit
SC	Schwann Hücreleri
SIS	İnce Bağırsak Submukozası
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

1. GİRİŞ

Periferal sinir yaralanması dünya geneli motorlu araç kazaları, iyatrojenik hasar, dejeneratif hastalık ve kimyasal veya iskemik hasar sonucu gibi sebeplerden dolayı yaygın olarak görülmekle birlikte hasarlı bölgede duyusal ve motor fonksiyonların azalmasına sebep olmaktadır. Değişen hasar seviyesi ve hasar seviyesinin tespitinin karmaşıklığı periferal sinir yaralanması tedavisini komplike bir hale getirmekle birlikte kişinin hayat kalitesini düşürmektedir.

Periferal Sinir Sistemi (PSS) hasarında klinikte uygulanan tedaviler arasında sentetik kondüitler, allogreftler ve otogreftler bulunmaktadır. Ayrıca PSS'nin kompleks yapısı, sinir hasarında rejenerasyonun yetersiz olması ve fonksiyon geri kazanımının düşük olması sinir doku mühendisliği kapsamında çözüme yönelik yapılan araştırmaları ön plana çıkartmaktadır.

Doku mühendisliği kapsamında periferik sinir hasarına yönelik üretilen doku iskeleleri, kondüitler ve allogreftler hasarın onarımı ve fonksiyon geri kazanımı oranının yükselmesini sağlamak adına literatüre katkı sağlamaktadır. Buna ek olarak hasar onarımına yönelik biyomalzeme üretimi de önem arz etmektedir. Bu sebeple hasarlı bölgenin rejenerasyonunu hızlandıracak mikro-çevrenin sağlanması, bölgeye Schwann hücre (SC) göçünün arttırılması, aksonal büyümenin yönlendirilmesi ve hücrelerin tutunmasını sağlayacak matrislerin üretilmesi önem arz etmektedir. Bu bağlamda deselülerize doku birçok avantaja sahiptir.

Deselülerizasyon tekniği ile dokunun ekstraselüler matriksinin (ECM) minimum hasar alması hedeflenerek, allojenik veya zenojenik hücrelerin uzaklaştırılması sağlanarak, dokunun tedaviye yönelik kullanımını sağlanmaktadır. Aselüler doku iskeleleri sinir hasarına yönelik biyomalzeme üretiminde hücresel mikro-çevrenin daha iyi taklit edilmesini sağlayarak hasarlı bölgede hem rejenerasyonun hem de hücre tutunmasının, göçünün ve proliferasyonunun indüklenmesini sağlamaktadır. Bu sebeple tez kapsamında koyun ince bağırsak submukozası (SIS) kullanılarak sinir hasarına yönelik biyomalzeme

geliştirilmiştir. Bu kapsamda hücresizleştirme için sıklıkla tercih edilen kimyasal, fiziksel ve enzimatik aşamalardan oluşan konvansiyonel bir yöntem ile aselüler SIS eldesi amaçlanmıştır. Buna ek olarak ilk defa tez kapsamında SIS'in süperkritik akışkan teknolojisi ile hücresizleştirilmesi yapılarak süreç parametreleri optimizasyonu gerçekleştirilerek kullanılan metotların karşılaştırılması yapılmıştır.

Deselülerizasyon ile elde edilen matriste mekanik özelliklerde azalma meydana gelmektedir. Bu sebeple elde edilen aselüler SIS membranları biyouyumlu metakrilatlanmış jelatin (GelMA) ile modifiye edilerek hem mekanik özelliklerin geliştirilmesi hem de hücresel aktivitenin artırılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda öncelikli olarak GelMA pre-polimer eldesi gerçekleştirilmiştir. Devamında GelMA hidrojeli sentez parametreleri optimizasyonu sonrası hibritleme çalışmalarında kullanılacak pre-jel konsantrasyonları belirlenip hibrit membran eldesi için SIS ve GelMA entegrasyonu gerçekleştirilmiştir.

Son olarak elde edilen hibrit membranların sinir hücreleri ile etkileşimlerinin değerlendirilebilmesi için PC12 hücre hattı kullanılarak *in vitro* hücre kültür çalışmaları yapılmıştır. Hücre metabolik aktivite ve sitotoksisite analizi, hücre canlılık analizi ve hücre yayılma alanı analizleri ile doku iskelesinin hücreler üzerindeki etkileri hücre proliferasyonu, canlılığı ve morfolojik değişimler açısından incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

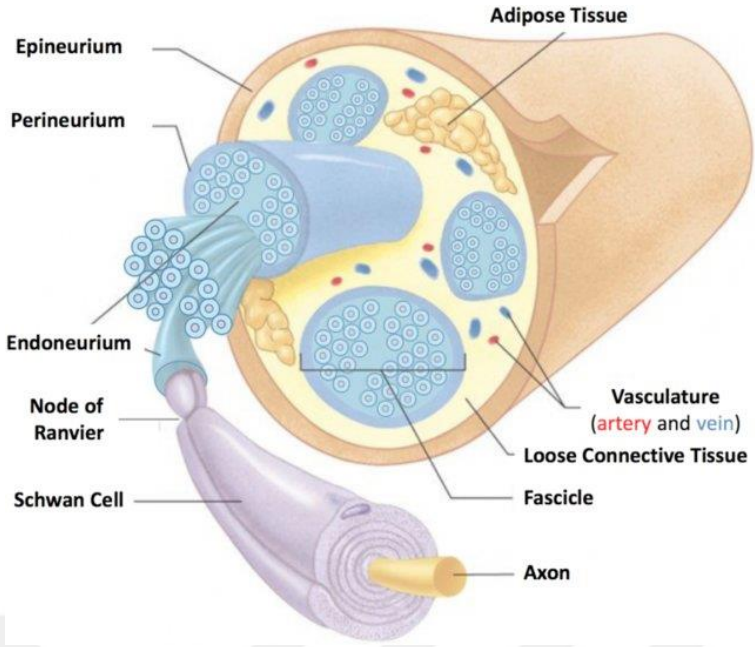
2.1. İnsan Sinir Sistemi

Sinir sistemi, insan vücudunda bulunan organ sistemlerini ve insan vücudunun istemli ve istemsiz eylemlerini elektriksel sinyalleme yolu ile koordine eden ve çevresiyle etkileşim kurmasını sağlayan insan vücudunu sarmalayan bir ağ olarak tanımlanmaktadır. Nöron olarak isimlendirilen sinir hücrelerini kullanarak insanın çevre ile etkileşimini ve vücut içi sistemlerinin kontrolünü sinaptik etkileşimler ile gerçekleştirmektedir [1]. Nöronların işlevine yardımcı bir diğer önemli sinir sistemi hücresi ise sinir sistemi destek bağ dokusunu oluşturan glia hücreleridir. Elektriksel sinyallemede görevi olmayan glia hücreleri nöronlara yapısal ve kimyasal destek sağlayarak nöral gelişim için iskele görevi görmekle beraber sinir sinyali iletim hızını, sinir hücrelerinin iyonik düzenlemesini ve nörotransmitter alımı ile sinaptik davranışın düzenlenmesini sağlamaktadır [2].

Sinir sistemi anatomik olarak merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferal sinir sistemi (PSS) olmak üzere iki grupta incelenmektedir [3]. Beyin ve omurilikten oluşan MSS tüm vücudu periferal sinir sistemini oluşturan somatik ve otonom sinir sistemleri ile kontrol etmektedir [4].

2.1.1. Periferal Sinir Sistemi

Temel olarak nöronal, gliyal ve stromal hücre tiplerini bulunduran periferal sinir sistemi, uyaran sonucu oluşan sinyali MSS'ye ve MSS'den oluşan yanıtın efektör organa ulaşımını sağlayan çift yönlü iletişim ağı oluşturan bir sistemdir [5]. PSS de nöronal ağ, MSS nöronlarından gelen uyarıları alan efferent (motor ve otonom) nöronlar ve kas, tendon gibi özelleşmiş hücrelerden gelen uyaranı MSS'ye ileten afferent (duyusal) nöronların kombinasyonlarından oluşmaktadır. Şekil 2.1 periferik sinir anatomik yapısını göstermektedir.

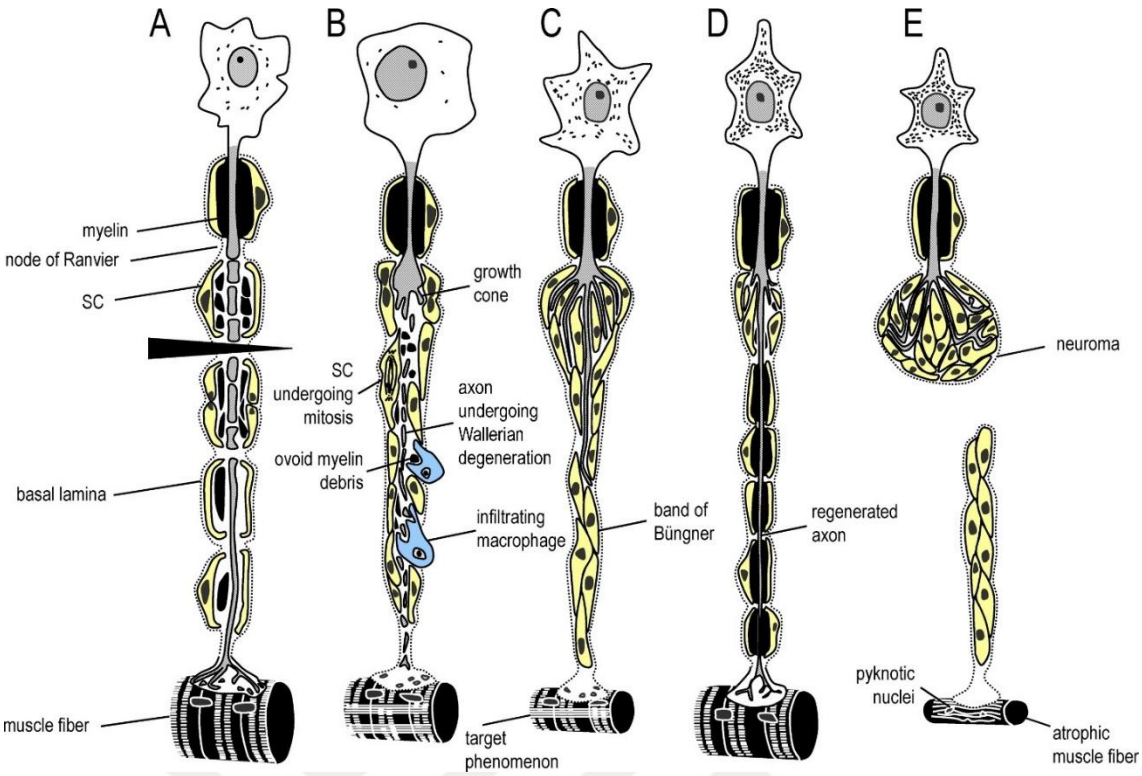


Şekil 2.1. Periferal sinir anatomik yapısı [6]

Periferal sinir gövdesi en dışta epinöryum bağ dokusu ile sarmalanmıştır. Epinöryum içerisinde gevşek bağ dokusu ile desteklenen sinir iplik demetleri bulunmaktadır. Sinir iplik demetleri kolajen fibrillerinden oluşan perinöryum ile desteklenerek bir arada tutulmaktadır. Her bir sinir ipliği yapısında gevşek bağ doku endonöryum ile çevrelenerek desteklenmektedir. Her bir sinir ipliği ise MSS'den gelen veya MSS'ye gönderilen uyaran iletimini sağlayan aksonları ve aksonları çevreleyen SC'lerden oluşmaktadır. Kan damarları sinir hücresinin canlılığının ve fonksiyonlarının desteklenmesini ve beslenmesini sağlamaktadır (Şekil 2.1) [7].

2.1.2. Periferal Sinir Hasarı ve Tedavi Yöntemleri

Periferal sinir hasarı, periferik organlardan merkezi sinir sistemine uzanan karmaşık geri bildirim ağında oluşan bozulma sonucu ortaya çıkmakla birlikte dünya geneli yaygın olarak görülmektedir [8]. Kas atrofisi, uzuv hissizliği ve nörolojik fonksiyon kaybına sebebiyet vermekle birlikte Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre her yıl 10-15 milyon travma vakası raporlanmaktadır ve bunların %15-40 periferal sinir hasarı vakalarından oluşmaktadır. Avrupa'da ortalama 300000 ve Çin'de ise 600000-900000 periferal sinir hasarı yaralanmaları raporlanmaktadır [9, 10].



Şekil 2.2. Sinir hasarı oluşumu ve rejenerasyon mekanizması [11].

Hasar görmemiş sinir hücresi endonöryumu aksonlar, miyelinli ve miyelinsiz SC ve inaktif makrofajlardan oluşur. (A) Sinir hasarından kısa bir süre sonra sinir ağından kopmuş miyelinleştirici SC miyelin kılıf atılımı yapar. (B) Prolifere olmuş SC sitokin salgılayarak miyelin kılıf atığını fagositoza uğratırlar. Aksotomi sonrası nöronal hücre gövdesinde aksonal dallanma meydana gelir. (C) Hasar bölgesini geçen aksonal büyüme endonöral tüplere yeniden girerek Büngner bantlarında distal sinir boyunca uzamaya devam ederek hedef organ ya da dokuda atrofiye sebebiyet verir. (D) SC – akson etkileşiminin oluşması ile başarılı akson rejenerasyonu, nörotransmisyonun kurulması ve atrofinin tersine dönmesi gerçekleşir. (E) Aksonal büyümenin hasar bölgesini geçememesi durumunda nöroma oluşumu meydana gelir [11].

Periferal sinir hasarı meydana geldiğinde rejenerasyon hasarlı bölgenin distal sinir ucunda aksonlar ve miyelin kılıfın bozulması ile başlar ve üç aşamadan oluşur: (1) Wallerian dejenerasyonu, (2) aksonal büyüme ve (3) sinir reinnervasyonu. Şekil 2.2 sinir hasarı sonrası rejenerasyon mekanizmasını göstermektedir. Öncelikli olarak Wallerian Dejenerasyonu olarak bilinen aksonal dejenerasyon ile hasarlı bölgeye aksonların

yönlendirilmesi gerçekleşir. Eş zamanlı olarak nöroglia olarak da bilinen SC distal sinir ucunda dejenerasyonu hızlandırarak Büngner bantlarını meydana getirip büyüyen aksonların hasarlı bölgeye doğru hizalanmasını gerçekleştirerek rejenerasyonu sağlar (Şekil 2.2) [10].

PSS'nin kendini onarma özelliği travma kaynaklı periferik sinir hasarı onarımında yetersiz kalmaktadır [12]. Özellikle hasar sonucu sinir doku kaybı oluşumunda cerrahi işlem gerekliliği bulunmaktadır.

Periferik hasar onarımında modern mikrocerrahi teknikleri gelişmiş olsa da fonksiyon geri kazanımı oranı düşük olmakla birlikte kişinin yaşam kalitesini düşürmektedir. Bu tedavi şekli hasar boyutu 1 cm altında olduğunda uygulanabilmektedir. Periferik sinir hasarı meydana geldiğinde sinir dokusu kaybı söz konusu değilse gerilimsiz uç uca dikiş ile hasar tedavisi gerçekleştirilmektedir. Periferik sinir hasarı seviyesi ve uzunluğu arttıkça periferal sinir sisteminin rejenerasyon özelliğinin tek başına yetersiz olması otolog greft kullanımını gerektirmektedir [13]. Otolog greft kullanımı klinik altın standart olmakla birlikte ikincil cerrahi işlem gerekliliği, çap uyuşmazlığı, nöroma oluşumu ve sınırlı donör doku gibi kısıtlamaları bulunmakla birlikte otolog greft tedavisinde hastaların ortalama %40-50'sinde belirli bir oranda fonksiyon geri kazanımı raporlanmıştır [14].

Periferik sinir hasarının onarımı için klinikte kullanılmak üzere çeşitli biyomalzemeler kullanılarak sinir rejenerasyonunu destekleyici kılavuz kanalları olan kondüitler geliştirilmiştir. Kolajen, poliglikolik asit (PGA), polivinil alkol (PVA) ve polikaprolakton (PCL) temelli kondüitler klinikte alternatif tedavi yöntemleri arasında bulunmaktadır. Fakat kondüit genellikle 1 cm ve altı hasar boyutunda veya 1-3 cm hasar boyutunda tercih edilmektedir. Ayrıca bu kondüitlerde mekanik dayanımın ve esnekliğin yetersiz olması, degradasyon süresinin çok kısa veya uzun olması, özellikle polimer temelli kondüitlerin 1 cm ve üzeri hasarda yaralı bölgeye yeterli hücre göçünü sağlayamamaları gibi kısıtlamalar sinir doku mühendisliği kapsamında yeni kondüitlerin ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini önemli kılmaktadır [15, 16].

Bunlara ek olarak zenogreftler ve allogreftler de alternatif tedavi yöntemleri arasında bulunmaktadır. Fakat bunların en büyük kısıtlaması immün yanıt oluşumu riskinden kaynaklı olarak immün baskılayıcı kullanımını zorunlu kılmaktadır [17]. Klinikte tedavi amaçlı kullanılan doğal ve sentetik polimer temelli kondüitler, zenogreftler ve allogreftler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. PSS Yaralanmalarında Kullanılan Kondüit ve Allogreftlar [18].

Marka	**Malzeme**	**Yapı**	**Çap-Maks. Uzunluk**	**Degradasyon Süresi**	**FDA Onayı**	**Şirket**
NeuroGen®	Kolajen Tip 1	Yarıgeçirgen Fibriller tüp matriks	Çap: 1.5 – 7 mm Uzunluk: 3 cm	36-48 ay	2001	Integra Life Sciences Corp. ABD
NeuroFlex™	Kolajen Tip 1	Esnek Yarıgeçirgen Tüp matriks	Çap: 2-6mm Uzunluk: 2.5 cm	4-8 ay	2001	Collagen Matrix Inc. ABD
NeuroMatrix™	Kolajen Tip 1	Yarıgeçirgen Tüp matriks	Çap: 2-6mm Uzunluk: 2.5cm	4-8 ay	2001	Collagen Matrix Inc. ABD
NeuroWrap™	Kolajen Tip 1	Tüp matriks Duvar yapısında uzunlamasına kesik	Çap: 3-10 mm Uzunluk: 2-4 cm	36-48 ay	2004	Integra Life Sciences Corp. ABD

NeuroMend™	Kolajen Tip 1	Yarı geçirgen kolajen sargı, Şekillenme hafızalı	Çap: 4-12 mm Uzunluk: 2.5-5 cm	4-8 ay	2006	Collagen Matrix Inc. ABD
Neurotube®	Poliglikolik Asit	Absorbe edilebilen örme ağ tüp	Çap: 2.3 – 8 mm Uzunluk: 4 cm	3 ay	1999	Synovis Inc. ABD
Reaxon®	Kitosan	Tüp matriks	Çap: 2.1 – 6 mm Uzunluk: 30 mm	18 ay	2014	Medovent GmbH Almanya
Neurolac®	Poli-DL-laktid kaprolakton	Transparan Tüp matriks	Çap: 1.5 – 10 mm Uzunluk: 3 cm	16 ay	2003	Polyganics BV Hollanda
SaluTunnel	Polivinil Alkol	Biyobozunmaz	Çap: 2 – 10 mm Uzunluk: 6.35 cm	-	2010	Salumedica LLC ABD
Avance®	Sinir Allgoraft	-	Uzunluk: 70 mm	-	2010	Axogen Inc. ABD
Axoguard®	SIS ECM	Absorbe edilebilir Yarıgeçirgen	Çap: 2 – 10 mm	-	2013	Axogen Inc. ABD

			Uzunluk: 40 mm			

PSS yaralanmalarında rejenerasyon aşamasında nöral etkileşimin tekrar uyarılması, aksonal büyümenin desteklenmesi ve hızlandırılması, SC göçünün tetiklenmesi ve nöroma oluşumunun engellenmesi hasarın tedavi edilmesi ve fonksiyon geri kazanımında yüksek öneme sahiptir. Bu sebeple sinir doku mühendisliği kapsamında geliştirilen biyomalzemeler ve kondüitler çevre doku ile uyumlu olmalı, sinir büyümesi ve aksonal rejenerasyon için sitokin, büyüme faktörü gibi gerekli kemotaktik molekülleri bulundurmalı, skar doku sızmasına karşı korumalı, yeterli esnekliğe ve mekanik dayanıma sahip olmalı, nöral indükleyici ve nöral iletkenlik özelliklerine sahip olmalıdır [17].

2.2. Sinir Doku Mühendisliği Uygulamaları

Sinir doku mühendisliği kapsamında PSS yaralanmalarında tedaviye yönelik polimerik, deselülerize ve hibrit doku iskeleleri geliştirilmektedir. Daha önce de bahsedildiği üzere bu kapsamda kullanılan biyomalzemeler nonsitotoksik, non-immünojenik , biyouyumlu, biyobozunur, iletken, hücre proliferasyonunu, tutunmasını ve göçünü destekler özellikte olmalıdır [19].

2.2.1. Polimerik Doku İskeleleri

Polimerik doku iskeleleri, otolog greft kullanımının oluşturduğu kısıtlamaları gidermek ve otolog greftlere alternatif bir tedavi yöntemi oluşturmak amacı ile geliştirilen biyomalzemelerdir. 3D baskı, ekstrüzyon, kalıplama gibi çeşitli doku iskelesi üretim yöntemleri kullanılarak elde edilmektedir [20]. Doğal polimer temelli kondüitler biyouyumluluk ve hücre etkileşimleri ile ön plana çıkarken sentetik polimer temelli kondüitler mekanik özellikleri noktasında dikkat çekmektedir [21].

Kolajen ECM’de yoğun olarak bulunan ve sinir doku mühendisliğinde en çok çalışan doğal polimerler arasında yer almaktadır. SC, ECM yapısında ve bağ doku yapısında da

yoğunlukla bulunmakla birlikte tip 1 kolajen özellikle biyouyumluluk, mekanik dayanım, düşük antijenisite, gözeneklilik, yarı-geçirgenlik ve toksik olmayan degradasyon ürünlerine sahip olması noktasında dikkat çekmektedir [22]. Bunlara ek olarak yapısında bulunan çeşitli bağlanma bölgelerinden dolayı aksonların yeniden büyümesini yönlendiren topografik işaretler yaratma olanağını sağlamakla birlikte ECM yapısını ve fonksiyonunu taklit edebilmektedir [23]. Ayrıca yüzey kaplama olarak kullanıldığında hücre-substrat etkileşimini arttırdığı gözlemlenmiştir [24, 25]. Kolajenin degradasyon süresi, düşük elastisite ve sinir rejenerasyonunu arttırmaması limitasyonları farklı polimerler, proteinler ve nörogliyal hücreler ile kombinasyonlarının geliştirilmesine olanak sağlamıştır [26]. Stang ve ark. SC reselülerize kolajen kondüitlerin aksonal büyümeyi arttırdığını ve desteklediğini göstermişlerdir [27]. Büyüme faktörü yüklü kolajen temelli kondüitlerin sinir rejenerasyonunu ve hasar bölgesinde hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir [28-30]. Kolajenin poli (laktik-ko-kaprolakton) (PLCL), kitosan, hyaluronik asit (HA), poli kaprolakton (PCL), poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve poli glikolik asit (PGA) gibi çeşitli doğal ve sentetik polimerler ile kompozitlerinin elastisiteyi geliştirdiği ve degradasyon özelliklerini ayarlanabilir yaptığı literatürde gösterilmiştir [31-36].

Aljinat kimyasal yapısında bulunan mannuronik asit ve glukuronik asit bloklarının oranına göre ayarlanabilir fizikokimyasal özellikleri, aljinatın doku mühendisliği uygulamalarında dikkat çekmesini sağlamıştır. Buna ek olarak biyouyumluluğu, biyobozunurluğu, düşük toksisitesi, nonantijenisitesi ve şelatlama özellikleri ile sinir doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır [37]. Aljinat hidrojellerinin aksonal büyümeyi ve nöron reinnervasyonunu sağladığı gözlemlenmiştir [38]. Mekanik dayanımının yetersiz olması ve degradasyon süresinin kısa olması tek başına kullanımını kısıtlamaktadır. Bu sebeple diğer polimerler ile kompozit ve hibrit yapıları tercih edilmektedir [39]. Yapılan çalışmalarda diğer polimerler ile kompozit hidrojelinin SC canlılık oranını ve büyümesini arttırdığı, mekanik özelliklerini ve stabilitesini geliştirdiği gösterilmiştir [40-43].

Kitosan biyobozunur, biyouyumlu, esnek, nonsitotoksik, antibakteriyal, antifungal ve yüksek adsorpsiyon özellikleri bulunan biyouyumlu bir doğal polimer olmakla birlikte

katyonik doğası, gözenekli yapılar oluşturabilmesi, SC hücrelerinin yapışmasını, büyümesini ve göçünü teşvik etmesi dolayısıyla sinir doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilmektedir [37, 44]. Bunlara ek olarak aksonal büyümeyi kolaylaştırdığı ve nöroma oluşumunu engelleyebildiği çalışmalarda ortaya çıkmıştır [45, 46]. Yavaş biyodegradasyona uğraması ve asetilasyon derecesinin hücre davranışını etkilemesi uygulama noktasında kısıtlamalara sebebiyet vermektedir [47]. Klinikte Keri Medikal firmasına ait Reaxon® kondüiti kitosan temelli olup 26 mm ve altı hasar boyutunda kullanılabilmektedir [48].

PGA yüksek gerilme modülü olan, biyouyumlu, biyobozunur, nontoksik, termoplastik özellik gösteren yüksek kristalin yapıda sentetik bir poliesterdir. Aksonal rejenerasyonu desteklemesi ve duyusal fonksiyonlarda iyileşme sağlaması sinir doku mühendisliği uygulamalarında dikkat çekmesini sağlamıştır [49]. İmplantasyon sonrası mekanik dayanımında yüksek oranda azalma gerçekleşmesi, asidik bozunma ürünleri ve degredasyon süresi tek başına kullanımı kısıtlamakla birlikte sadece küçük sinir boşluklarının köprülenmesinde uygulama bulmasına sebep olmuştur [49, 50].

PCL biyouyumlu, yüksek elastisite ve düşük toksisiteye sahip, mekanik dayanımı sinir doku mühendisliği uygulamalarına uygun ve aksonlar için topografik işaretler sağlayan FDA onaylı sentetik bir polimerdir. Biyobozunma süresinin çok uzun olması uygulamalarını kısıtlamaktadır [51]. Çalışmalarda PCL tabanlı kondüitlerin 24 aya kadar yapısının bozulmadığı gözlemlenmiştir [52]. Ayrıca hücre tutunmasının ve biyobozunurluğunun düşük olması kitosan, kolajen, jelatin gibi hücre adezyonu yüksek doğal polimerler ile kullanımını arttırmıştır [53-56].

Polihidroksi butirat (PHB) biyouyumlu, nörokoruyucu özellik göstermesi ile periferal sinir hasarına yönelik dikkat çeken sentetik polimerler arasında yer almaktadır. Biyodegradasyon süresinin PCL gibi uzun olması uygulamasını kısıtlamaktadır [49].

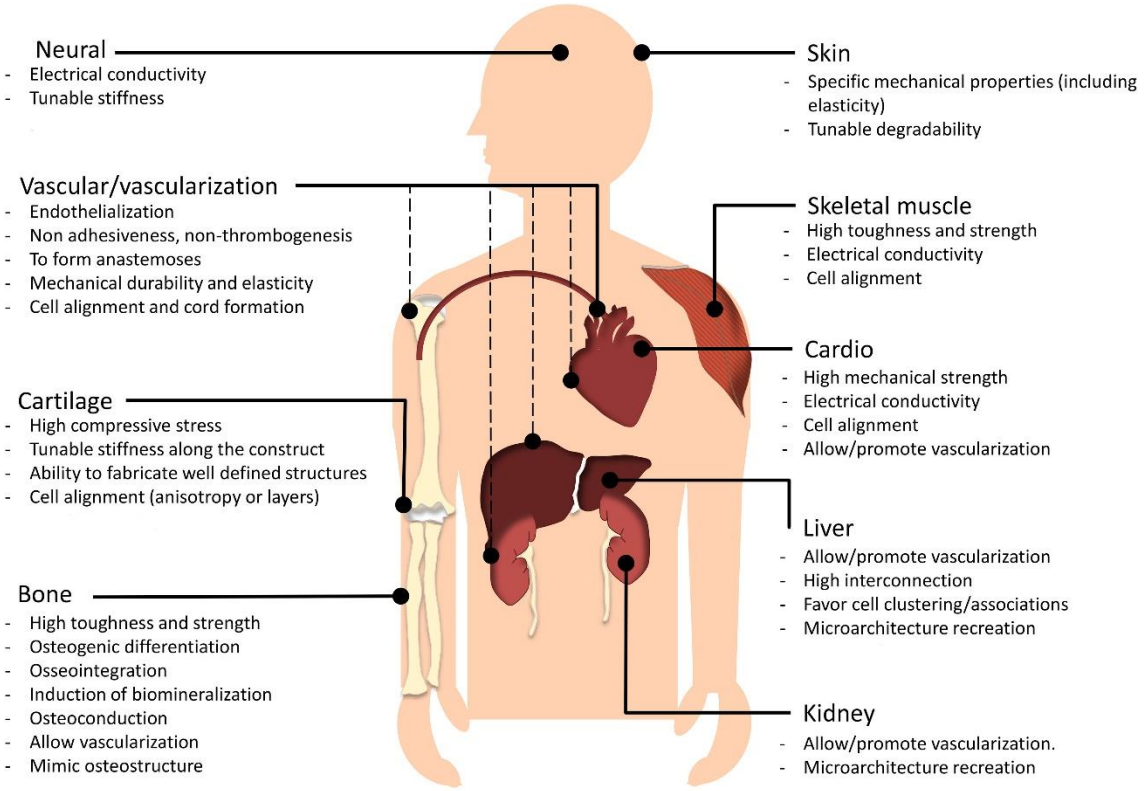
Polipirol (PPY) yüksek iletkenliğe sahip biyouyumlu, nontoksik, mutajenik özellik göstermeyen, alerjik olmayan ve hücre tutunmasını destekleyen özellik göstermesiyle

sinir rejenerasyonunda ve kaplama olarak tercih edilmektedir [21]. Biyobozunur olmaması ve düşük stabiliteye sahip olması sinir doku mühendisliği uygulamalarında kullanımını kısıtlamaktadır. Bu sebeple biyobozunur, stabil ve biyouyumlu doğal veya sentetik polimerlerle birlikte kullanılmaktadır [57].

2.2.1.1. GelMA

Jelatin, kolajenin yüksek sıcaklıkta hidroliz ve denatüre edilmesi ile elde edilen biyouyumlu, biyobozunur, non-immünojenik, nontoksik özellik gösteren bir proteindir. Kimyasal yapısında bulunan çeşitli fonksiyonel gruplar sebebi ile kolajene kıyasla kimyasal modifikasyonu kolay olup yapısında bulundurduğu matriks metalloproteinaz hedef dizileri ve arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) peptit dizileri hücre yapılanmasını, göçünü, tutunmasını, proliferasyonunu ve farklılaşmasını desteklemektedir. Fakat termal stabilitesinin düşük olması, proteoliz yatkınlığından kaynaklı hızlı degradasyona uğraması ve mekanik özelliklerinin zayıf olması uygulamalarını kısıtlamaktadır [58]. Bahsi geçen dezavantajlarını iyileştirmek için metakrilik anhidrit (MA) ile modifikasyonu uygulanan yöntemlerden birisidir [59, 60].

MA modifikasyonu jelatini foto-çapraz bağlanabilir hale getirerek çapraz bağlanmasını kolaylaştırırken hem jelatinin yapısal özelliklerini hem de bahsi geçen fonksiyonel amino asit motiflerini ve biyoaktivitesini korumaktadır [60]. Ayrıca MA modifikasyon derecesi ve çapraz bağlama çözünme, gözeneklilik, mekanik dayanım, rijidite, biyobozunurluk gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerini ayarlanabilir yapmaktadır [61]. Bu özelliklerinden kaynaklı olarak metakrilatlanmış jelatin (GelMA) kemik, kardiyovasküler, kıkırdak, deri ve sinir doku mühendisliği gibi birçok doku mühendisliği uygulamasında tercih edilmektedir (Şekil 2.3). Jelatinin ECM proteini olması, GelMA'nın RGD ve MMA motiflerini koruyarak sinir hücreleri için gerekli mikro-çevreyi sağlaması sinir doku mühendisliği için kullanımını arttırmıştır [62].



Şekil 2.3. GelMA Doku Mühendisliği Uygulamaları [63]. Belirtilen kaynaktan uyarlanmıştır.

Yapılan *in vitro* çalışmalarda GelMA temelli kondüitlerin ve hidrojellerin nöral hücre proliferasyonunu, göçünü, tutunmasını ve canlılığını arttırdığı gözlemlenmiştir [64-66]. SC enkapsüle GelMA hidrojeller incelendiğinde SC'nin miyelinasyonunun artmış olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada rat adrenal feokromositoma (PC12) hücre hattı ile ko-kültürü çalışmasında PC12 büyümesini ve akson filizlenmesini desteklediği ortaya çıkmıştır [67]. Ayrıca kolajen ile kompozitinin *in vivo* deneylerde 1 cm boyutlu hasarda tam iyileşme gözlemlenmese de sinir rejenerasyonunu ve aksonal büyümeyi indüklediği incelenmiştir [68]. Grafen ve türevleri ile oluşturduğu kompozitlerde ise yükselmiş elektriksel iletkenliğin *in vivo* deneyler ile fonksiyon geri kazanımında ve rejenerasyonda etkili olduğu literatürde gösterilmiştir [69].

2.2.2. Deselülerize Doku İskeleleri

Ekstraselüler matriks (ECM) yapısal bütünlüğü, yapısında bulundurduğu biyoaktif moleküller ve hücreler için fonksiyonel mikro-çevre sağlaması ile doku mühendisliği

uygulamalarında doku iskelesi olarak tercih edilmektedir [70]. ECM kaynaklarının ksenojenik veya allojenik olması, biyomedikal uygulamalarda ön işleme maruz bırakılmadan kullanılmasını engellemektedir. Deselülerizasyon ECM içerisinde bulunan doğal kaynaklı hücresel bileşenlerin ve immün yanıt oluşturabilecek antijenlerin, ECM doku bütünlüğüne ve kolajen, elastin, glikozaminoglikan (GAG), büyüme faktörleri, proteoglikanlar gibi yapısal proteinlerine olabildiğince zarar vermeden uzaklaştırılmasını sağlamaktadır [71]. Bu bağlamda uygulanan yöntemler fiziksel, kimyasal ve enzimatik olarak 3 başlıkta incelenmektedir.

Kimyasal deselülerizasyon işlemlerinde noniyonik, iyonik ve zwitteriyonik deterjanlar, asit ve bazlar, hipotonik ve hipertonik çözeltiler, alkoller ve organik çözücüler kullanılmaktadır [72-74]. Noniyonik deterjanlar dokuda lipit-lipit ve lipit-protein etkileşimlerini parçalamaktadır. ECM hasarı düşük olmakla birlikte etkinliği diğer deterjan protokollerinden daha düşüktür. İyonik deterjanlar ise elektrostatik etkileşimler ile hücre membranlarını bozarak hücre ve nükleik membranları çözüp protein denatürasyona sebep olmaktadır. Etkili bir yöntem olmakla birlikte ECM'de yüksek hasara yol açmaktadır. Zwitteriyonik deterjanlar ise hem iyonik hem de noniyonik özellik göstermektedir. İyonik deterjanlara kıyasla verimi daha düşük olup noniyonik deterjanlardan daha etkili oldukları literatürde gösterilmiştir [75].

Asit ve baz solüsyonları tek başına kullanıldığında verim düşük olmakla birlikte korozif etkilerinden kaynaklı olarak ECM hasarı çok yüksek olmaktadır. Ayrıca ECM'de yapısal ve fonksiyonel değişikliklere sebep olması ve immunojenisiteyi azaltmaması kullanımını kısıtlamaktadır. Bu sebeple düşük konsantrasyonlarda sterilizasyon için tercih edilmektedir [76].

Hipotonik ve hipertonik ortam uygulaması ozmotik basınç kullanarak lizis ile hücreleri parçalamaktadır. Lizis sonrası hücre kalıntılarını uzaklaştırmakta yetersiz olmaları sebebi ile diğer yöntemler ile birlikte kullanılmaktadır [77].

Enzimatik deselülerizasyon yöntemleri proteolitik enzimler, şelasyon ajanları ve nükleaz kullanılarak hücrelerin ve diğer antijenik hücre kalıntılarının uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Proteolitik enzimlerde yüksek konsantrasyon ve uzun süre maruz kalmanın elastin ve GAG gibi yapısal proteinleri parçalayarak ECM yapısına hasar vermesi ve doku tipleri arasında verimin farklılık göstermesinden kaynaklı olarak çoğunlukla diğer metotlar ile kullanılmaktadır [78]. Fiziksel yöntemler ise dondurma-çözme, basınç, sonikasyon ve ajitasyon uygulamalarıdır. Bu yöntemler ani şok ile hücre lizisine sebep olmakla birlikte ECM'de tek başına kullanıldıklarında etkili olmamaktadır. Bu bağlamda süperkritik akışkan teknolojisi hücresizleştirme uygulamalarında ECM yapısal bütünlüğüne minimum hasar vermesi ile diğer yöntemlerden daha etkili bir yöntem olarak geliştirilmiştir [79]. Ayrıca hücresizleştirme işlemlerinde fiziksel, kimyasal ve enzimatik metotların kombinasyonlarının kullanımının hücresel bileşenlerini uzaklaştırma noktasında etkili bir metodoloji olduğu bilinmektedir [70].

Kritik sıcaklık ve basınç değeri üzerinde hem gaz hem de sıvı özellikleri olan maddeler süperkritik akışkan olarak adlandırılmaktadır. Süperkritik akışkanların düşük viskozitesi ve yüksek yayınırlığı sterilizasyon, ekstraksiyon gibi farklı uygulamalarda kullanımına olanak sağlamaktadır [80]. Literatürde hücresizleştirme işlemlerinde en çok tercih edilen süperkritik akışkan olarak süperkritik karbon dioksit (scCO2) görülmektedir. Bunun başlıca sebepleri scCO2'nin inert, nontoksik, düşük maliyetli ve yüksek saflıkta hazır bulunabilmesi özellikleridir [81]. Bu kapsamda scCO2 fiziksel bir hücresizleştirme yöntemi olarak konvansiyonel hücresizleştirme yöntemlerine alternatif olarak geliştirilmiştir. Konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında daha kısa, etkili ve basit bir yöntem olarak değerlendirilmektedir [79]. CO_2 31.1ºC ve 7.40 MPa kritik sıcaklık ve basınçta süperkritik akışkan haline gelerek dokuları infiltre edebilmektedir. Ayrıca reaktör sistemi ile kullanılmasından kaynaklı olarak kesikli veya devamlı reaktör sistemleri ile etkin bir yöntem olarak kullanılmakla beraber kalıntı bırakmamaktadır [82]. ScCO2 ile hücresizleştirme işlemi dokunun kritik sıcaklık üzerinde belirli bir süre yüksek basınca maruz bırakılması ile hızlı bir şekilde basınçsızlandırılması sonucu hücrelerin elimine edilmesini sağlamaktadır. ScCO2 düşük polariteye sahip olmasından kaynaklı olarak ko-solvent ile kullanımı uygulamadaki verimi arttırmaktadır. Bu sebeple hem polariteyi hem de dokunun etkili bir şekilde deselülerizasyonunu sağlamak için etanol, dimetil sülfoksit (DMSO) gibi çözücüler ko-solvent olarak kullanılmaktadır [83].

Literatürde sinir doku mühendisliğine yönelik doku iskelesi üretiminde genel olarak fiziksel, kimyasal ve enzimatik uygulamaların bir arada kullanıldığı dikkat çekmektedir. Yu ve ark. siyatik siniri deselülerize ederek çok kanallı bir greft üretmişlerdir. *In vivo* deneylerde 10 mm hasar boyutunda SC göçü ve akson filizlenmesi gözlemlenmiştir. Özellikle deselülerizasyon sonrası nörotropik faktörlerin korunması sinir rejenerasyonunu desteklediği gözlemlenmiştir [84]. Başka bir çalışmada vagus siniri deselülerizasyon sonrası ECM hidrojeli elde edilmiştir. *In vitro* çalışmalarda nörotropik faktör salımı ve akson rejenerasyonu gözlemlenmiştir [85]. Meder ve ark. yaptığı benzer bir çalışmada aselüler siyatik siniri ECM hidrojeli eldesi için kullanılmıştır. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarda sinir rejenerasyonu ve fonksiyon geri kazanımında artış gözlemlemişlerdir [86]. Deselülerize sinir doku iskelesi kullanımının SC göçü, tutunması ve proliferasyonunu arttırdığı, aksonal uzamayı ve rejenerasyonu güçlendirdiği ve fonksiyon geri kazanımını desteklediği literatürde yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır [14, 87-90].

2.2.2.1. SIS

SIS hızlı emilebilen, biyobozunur, erken neovaskülarizasyonu destekleyen ve doku modellemesinde iskele görevi gören bir biyomalzemedir. Yapısında bulunan kolajen, elastin, fibronektin, laminin, GAG, proteoglikan ve çeşitli büyüme faktörleri bulunmaktadır. Bu bileşenlerin hücresizleştirme işlemi sonrası korunması SIS temelli malzemelerin Schwann hücre migrasyonunu, proliferasyonunu ve tutunmasını arttırmasını, nöral büyümeyi desteklemesini ve elektriksel iletkenliğini korumasını sağlamaktadır [91, 92]. Buna ek olarak yapısında çeşitli sitokinler, sinyal iletici moleküller, nöronların büyümesi ve hayatta kalması için gerekli olan çok sayıda nörotransmiter ve nörotropik faktör bulundurması hem sinir doku mühendisliği hem de kas, cilt, damar gibi diğer doku mühendisliği uygulamalarında dikkat çekmesini sağlamıştır [93-95].

Yi ve ark. sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada 5 mm siyatik sinir yırtığında SIS'ten üretilmiş yuvarlanmış tüp kondüiti kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre sinir rejenerasyonu başarılı bir şekilde indüklenmiştir [96]. Diğer bir çalışmada SIS

kılavuzlarının akson ve SC yönlendirmesi için yeterli itici güç sağladığını göstermiştir [97]. Klinikte zenogreft olarak Axoguard sinir kondüiti 40 mm yırtıklarda kullanılmaktadır [98].

2.2.3. Hibrit Doku İskeleleri

Genel olarak hücresizleştirme işlemi sonrası doku mekanik özelliklerinde azalma ve yapısal hasar gerçekleşmesi doğal doku kaynaklarının polimerlerle birlikte kullanımını ön plana çıkarmıştır. Hibrit doku iskeleleri polimerlerin ve greftlerin daha önce bahsedilen limitasyonlarını iyileştirmektedir [99]. Yapılan çalışmalarda doku-polimer kompozitlerinin mekanik dayanımı, biyouyumluluğu, hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir [100, 101]. Ayrıca elde edilen hibrit doku iskelelerinin polimerlerin antibakteriyel özellik gibi biyokimyasal özelliklerini de taşıdığı ortaya çıkmıştır [102]. Doğal dokunun su tutma kapasitesi, degradasyon gibi fizikokimyasal özelliklerini kontrol edilebilir hale getirmekle beraber rejenerasyon kapasitesini de yükseltmektedir [103, 104].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Deselülerize Koyun İnce Bağırsak Submukozasının (SIS) Hazırlanması

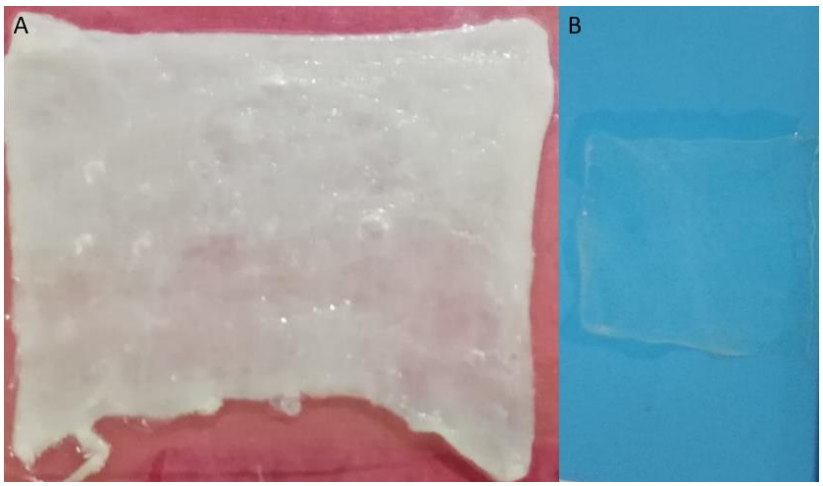
3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Tez kapsamında deselülerizason işlemi ve deselülerize dokuların karakterizasyonları için SDS (Merck, Almanya), metanol (VWR Prolabo, İngiltere), kloroform (Merck, Almanya), tripsin 1:250 (Amresco, ABD), DNAaz I (Serva, Almanya), etilendiamin tetraasetik asit disodyum dihidrat (EDTA) (VWR Prolabo, İngiltere) ve Tris baz (Nzy Tech, Portekiz) deselülerizasyon aşamasında; paraformaldehit (VWR Prolabo, İngiltere), Hematoksilen Gill-III (Merck, Almanya), Eozin (Merck, Almanya), DAPI (Biotium, ABD), entellan (Merck, Almanya), etanol (Interlab, Almanya) histolojik çalışmalarda; proteinaz K (Sigma, ABD), kondrotin sülfat (Sigma, ABD), 1,9-dimetil-metilen mavisi (DMMB) (Sigma, ABD) ve Quant-iTTM PicoGreen dsDNA Assay Kiti (Invitrogen, ABD) biyokimyasal analizlerde; L929 (ATCC, ABD), düşük glikozlu Dulbecco besi ortamı (L-DMEM) (Capricorn, Almanya), antibiyotik-antimikotik 100x solüsyon (AA) (Capricorn, Almanya), fetal sığır serumu (FBS) (Capricorn, Almanya), l-glutamin (Capricorn, Almanya), Tripsin-EDTA %0,25-w/PhenolRed (Capricorn, Almanya) ve (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (Biovision, ABD), Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma, ABD) sitotoksisite analizi için kullanılmıştır.

3.1.2. SIS Diseksiyonu

Mezbahada koyunun sakrifiye edilmesini takip eden 4 saat içerisinde koyun ince bağırsağı, uygun şartlarda laboratuvara ulaştırılmıştır. Duodenum, Jejunum ve ileum olmak üzere üç kısımdan oluşan koyun ince bağırsağının jejunum kısmı submukoza membranı diseksiyonu için 6cm uzunlukta parçalara bölünerek, mukozanın uzaklaştırılması amacıyla PBS ile yıkanmıştır. Devamında yıkanan parçalar uzunlamasına kesilmiş ve bistüri ucunun sırtı kullanılarak mekanik eliminasyon ile seröz membran ve kas tabakası uzaklaştırılarak submukoza membranı elde edilmiştir. Elde

edilen SIS 2x2 cm boyutunda kesilerek deselülerizasyon işlemine kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. Şekil 3.1 disekte edilmiş submukozayı göstermektedir.



Şekil 3.1. SIS Diseksiyonu. (A) Enine kesilmiş ince bağırsak, (B) Disekte edilmiş işlem görmemiş SIS.

3.1.3. SIS Kimyasal Deselülerizasyon Protokolü

SIS deselülerizasyonu için Luo vd. tarafından geliştirilen metot modifiye edilmiştir [105]. SIS don-çöz uygulandıktan sonra metanol – kloroform (1:1, h/h) çözeltisi içerisinde inkübe edilmiştir. Devamında %0,05 (a/h) tripsin-EDTA çözeltisinde 37°C'de muamele edilmiştir. Sonrasında optimum SDS konsantrasyonu ve süresinin belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde %0,9 (a/h) NaCl çözeltisi ile hazırlanmış SDS çözeltisi uygulaması 100 rpm hızda çalkalamalı inkübatör (Gerhardt, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Son olarak SIS %20 (h/h) EtOH ile hazırlanmış %0,1 (h/h) perasetik asit (PAA) çözeltisinde inkübe edilmiştir. Her aşamadan sonra PBS ile yıkama yapılmıştır. Çizelge 3.1 deselülerizasyon protokolü ile ilgili detaylı bilgileri vermektedir.

Çizelge 3.1. SIS Kimyasal Deselülerizasyon Grupları.

UYGULAMA	**D1**	**D2**	**D3**
Fiziksel Ön Muamele	Don – Çöz 3x	Don – Çöz 3x	Don – Çöz 3x
Delipidasyon	Metanol-Kloroform (h/h) inkübasyonu 12sa	Metanol-Kloroform (h/h) inkübasyonu 12sa	Metanol-Kloroform (h/h) inkübasyonu 12sa
PBS Yıkama	12sa	12sa	12sa
Enzimatik Ajitasyon	%0,05 Tripsin - EDTA Solüsyonu	%0,05 Tripsin - EDTA Solüsyonu	%0,05 Tripsin - EDTA Solüsyonu
PBS Yıkama	12sa	12sa	12sa
Kimyasal Ajitasyon	%0,5 SDS 4sa	%1 SDS 4sa	%1 SDS 8sa
PBS Yıkama	12sa	12sa	24sa
Asit Muamelesi	%0,1 PAA 30 dk	%0,1 PAA 30 dk	%0,1 PAA 30 dk
PBS Yıkama	12sa	12sa	12sa

3.1.4. SIS Süperkritik CO_2 Deselülerizasyon Protokolü Optimizasyonu

Süperkritik akışkan teknolojisi ile SIS deselülerizasyonu ilk olarak tez kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda laboratuvarımızda bulunan yarı-kesikli reaktör ($scCO_2$, Inc., ABD) sistemi kullanılmıştır. Süperkritik akışkan ile SIS deselülerizasyonunda optimum protokolün belirlenebilmesi için 6 farklı grup oluşturulmuştur. Tüm deneyler için 100 mL etanol ko-solvent olarak kullanılmıştır.

Deneyler kapsamında don-çöz işlemi için kullanılan hipotonik ortam 0,01 M Tris-HCl ile pH 8 değerinde hazırlanmıştır. Hipertonik ortam 1,5 M NaCl çözeltisi içerisinde 0,05 M Tris-HCl tamponu olarak pH 7,6 değerinde hazırlanmıştır. DNAaz çözeltisi 2 mL/SIS şeklinde uygulanmıştır. Çizelge 3.2 oluşturulan protokollere ait detayları içermektedir. Tüm gruplarda deney 37ºC'de gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Süperkritik CO_2 ile Deselülerizasyon Optimizasyon Grupları.

İŞLEM	SCSIS-1	SCSIS-2	SCSIS-3	SCSIS-4	SCSIS-5	SCSIS-6
Fiziksel Ön İşlem	Don – Çöz 3x	Don – Çöz 3x	Don – Çöz 3x	Don – Çöz 3x	Don – Çöz 3x	Don – Çöz 6x
Delipidasyon	-	-	-	Metanol – Kloroform İnkübasyon 12sa	Metanol – Kloroform İnkübasyon 12sa	Metanol – Kloroform İnkübasyon 12sa
PBS Yıkama	-	-	-	12sa	12sa	12sa
Enzimatik Ön İşlem	-	-	-	-	%0.5 (a/h) Tripsin/EDTA inkübasyon 37°C- 12sa	%0.25 (a/h) Tripsin inkübasyon 37°C- 12sa
Hipertonik Ortam Uygulama	-	-	-	-	-	24sa
Süperkritik CO2 Uygulama	37°C- 17,2 MPa (2500 psi) 1sa	37°C - 31,02 MPa (4500 psi) 1sa	37°C - 31,02 MPa (4500 psi) 3sa	37°C - 31,02 MPa (4500 psi) 3sa	37°C - 31,02 MPa (4500 psi) 3sa	37°C - 31,02 MPa (4500 psi) 3sa
PBS Yıkama	-	-	24sa	48sa	48sa	1sa

Enzimatik Uygulama	-	-	-	-	-	100 U/mL DNAse 37°C – 3sa
PBS Yıkama	-	-	-	-	-	12sa

Süperkritik CO2 ($scCO_2$) uygulama basıncının belirlenmesi için SCSIS-1 ve SCSIS-2 grupları oluşturulmuştur. Uygulama süresi sabit tutularak ideal basınç değeri belirlenmiştir.

SCSIS-2 ve SCSIS-3 grupları süperkritik CO_2 uygulama süresini belirlemek için oluşturulmuştur. Basınç sabit tutularak uygulama süresi belirlenmiştir.

SCSIS-4, SCSIS-5 ve SCSIS-6 grupları süperkritik CO_2 uygulaması öncesi ve sonrası işlemleri belirlemek için kullanılmıştır.

3.1.5. Deselülerize SIS Karakterizasyonu

Tez kapsamında yapılan deselülerizasyon çalışmalarında, çeşitli karakterizasyon yöntemleri kullanılarak $scCO_2$ ve kimyasal deselülerizasyon gruplarının karşılaştırılması ile optimum deselülerizasyon protokolü belirlenmiştir. Bu kapsamda histolojik boyamalar, biyokimyasal kantitatif analizler, morfolojik görüntüleme, mekanik dayanım ve *in vitro* sitotoksisite analizleri yapılmıştır.

3.1.5.1. Histolojik Analizler

Hücresizleştirme sonrası doğal hücre artıklarının gözlemlenmesi ve ECM doku bütünlüğünün analizi için hematoksilen & eozin (H&E) ve 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) boyamaları yapılmıştır. Kontrol grubu olarak doğal SIS membranları kullanılmıştır.

SIS %4 paraformaldehit içerisinde 24 saat fikse edildikten sonra dokular çeşme suyu ile 1 gün boyunca yıkanarak dereceli alkol (%70, %80, %90 ve %100) dehidrasyonu gerçekleştirilmiştir. Devamında dokunun sertleştirilmesi amacıyla ksilen ile 2 saat muamele edilen dokular 60ºC de parafin bloklara gömülmüştür. Parafin bloklar 4ºC'de soğutulduktan sonra mikrotom ile 5µm kesitler alınarak boyamalar için preparatlar hazırlanmıştır.

3.1.5.1.1. Hematoksilen & Eozin (H&E) Boyama

Anyonik yapılı alkali bir boya olan hematoksilen hücre çekirdeklerini mor-mavi renklerine boyarken, anyonik yapılı asidik bir boya olan eozin hücre sitoplazmasını, kolajen gibi bağ doku fiberlerini pembe-kırmızı renklerine boyayarak ECM bütünlüğü hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca uygulanan deselülerizasyon işleminin verimine yönelik görsel değerlendirme sağlamaktadır.

Bölüm 3.1.5.1. de hazırlanan preparatlar deparafinizasyon için ksilende 1 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında azalan dereceli alkol serisi (%100, %90 ve %80) ile rehidre edilmiştir. Rehidre edilen preparatlar hematoksilen içerisinde 2 dk inkübe edilip sonrasında eozin içerisinde 25 dk inkübe edilmiştir. Devamında artan dereceli alkol serisiyle muamele edilip ksilende inkübe edilen preparatlara entellan kullanılarak lamel ile kapama yapılmıştır. Boyama sonrası preparatlar ışık mikroskobu (Leica Microsystems, Almanya) kullanılarak görüntülenmiştir.

3.1.5.1.2. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) Boyama

DAPI floresan özelliği ile nükleik asit boyama teknikleri arasında bulunmaktadır. Hücre çekirdeğini mavi renge boyayarak floresan ışık altında görüntülenmesini sağlamaktadır. Bölüm 3.1.5.1. de hazırlanan preparatlar deparafinizasyon sonrası azalan dereceli alkol serisi ile rehidre edilmiştir. Devamında pastör pipet yardımı ile DAPI boyası damlatılarak lamel ile kapama yapılmıştır. Floresan özelliği dolayısıyla boyama karanlık ortamda yapılmıştır. Floresan ataçmanlı ışık mikroskobu (Leica Microsystems, Almanya) ile karanlık ortamda görüntüleme yapılmıştır.

3.1.5.2. Biyokimyasal Analizler

SIS deselülerizasyonunda histolojik analizlere ek olarak uygulanan yöntemlerin verimini ve etkisini analiz etmek için DNA ve glikozaminoglikan (GAG) sayısal analizi gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda işlem görmemiş doğal SIS kontrol grubu ve deselülerize gruplarda DNA sayısal analizi gerçekleştirmek için Quant-iT^{TM} PicoGreen^{TM} dsDNA (Invitrogen, ABD) analiz kiti, GAG miktarının belirlenmesi için Dimetil Metilen Mavisi (DMMB) testi kullanılmıştır.

Biyokimyasal analizler için 16 saat boyunca liyofilizatör (Labconco, UK) ile kurutulmuş kontrol grubu ve desülerize gruplar 60ºC'de 500µL Proteinaz K solüsyonu (1 mg/mL) ile parçalanmıştır.

3.1.5.2.1. Kantitatif Genomik DNA Tayini

Genomik DNA nicel tayini amaçlı bölüm 3.1.5.2'de elde edilen doku çözeltileri kullanılmıştır. Quant-iT^{TM} PicoGreenTM dsDNA (Invitrogen, ABD) analiz kiti protokolüne göre gerçekleştirilen miktar tayini için azalan DNA konsantrasyonuna göre standart solüsyonları hazırlanarak standart eğri oluşturulmuştur. 96 kuyucuklu kültür kabı içerisine 50 µL örnek ve 50 µL test solüsyonu eklenerek 480/520 nm dalga boyunda Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, ABD) kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri kuru doku ağırlığına göre normalize edilmiştir. Kontrol ve deselülerize gruplarda her örnekten 3 okuma alınmıştır. Analiz boyanın ışık duyarlı olmasından dolayı karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

3.1.5.2.2. Kantitatif Glikozaminoglikan (GAG) Tayini

Kontrol grubu ve deselülerize gruplarda GAG miktar tayini 1,9-dimetil metilen mavisi (DMMB) analizi ile gerçekleştirilmiştir. DMMB test solüsyonu 4 mg DMMB tuzunun 250 mL 40 mM NaCl, 40 mM Glisin ve 0,1M HCl içerisinde çözdürülmesi ile elde edilmiştir. Elde edilen DMMB solüsyonu 0,45 mikron filtre ile süzülmüştür. GAG analizi için bölüm 3.1.5.2'de elde edilen doku çözeltileri kullanılmıştır. Artan kondrotin sülfat konsantrasyonuna göre standart eğri oluşturulmuştur. 96 kuyucuklu kültür kabı içerisine

40 µL örnek ve 200 µL test solüsyonu eklenerek 525 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu (Biotek, ABD) ile ölçüm yapılmıştır. Kontrol ve deselülerize gruplarda her örnekten 3 okuma alınmıştır. Analiz boyanın ışık duyarlı olmasından dolayı karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

3.1.5.3. Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Analizi

Kontrol grubu ve deselülerize grupların yüzey analizleri SEM ile gerçekleştirilmiştir. %2,5 gluteraldehit (h/h) solüsyonu içerisinde 24 saat fikse edilen örnekler 3 kere 15'er dakika PBS ile yıkanarak rehidre edilmiştir. Devamında artan dereceli alkol serisinde dehidre edilen örnekler 16 saat liyofilize edildikten sonra 12 nm altın – paladyum (Au-Pd) kaplama yapılarak taramalı elektron mikroskobu (Tescan GAIA 3, Çek Cumhuriyeti) altında görüntülenmiştir

3.1.5.4. Mekanik Analiz

Deselülerizasyon sonrası dokuların mekanik özelliklerindeki değişimin gözlemlenebilmesi için çekme testi uygulanmıştır. Cell Scale Biomaterial Tester (Cellscale Univert, Kanada) kullanılarak 50 N yükleme hücresi ve 10 mm/dk çekme hızı ile çekme analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz için işlem görmemiş doğal doku ve deselülerize gruplar 1x1 cm boyutunda kullanılmıştır. Çekme testi ile kontrol ve deselülerize grupların çekme dayanımları ve elastisite modülleri tespit edilmiştir. Gerilim-gerinim eğrisinde %10-40 deformasyon aralığında elastisite modülü hesaplanmıştır.

3.1.5.5. Yaş ve Kuru Ağırlık Değişimi

Deselülerizasyon yöntemlerinin dokuda sebep olduğu ağrılık değişiminin ve su tutma kapasitesinin hesaplanması için kontrol grubu olarak işlem görmemiş doğal doku ve deselülerize grupların liyofilizasyon öncesi ve sonrası ağırlıkları tartılmıştır. Kontrol grubu ve deselülerize gruplar arasındaki ağırlık kaybı hesaplanmıştır.

3.1.5.6. *In Vitro* Sitotoksisite Analizi

Deselülerize dokuların hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi için in-direkt 3-(4,5-dimetiltiyazol2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) analizi yapılmıştır. Analiz için deselülerize gruplar %10 FBS, %1 aa ve %1 l-glutamin içerikli l-DMEM besiyerinde 37ºC de %5 CO_2 varlığında inkübatör (Memmert, Almanya) kullanılarak 24 saat inkübe edilmiştir. 0,45 mikron filtre kullanılarak ekstraksiyon ortamı filtre edilip analiz gününe kadar +4ºC'de saklanmıştır.

L929 fare fibroblast hücre hattı l-DMEM besiyeri kullanılarak çoğaltılmıştır. Sıvı azot tankında bulunan stoklu L929 hücre viali 37ºC sıcak su banyosunda çözdürülmüştür. Devamında 15 mL steril falkona aktarılıp 4 mL besi ortamı eklenerek 2500 rpm'de 3 dk santrifüj ile çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırılıp hücreler homojenize edilip T75 kültür kabına ekimi yapılıp prolifere olması sağlanmıştır. Hücre konfluensi gerçekleşince, tripsin ile inkübe edilerek hücreler yüzeyden kaldırılmıştır. Besi ortamı ile enzim inhibisyonu yapılıp 2500 rpm'de 3 dk santrifüjlenerek hücreler çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırılıp homojenize edilerek Thoma lamı ile hücre sayımı yapılmıştır. Sonrasında 24 kuyucuklu plakaya hücre ekimi $3x10^4$/kuyucuk olacak şekilde gerçekleştirilmiş olup 24 saat prolifere olması için inkübatöre yerleştirilmiştir. Devamında daha önce elde edilen doku ekstraktları 1 mL/kuyucuk olacak şekilde hücrelerin beslemesi yapılıp 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası ekstrakt ortamdan uzaklaştırılıp 60 µL MTT (2,5 mg/mL, a/h) ve 600 µL l-DMEM eklenerek karanlık ortamda 3 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında kuyucuklardan MTT-DMEM ortamı uzaklaştırılıp 405 µL DMSO ile formazan kristalleri çözdürülerek 96 kuyucuklu plaka da 200 µL/kuyucuk olacak şekilde 570 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu (Biotek, ABD) ile okuma gerçekleştirilmiştir. Analiz için kontrol grubu %10 FBS, %1 aa ve %1 l-glutamin içerikli l-DMEM besiyeri ile inkübe edilmiştir.

3.2. Metakrilatlanmış Jelatin (GelMA) Prepolimer Sentezi ve GelMA Hidrojeli Eldesi

3.2.1. Kimyasal Malzemeler

Tez kapsamında GelMA prepolimer sentezi ve hidrojeli eldesi için jelatin tip A (Sigma, ABD), metakrilik anhidrit (Sigma, ABD), 2-hidroksi-4'-(2-hidroksietoksi)-2-metilpropiofenon (I2959) (Sigma, ABD), 12-14 kDa diyaliz membranı (Repligen, ABD), kolejanaz A (Sigma, ABD) ve PBS (Sigma, ABD) kullanılmıştır.

3.2.2. GelMA Prepolimer Sentezi ve Karakterizasyonu

GelMA prepolimer sentezi için Zihna vd. tarafından kullanılan prosedür modifiye edilmiştir [106]. Öncelikli olarak %10 (a/h) jelatin çözeltisi (PBS, pH:7.4) 40ºC sıcak su banyosu kullanılarak hazırlanmıştır. Devamında ortam sıcaklığı 50ºC'ye yükseltilerek farklı oranlarda metakrilik anhidrit 3 mL/dk akış hızıyla jelatin çözeltisine eklenerek reaksiyon karanlık ortamda 3 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Devamında reaksiyona girmemiş metakrilik anhidritin uzaklaştırılması için elde edilen GelMA pre-polimer solüsyonu 40ºC'de distile su kullanılarak diyaliz edilmiştir. Diyaliz suyu her gün tazelenmiştir. Diyaliz sonrası GelMA pre-polimer solüsyonu -80ºC de dondurulup 1 hafta boyunca liyofilize edilerek -80ºC'de saklanmıştır. Çizelge 3.3 GelMA pre-polimer sentez grupları ile ilgili detaylı bilgileri vermektedir. Elde edilen GelMA prepolimeri ^{1}H-NMR ve FT-IR ile karakterize edilmiştir.

Çizelge 3.3. GelMA Prepolimer Sentezi.

Sentez Grupları	Jelatin Konsantrasyonu (a/h)	Metakrilik Anhidrit Konsantrasyonu (h/h)
G1	%10	%10
G2	%10	%8
G3	%10	%6
G4	%10	%4
G5	%10	%2

3.2.2.1. Proton Nükleer Manyetik Rezonans (^{1}H-NMR) Analizi

GelMA pre-polimerinde modifikasyonu ve modifikasyon derecesini (MD) tespit etmek ^{1}H-NMR kullanılmıştır. Analiz için jelatin ve GelMA prepolimerleri 15 mg/mL derişimde D_2O içerisinde çözdürülüp, ölçüm 400 MHz AV model NMR Spekrometresi (Bruker, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. *Eşitlik 1* kullanılarak MD hesaplanmıştır.

$$\text{MD } (\%) = 1 - \frac{\int Lizin\ Metilen\ Piki\ GelMA}{\int Lizin\ Metilen\ Piki\ Jelatin} \qquad \textit{Eşitlik 1}$$

3.2.2.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi

GelMA prepolimerinin yapısal analizi FT-IR ile gerçekleştirilmiştir. Katı formda jelatin ve GelMA prepolimer grupları Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi (Agilent, ABD) kullanılarak 4000-600 cm^{-1} dalga boyu aralığında ölçümler yapılmıştır.

3.2.3. GelMA Hidrojeli Eldesi ve Karakterizasyonu

Işık duyarlı GelMA prepolimeri fotobaşlatıcı ile UV ışık kullanılarak çapraz bağlanmıştır. GelMA hidrojeli eldesi için fonksiyonelleşme derecesi en yüksek olan GelMA prepolimer

grubu kullanılmıştır. GelMA hidrojeli sentezi için Uyanıklar vd. tarafından geliştirilen metot modifiye edilerek kullanılmıştır [107]. Öncelikli olarak I2959 PBS (pH: 7.4) içerisinde %0.5 (a/h) derişimde 40ºC'de hazırlanmıştır. Ağrılıkça farklı miktarda GelMA pre-polimeri çapraz bağlayıcı çözeltisine eklenmiş ve sonike edilmiştir. Homojen pre-jel çözeltisi elde edildikten sonra çözelti 10x10 mm silindirik disklere konulup UV çapraz bağlayıcı (UVP, Almanya) kullanılarak çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlama sonrası reaksiyona girmeyen çapraz bağlayıcının uzaklaştırılması için jeller PBS ile yıkanmıştır. Çizelge 3.4 gruplar ve deney parametreleri hakkında detaylı bilgi vermektedir.

Sentezlenen hidrojeller şişme testi, reoloji analizi, FT-IR, degradasyon testi, temas açısı analizi ve SEM ile karakterize edilmiştir.

Çizelge 3.4. GelMA Hidrojel Sentez Parametreleri.

Hidrojel Grupları	**GelMA Pre-polimer Konsantrasyonu (a/h)**	**Irgacure2959 Konsantrasyonu (a/h)**	**UV Enerji Yoğunluğu (µj/cm^2)**	**Uygulama Süresi (dk)**
J10	%10	%0,5	6900	15
J15	%15	%0,5	6900	15

3.2.3.1. Reoloji Analizi

Jellerin mekanik özellikleri reolojik ölçümler ile belirlenmiştir. Jellerin elastisite modülü (G'), kayıp modülü (G''), faz açısı (ϕ) ve kompleks viskozite değerleri Kinexus Pro+ Reometre (Malvern, UK) kullanılarak 37ºC'de %0,01 gerinim değerinde 1 hz – 10 hz aralığında frekans taraması olarak gerçekleştirilmiştir.

3.3. Hibrit Membran Eldesi

Bölüm 3.1'de elde edilen optimum deselülerize SIS grubu ile bölüm 3.2.3'te kullanılan GelMA pre-polimer grupları hibrit membran eldesi için kullanılmıştır. Bu kapsamda bölüm 3.2.3'te hazırlanmış J10 ve J15 pre-jel çözeltileri aselüler SIS yüzeyine, karanlık ortamda 40ºC fırın (Memmert, Almanya) içerisinde 24 saat inkübe edilerek SIS/GelMA hibrit membranları elde edilmiştir. Çizelge 3.5 SIS/GelMA hibrit membran grupları hakkında bilgi vermektedir.

Çizelge 3.5. SIS/GelMA Hibrit Membran Grupları.

Hibrit Membran Grupları	**GelMA Pre-jel Grupları**	**Aselüler Membran Grubu**	**UV Enerji Yoğunluğu ($\mu j/cm^2$)**	**Uygulama Süresi (dk)**
H1	J10	SCSIS-6	6900	15
H2	J15	SCSIS-6	6900	15

3.3.1. Hibrit Membran Karakterizasyonu

3.3.1.1 FT-IR Analizi

Hibrit membranların ve gelMA hidrojellerin yapısal analizi FT-IR ile gerçekleştirilmiştir. Liyofilize hibrit membranların Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi (Agilent, ABD) kullanılarak 4000-600 cm^{-1} dalga boyu aralığında ölçümü gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak aselüler SIS kullanılmıştır.

3.3.1.2. Şişme Testi

Hibrit membranların ve gelMA hidrojellerin su tutma kapasitelerindeki değişim şişme testi ile analiz edilmiştir. Hibrit membranlar -80ºC'de dondurularak kurutulmuştur. Başlangıç kuru ağırlıkları (W_d) ölçülüp iskeleler 2 mL PBS (pH 7.4) içerisinde oda

sıcaklığında inkübe edilmiştir. 1., 8., 12. ve 24. saat sonlarında ıslak ağrılıkları (Ws) tartılmıştır. Kütlece şişme oranı *Eşitlik 2* kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme Oranı (\%)} = \frac{Ws - Wd}{Wd} \; x \; 100 \qquad \textbf{\textit{Eşitlik 2}}$$

3.3.1.3. Mekanik Analiz

Hibrit membranların mekanik özellikleri çekme testi ile belirlenmiştir. Cell Scale Bimaterial Tester (Cellscale Univert, Kanada) kullanılarak 50N yükleme hücresi ve 10 mm/dk çekme hızı ile çekme analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz için işlem görmemiş hibrit membran grupları 1x1 cm boyutunda kullanılmıştır. Çekme testi ile hibrit membranların çekme dayanımları ve elastisite modülleri tespit edilmiştir. Gerilim-gerinim eğrisinde %10-40 deformasyon aralığında elastisite modülü hesaplanmıştır. Kontrol grubu olarak aselüler SIS kullanılmıştır.

3.3.1.4. SEM Analizi

Hibrit membranların ve gelMA hidrojellerin kesit alanı ve yüzey alanı kullanılarak morfolojik analizleri SEM ile gerçekleştirilmiştir. Liyofilize edilmiş hibrit membranlara 12 nm altın – paladyum (Au-Pd) kaplama yapılarak taramalı elektron mikroskobu (Tescan GAIA 3, Çek Cumhuriyeti) ile görüntülenmiştir. Kontrol grubu olarak aselüler SIS ve GelMA hidrojeli kullanılmıştır.

3.3.1.5 Degradasyon Testi

Aselüler membranların değişen degradasyon özelliklerinin ve hibrit membranların stabilitesinin incelenmesi için *in vitro* enzimatik degradasyon gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda liyofilize hibrit membranların ve aselüler membranların kuru ağırlıkları (w_i) tartılıp 20 U/mL kolejenaz tip A (PBS, pH:7.4) derişimli 2 mL çözeltiye yerleştirilmiştir. Deney ısıtmalı çalkalayıcı (Gerhardt, Almanya) kullanılarak 37ºC'de 30 rpm hızda 24 saat gerçekleştirilmiştir. 1., 4., 8., 12., ve 24. saat örnekleri PBS ile yıkanıp liyofilize edilerek son kuru ağrılıkları (w_f) tartılmıştır. Degradasyon kütle kaybı üzerinden *Eşitlik 3* kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Kütle Kaybı} = \frac{Wi - Wf}{Wi} \; x \; 100 \qquad \textit{Eşitlik 3}$$

3.3.1.6. Temas Açısı Analizi

Hibrit membranların hidrofilisitesi temas açısı analizi ile test edilmiştir. Liyofilize edilmiş hibrit membranlar üzerine 5 uL deiyonize su damlatılarak Attension Theta (Biolin Scientific, İsveç) temas açısı ölçüm cihazı ile yüzey ıslanabilirliği analiz edilmiştir. Kontrol grubu olarak GelMA hidrojeli kullanılmıştır.

3.4. *In Vitro* Çalışmalar

Sinir doku mühendisliği uygulaması için geliştirilen hibrit membranlar için nöroblast hücre tipine sahip PC12 hücre hattı ile *in vitro* hücre kültür çalışması yapılmıştır. Hücre kültürü çalışması ile üretilen hibrit membranların sinir hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ayrıca sinir hücrelerinin üretilen biyomalzeme ile etkileşimi ve davranış biçimi analiz edilmiştir. Bu kapsamda hücre metabolik aktivite ve sitotoksisite analizi, hücre canlılık analizi, hücre yayılma alanı analizi ile hücre ekili malzemenin morfolojik görüntülemesi yapılmıştır.

3.4.1. Kimyasal Malzemeler

Tez kapsamında *in vitro* çalışmalar için PC12 hücre hattı (ATCC, ABD), RPMI-1640 besiyeri (Capricorn, Almanya), at serumu (Capricorn, Almanya), FBS (Capricorn, Almanya), antibiyotik-antimikotik 100x solüsyon (AA) (Capricorn, Almanya), Nuncup™ kolajen tip I kaplı T75 hücre kültür flaskı (Thermofisher, ABD) ,DMSO (Sigma, ABD), canlı/ölü hücre canlılığı test kiti (Sigma, ABD), Alexa Fluor™ 594 Phalloidin (Invitrogen, ABD), alamar mavisi çözeltisi (Invitrogen, ABD), DAPI (), ve etanol (Interlab, Almanya) kullanılmıştır.

3.4.2. PC12 Hücre Kültürü

Hücre kültür çalışmalarında nöroblast hücre tipine sahip PC12 hücre hattı %10 at serumu, %5 FBS ve %0,5 aa içeren RPMI-1640 besiyeriyle Nuncup™ kolajen tip I kaplı T75

hücre kültür flaskı kullanılarak 37ºC ve %5 CO_2 ortamında inkübe edilmiştir. Pasaj 4 hücreleri çalışma için kullanılmıştır.

Sıvı azot tankında bulunan PC12 hücre viali 37ºC'de sıcak su banyosunda (Memmert, Almanya) çözdürülerek 15 mL steril falkona aktarılıp besiyeri ile seyreltilip 220 g de 8 dk. santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırılıp besiyeri ile homojenize edilen hücreler kolajen I kaplı T75 flaska aktarılıp inkübe edilmiştir. Hücre konfluensi gerçekleşince, pasajlama için besiyeri kullanılarak basınçlı yıkama ile hücreler yüzeyden kaldırılıp santrifüj ile çöktürülmüştür. Besiyeri ile homojenize edilip kümelenme eğilimleri sebebi ile 3 kere 21G şırıngadan geçirilip tekrar kolajen I kaplı T75 flaska ekimi yapılmıştır.

Pasajlanan hücreler besiyeri-DMSO (9:1, h/h) dondurma ortamı kullanılarak 1 mL kriyojenik tüplere aktarılıp kullanıma kadar sıvı azot içerisinde saklanmıştır.

3.4.2.1. Hücre Metabolik Aktivite ve Sitotoksisite Analizi

Hibrit doku iskelelerinin sitotoksisite tayini ve PC12 hücrelerinin iskele üzerinde proliferasyonunun incelenmesi için hücre kültürünün 1., 4. ve 7. günlerinde Alamar Mavisi analizi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda 1:10 oranında besiyer-Alamar Mavisi solüsyonu hazırlanmıştır. Belirtilen günlerde doku iskeleleri üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak alamar çözeltisi eklenmiştir. 37ºC ve %5 CO_2 ortamında 4 saat inkübe edilmiştir. Devamında 96 kuyucuklu mikroplaka da 200 µl/kuyucuk olacak şekilde 570/620 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu (Biotek, ABD) ile okuma gerçekleştirilmiştir.

3.4.2.2. SEM Analizi

Hibrit iskele yüzeyinde hücre etkileşimlerinin ve iskele başarısının değerlendirilmesi için hücre kültürünün 1., 4. ve 7. günlerinde SEM analizi yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda belirtilen günlerde besiyeri doku iskelesinden uzaklaştırılarak %4 paraformaldehit kullanılarak 45 dk süreyle hücre fiksasyonu yapılmıştır. Devamında DI ile yıkanan örnekler artan dereceli alkol serisi (%30, %50, %70, %90 ve %100) ile dehidre edilen

örnekler, üzerine HMDS eklenerek çeker ocak altında kurutularak 12 nm Au-PD kaplama yapılıp taramalı elektron mikroskobu (Tescan GAIA 3, Çek Cumhuriyeti) altında görüntülenmiştir

3.4.2.3. Hücre Yayılma Alanı Analizi

Hücrelerin iskele yüzeyinde morfolojisinin incelenmesi ve iskele de yayılma alanlarının tespiti için kültürün 1. ve 7. günlerinde DAPI-Phalloidin boyama yapılmıştır. Belirtilen günlerde iskeleler üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak %4 paraformaldehit ile hücreler 45 dk süreyle fikse edilmiştir. Sonrasında PBS yıkama yapılarak iskeleler %0,5 Triton X-100 ile 20 dk permeabilize edilerek %5 bovine serum albümin (BSA) solüsyonunda 45 dk inkübe edilmiştir. Eş zamanlı olarak %2,5 BSA içerisinde 1:40 oranda Phalloidin 594 boyası hazırlanmıştır. Devamında iskeleler üzerinden BSA solüsyonu uzaklaştırılıp Phalloidin boya solüsyonu karanlık ortamda eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası PBS ile yıkama yapılarak 1:500 derişimde hazırlanan DAPI ile 10 dk muamele edilip görüntüleme yapılmıştır.

3.5. İstatistiksel Analiz

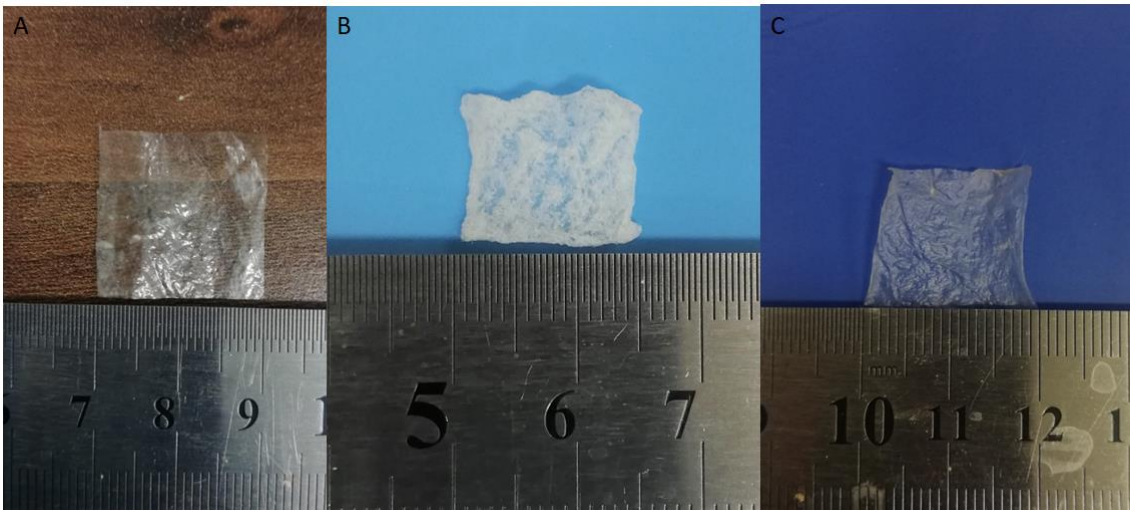
Tez kapsamında elde edilen sonuçlar standart sapma değerleri hesaplanarak verilmiştir (±SS). Tüm gruplarda n=3 örneklem çalışılmış olup 3 ve daha fazla grup karşılaştırılmasında Tek Yönlü Anova, Çift Yönlü Anova testleri kullanılarak istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir. 2 grup karşılaştırılması ise t-test analizi (Welch's t-test) ile gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası farklılık $P > 0,05$ olduğu durumda farklılık yok (ns); * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ ve **** $P < 0,0001$ olduğu durumlarda anlamlı farklılık var olarak değerlendirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında yapılan (1) SIS hücresizleştirme yöntemlerinin optimizasyonu ve karakterizasyonu, (2) GelMA pre-polimer sentezi, karakterizasyonu ve GelMA hidrojeli eldesi ve karakterizasyonu (3) hibrit membran sentezi ve karakterizasyonu ve son olarak (4) PC12 hücre hattı ile *in vitro* çalışmaların sonuçları bu kısımda incelenmiştir.

4.1. Deselülerize İnce Bağırsak Submukoza Eldesi

Tez kapsamında iki farklı metot ile hücresizleştirilen SIS karakterizasyon sonuçları ve karşılaştırılması bu bölümde verilmiştir. Şekil 4.1 işlem görmemiş SIS ve sırasıyla SDS ve $scCO_2$ ile muamele edilmiş SIS görüntülerini göstermektedir.

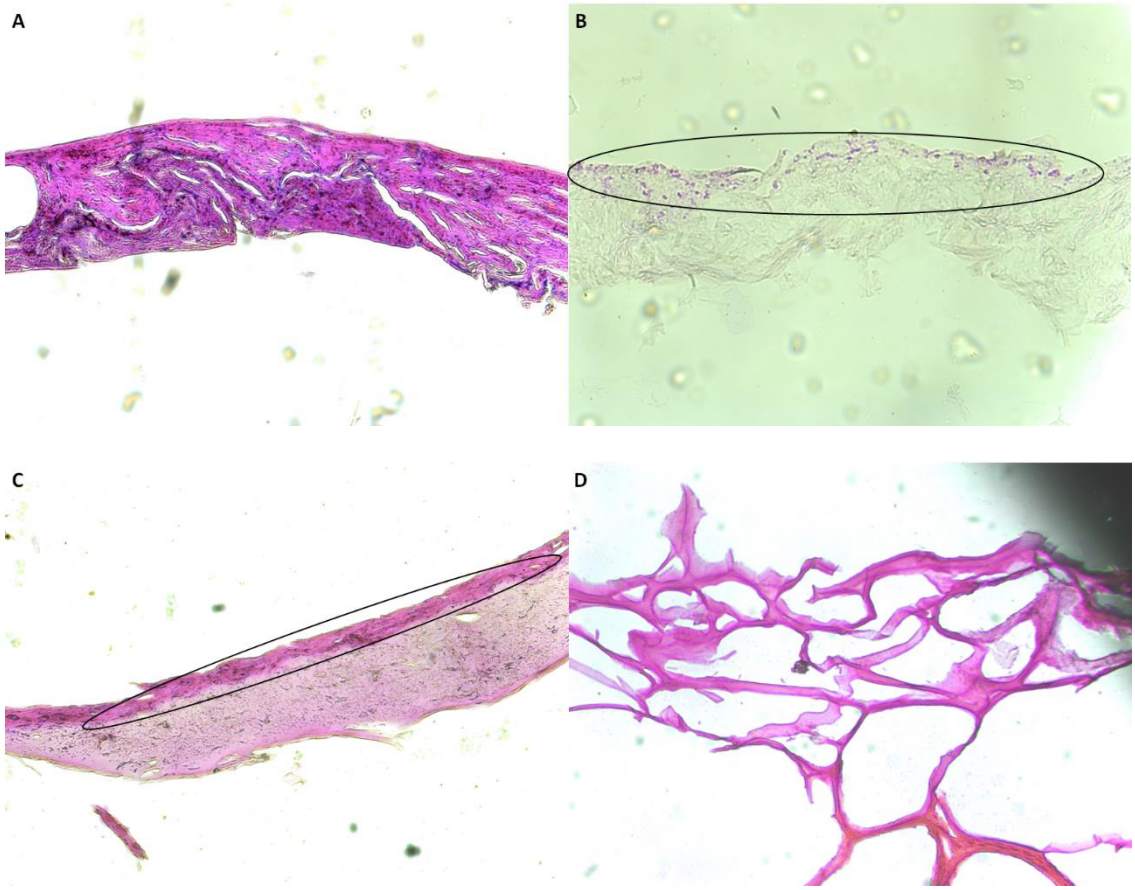


Şekil 4.1. Doğal ve Aselüler SIS. (A) İşlem Görmemiş SIS (B) SDS Muamele SIS (C) $ScCO_2$ Muamele SIS

4.1.1. SIS Kimyasal Deselülerizasyon Protokolü ve Karakterizasyonları

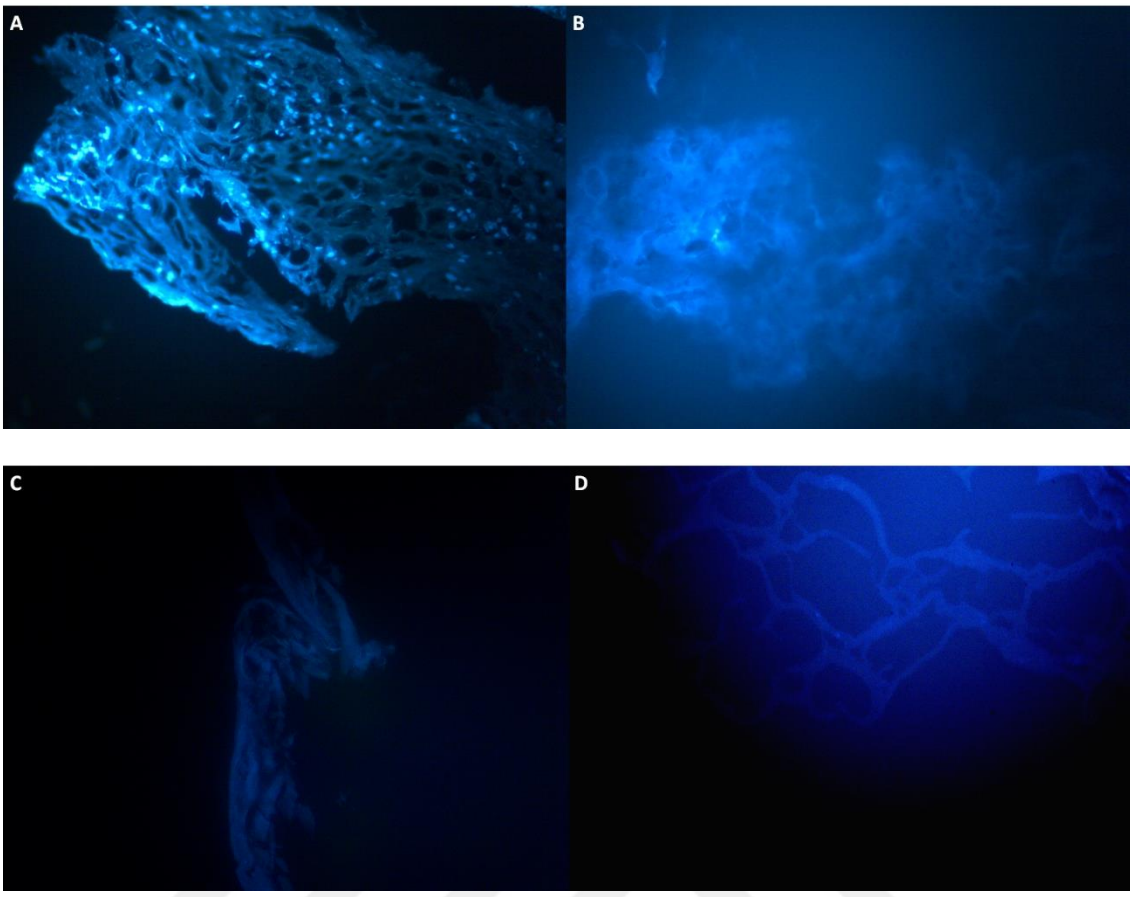
Hücresizleştirme işlemlerinde fiziksel, kimyasal ve enzimatik metotların kombinasyonlarının kullanımının hücresel bileşenlerini uzaklaştırma noktasında etkili bir metodoloji olduğu bilinmektedir [70]. Bu bağlamda SIS hücresizleştirmesi fiziksel yöntemlerle ön muamele sonrası enzimatik ve kimyasal ajanların uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir [108]. Kimyasal yöntem ile aselüler SIS eldesi optimizasyonu için Çizelge 3.1'de verilen gruplar kullanılmıştır. Uygulanan yöntemlerin SIS ECM üzerine

etkisini gözlemlemek için H&E ve DAPI boyamaları yapılmıştır. İşlem görmemiş SIS ve deselülerizasyon gruplarının H&E boyama sonuçları Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. İşlem görmemiş SIS ve deselülerize grupların H&E boyama sonuçları. (A) Kontrol grubu, (B) D1 Grubu, (C) D2 Grubu, (D) D3 Grubu (20X).

Deselülerize gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda doğal doku kaynaklı hücre çekirdeklerinin uygulanan protokol sonucu uzaklaştırılabildiği Şekil 4.2'de gözlemlenebilmektedir. D1 ve D2 grupları incelendiğinde dokularda ECM bütünlüğü korunurken, hücre kalıntıları kontrol grubuna kıyasla azalmış olmakla birlikte yeterli oranda uzaklaştırılamamıştır. Kontrol grubu ve diğer deselülerize gruplara karşı D4 grubu değerlendirildiğinde, hayvan hücresi gözlemlenmemekle beraber ECM yapısında bulunan kolajen fiberlerinin yüksek oranda hasar gördüğü tespit edilmiştir. Şekil 4.3 işlem görmemiş SIS ve deselülerize grupların DAPI boyama sonuçlarını göstermektedir.



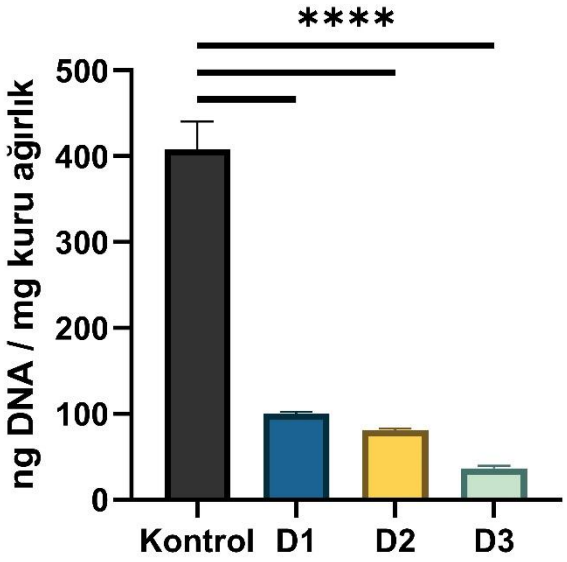
Şekil 4.3. İşlem görmemiş SIS ve deselülerize grupların DAPI boyama sonuçları. (A) Kontrol grubu, (B) D1 Grubu, (C) D2 Grubu, (D) D3 Grubu (20X).

DAPI sonuçlarının H&E sonuçlarını desteklediği Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Kontrol grubunda bozulmamış hücre çekirdekleri görüntülenmiştir. D1, D2 ve D3 gruplarında ise hayvan hücrelerinin uzaklaştırılabildiği Şekil 4.2 ve şekil 4.3'te gözlemlenmektedir. D1 ve D2 gruplarında net bir azalma gözlemlenmekle beraber hücre çekirdeği kalıntıları Şekil 4.2B ve 4.2C'de işaretlenmiş bölgede görüntülenmektedir. D3 grubunda ise etkili bir şekilde hayvan hücrelerinin uzaklaştırılabildiği Şekil 4.2D ve Şekil 4.3D'te gösterilmiştir.

SDS konsantrasyonun arttırılmasının ECM'nin histoyapısal bütünlüğüne zarar vermediği Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Buna karşılık uygulama süresinin iki katına çıkarılması ECM yapısında bulunan kolajen fibrillerin yırtılmasına sebebiyet vermekle beraber hücrelerin uzaklaştırılmasında daha etkili olmuştur [109]. Sonuç olarak SDS uygulamasında süre ve

konsantrasyonun arttırılması hücrelerin efektif bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlamakla birlikte kolajen fiber yapısını parçaladığı gözlemlenmektedir [110].

Hücresizleştirme protokolünün etkinliğinin sayısal bir değerlendirmesi genomik DNA analizi ile gerçekleştirilmektedir. Etkili bir deselülerizasyon prosedüründe, işlem sonrası dokuda artık DNA miktarı mg kuru dokuda 50 ng altında olmalıdır [111]. Şekil 4.4 işlem görmemiş SIS ve deselülerize grupların genomik DNA miktarlarına ait grafiği göstermektedir.

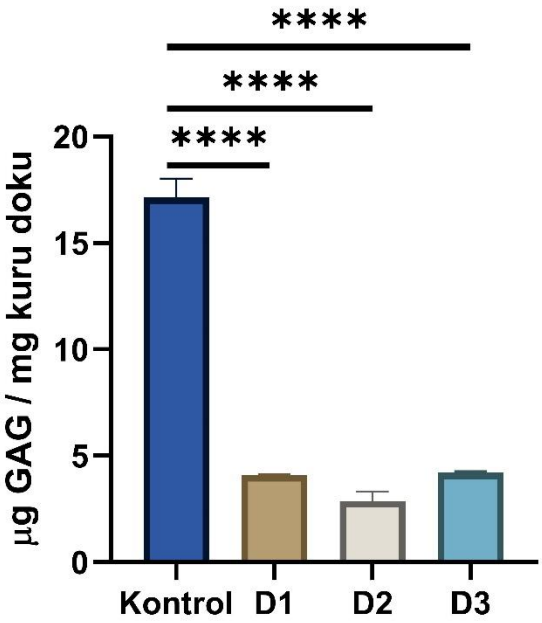


Şekil 4.4. İşlem görmemiş SIS ve deselülerize grupların genomik DNA miktar analizi histogramı. **** $P < 0.0001$.

Kontrol grubu ve deselülerize gruplar için DNA miktarları sırasıyla 408,44±32,29 ng, 100,07±2,02 ng, 80,78±1,76 ng ve 36,27±3,02 ng olarak hesaplanmıştır. Elde edilen DNA miktar analizi sonuçları histoloji sonuçlarını desteklemekle birlikte D3 grubunda hücrelerin %91,12 verimle uzaklaştırıldığını göstermektedir [112].

Hücresizleştirme işleminde uygulanan yöntemin verimini ve ECM hasarını tespit etmekte kullanılan bir diğer analiz ise GAG sayısal analizidir. GAG'ler homeostaz ve onarım süreçlerinde ECM yapısında ve organizasyonunda önemli role sahiptir ve doğal dokularda yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Buna ek olarak hücre proliferasyonu ve

adezyonunda da yüksek öneme sahip ECM komponentleri arasında yer almaktadır [113]. Bu sebeple hücresizleştirme prosesi sonrası dokuda kalan GAG miktarı, uygulanan prosedürün dokuya hasarının değerlendirilmesi noktasında önem arz etmektedir. Ayrıca hücresizleştirme işleminin maksimum verimle ve minimum hasarla gerçekleştirilebilmesi için önemli bir sonuç vermektedir [114]. Şekil 4.5 kontrol grubu ve deselülerize gruplara ait GAG miktar histogramını göstermektedir.



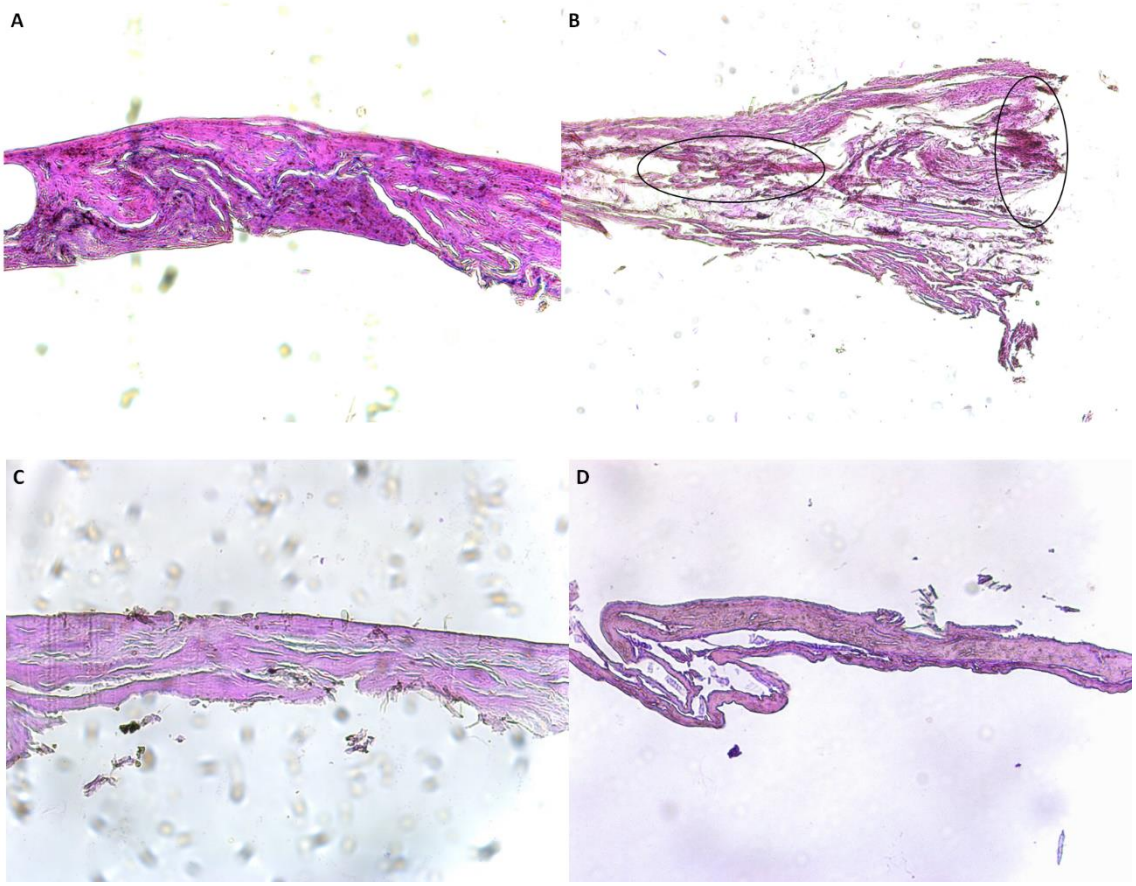
Şekil 4.5. İşlem görmemiş SIS ve deselülerize grupların GAG miktar analizi histogramı. **** P < 0.0001.

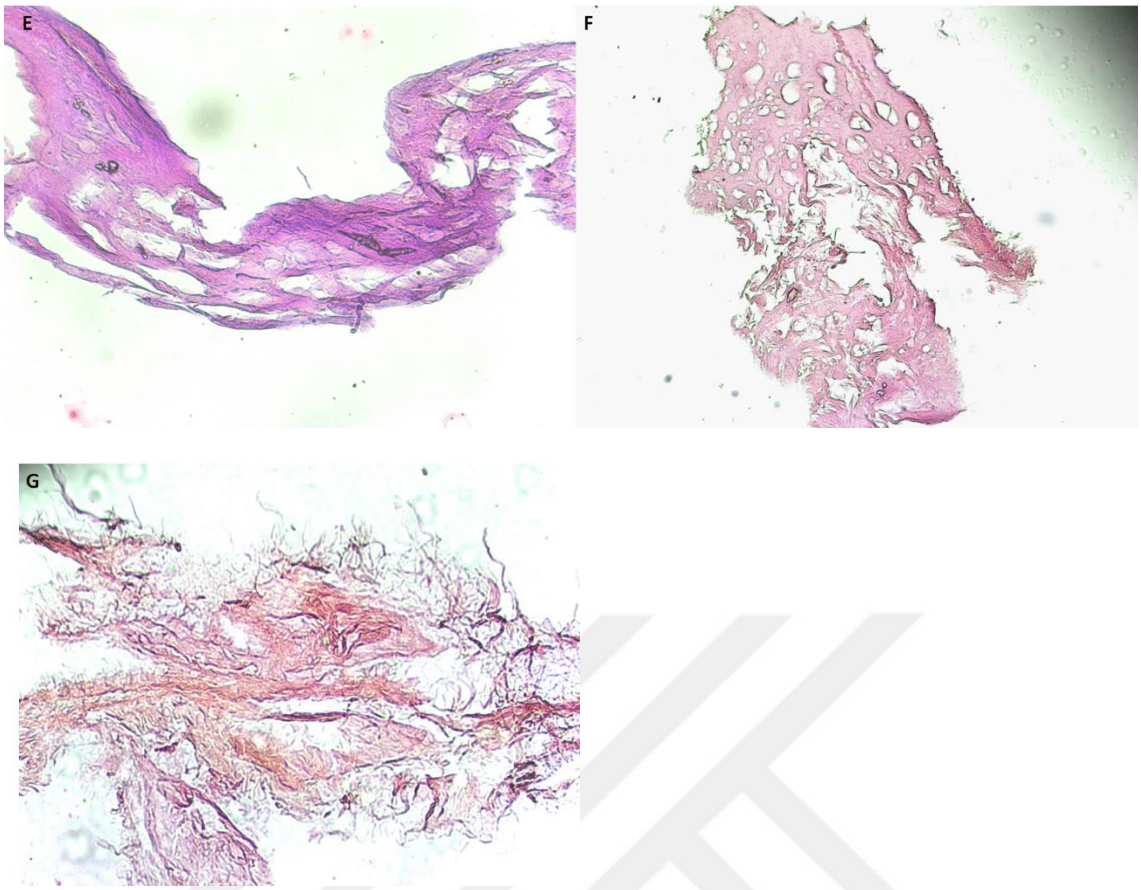
Kontrol ve deselülerize gruplar için GAG miktarları sırasıyla 17,14±0,88 µg, 4,08±0,05 µg, 2,87±0,45 µg ve 4,2±0,0,07 µg olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı fark olduğu görülmekle birlikte deselülerize gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Tüm gruplarda sırasıyla %76,18, %83,26 ve %75,47 oranında GAG miktarlarında azalma gerçekleşmiştir. Uygulanan işlem yüksek oranda GAG kaybına sebebiyet vermiştir. Bu sebeple hücresizleştirme prosedürünün ECM bütünlüğünü ve yapısını koruyamadığı ve bu bağlamda verimin düşük olduğu sonucuna varılmıştır [115].

Sonuçlar değerlendirildiğinde D3 grubu genomik DNA'nın en yüksek oranda uzaklaştırılmış olduğu grup olmuştur. Diğer karakterizasyonlar bu grup ile gerçekleştirilmiştir.

4.1.2. SIS Süperkritik CO_2 Deselülerizasyon Protokolü ve Karakterizasyonları

SIS deselülerizasyonunda fiziksel ve yeni bir hücresizleştirme yöntemi olan süperkritik akışkan kullanılarak hücresizleştirme ön muameleler ile gerçekleştirilmiştir. Önceki bölümde bahsedildiği üzere hücresizleştirme işleminde ön muamele hücresizleştirme ajanının etkisini arttırarak uygulanan işlemin verimini yükseltmektedir. Çizelge 3.2'de verilen gruplar kullanılarak $scCO_2$ ile hücresizleştirme metodu geliştirilmiştir. Şekil 4.6 işlem görmemiş SIS ve $scCO_2$ deselülerize grupların H&E boyama sonuçlarını göstermektedir.



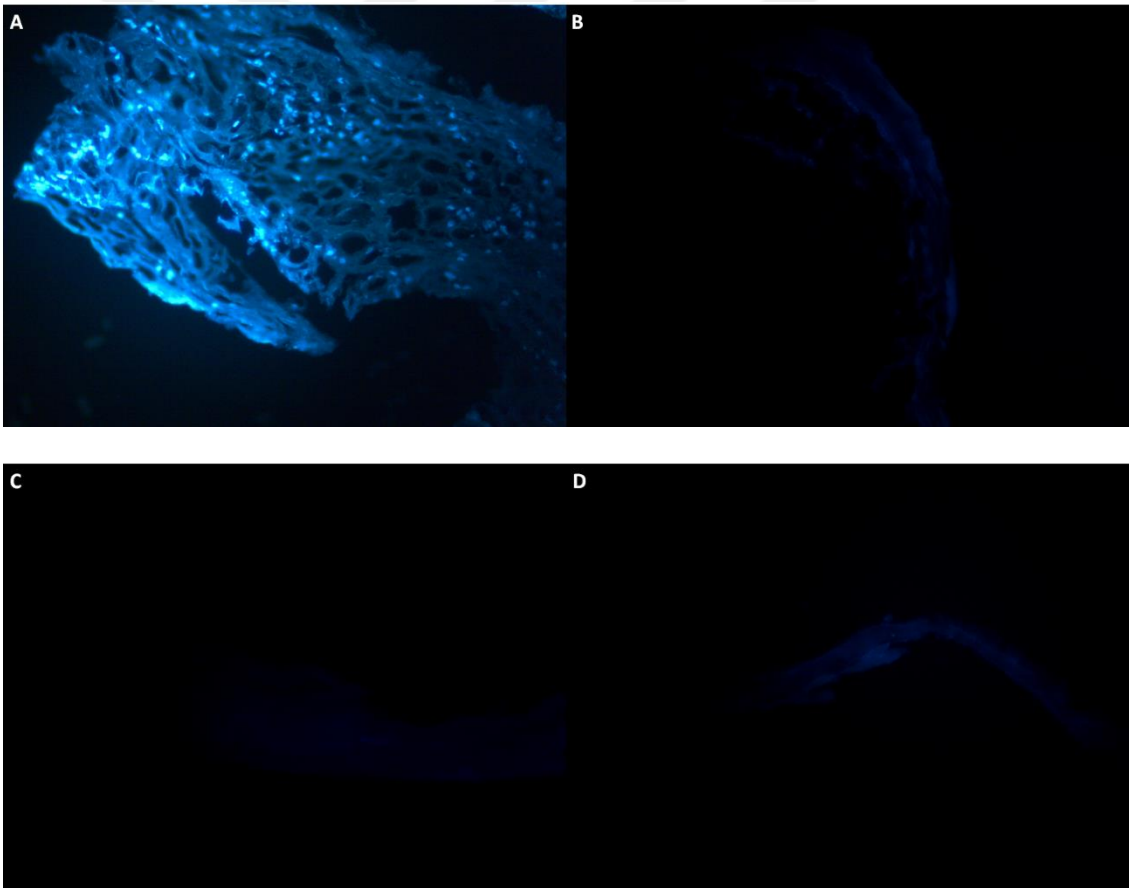


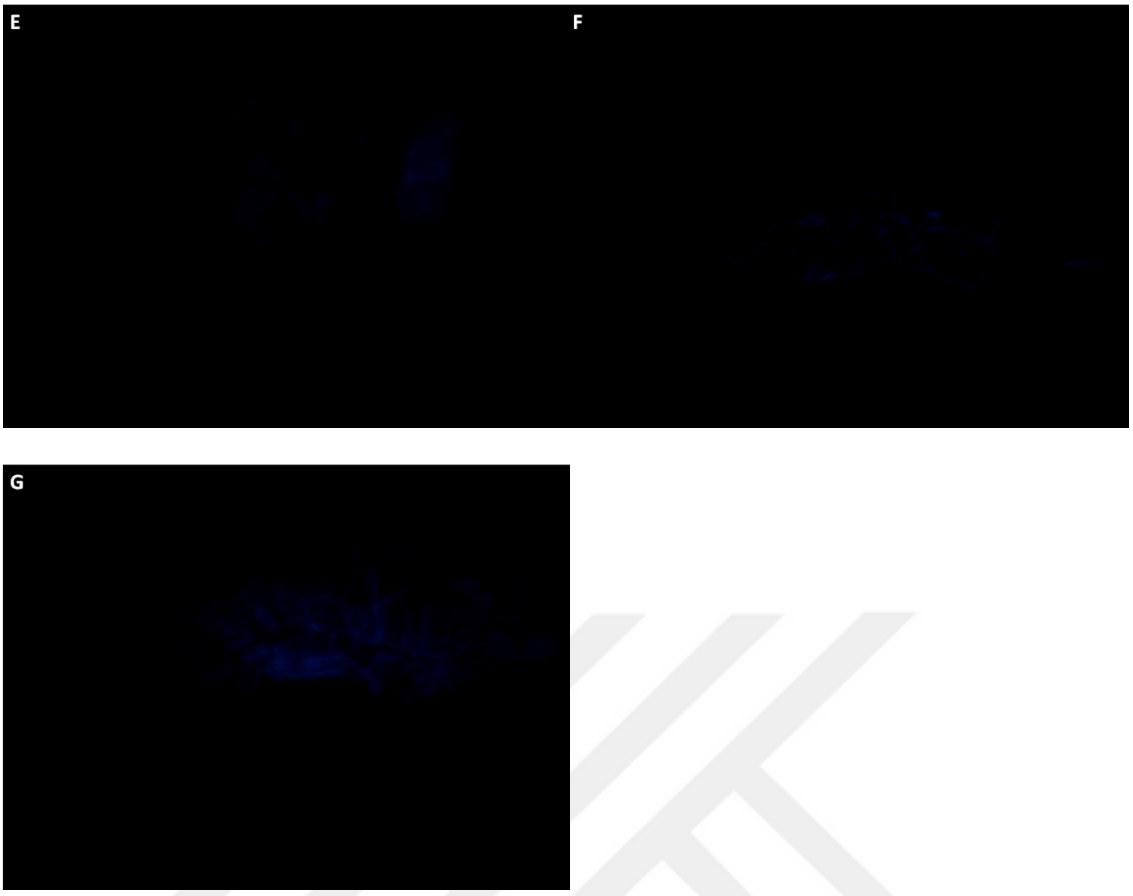
Şekil 4.6 İşlem görmemiş SIS ve scCO2 deselülerize grupların H&E analizi. (A) Kontrol Grubu. (B) SCSIS-1 Grubu. (C) SCSIS-2 Grubu. (D) SCSIS-3 Grubu. (E) SCSIS-4 Grubu (F) SCSIS-5 Grubu (G) SCSIS-6 grubu. Görüntülemeler 20x büyütmede alınmıştır.

Şekil 4.6A değerlendirildiğinde doğal SIS membranının bozulmamış kolajen demetleri ve hücre çekirdekleri gözlemlenmektedir. SCSIS grupları incelendiğinde hücre çekirdeği sayısında azalma görülmekle birlikte kolajen demetlerinde açılma ve ECM dokusunda düzleşme göze çarpmaktadır (Şekil 4.6B-E). Kontrol grubu ve SCSIS-1 grupları karşılaştırıldığında hücre çekirdek yoğunluğu azalmış olmakla birlikte kolajen demetlerde gevşeme görülmektedir (Şekil 4.6A-B). Bu durum SCSIS-1 grubunda uygulanan basınç değerinin hücreleri uzaklaştırmak için yetersiz olduğunu desteklemektedir [116]. Ayrıca ECM histokimyasal yapısında yırtılmalar dikkat çekmektedir. Basıncın yükseltilerek optimize edildiği SCSIS-2 ve SCSIS-3 gruplarında hayvan hücrelerinde azalma gerçekleşmiştir (Şekil 4.6C-D). Kolajen demetlerinin açılmış olması ve çekirdek bulunmaması, 4500psi basınç uygulamasının hayvan hücrelerini uzaklaştırdığının göstergesi olarak değerlendirilmektedir [83]. Ayrıca uygulama

süresinin SCSIS-3 grubunda üç katına çıkartılmış olmasının yine ECM yapısına zarar vermediği gözlemlenmektedir (Şekil 4.6D). Buna ek olarak uygulanan ön işlemlerin ECM'nin yoğun kolajen demetlerini gevşetmede etkili olduğunu ve $scCO_2$'nin doku penetrasyonunu arttırdığı SCSIS-4, SCSIS-5 ve SCSIS 6 gruplarında gözlemlenmekle birlikte hayvan genomik DNA kalıntısı olmadığı görülmektedir (Şekil4.6E-G**)**. Tüm gruplar göz önüne alındığında SCSIS-4, SCSIS-5 ve SCSIS-6 gruplarında hayvan hücresi kalıntısı gözlemlenmemektedir. SIS dokusunda ilk defa uygulanan $scCO_2$ yönteminin, konvansiyonel yönteme kıyasla ECM histoyapısına hasarının daha az olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 4.5, Şekil 4.6) [117].

Tez kapsamında işlem görmemiş doğal doku ve Çizelge 3.2'de verilen $scCO_2$ gruplarının DAPI boyama sonuçları Şekil 4.7'de verilmiştir.

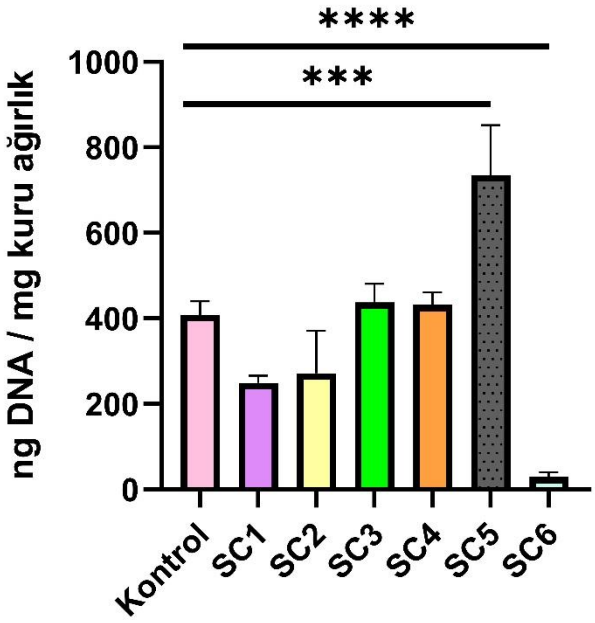




Şekil 4.7. Doğal SIS ve SCSIS gruplarının DAPI boyama görüntüleri. (A) Kontrol Grubu. (B) SCSIS-1 Grubu. (C) SCSIS-2 Grubu. (D) SCSIS-3 Grubu. (E) SCSIS-4 Grubu (F) SCSIS-5 Grubu (G) SCSIS-6 Grubu

Optimizasyon gruplarında uygulanan her işlemle hayvansal hücrelerin doğrusal olarak azaldığı uygulanan işlemlerin verimi arttırdığını ifade etmektedir. Buna ek olarak ECM yapısının fibril demetlerinin açılması scCO2'nin dokuya penetre edebildiğini ve hücreleri lizise uğrattığının kanıtı olarak değerlendirilmektedir (Şekil 4.7).

$ScCO_2$ gruplarında hücresizleştirme verimi genomik DNA analizi ile yapılmıştır. Şekil 4.8 $scCO_2$ gruplarının genomik DNA miktar grafiğini göstermektedir.



Şekil 4.8. Kontrol grubu ve $scCO_2$ grupları DNA miktar histogramı. **** P < 0.0001, *** P < 0.001.

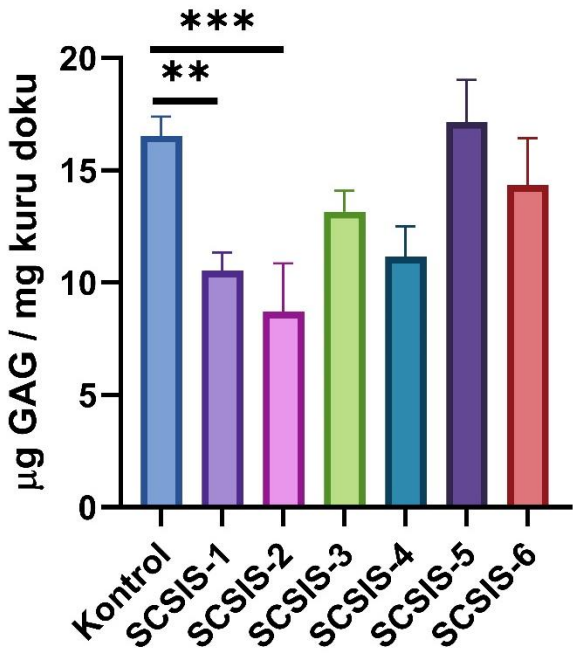
Şekil 4.8 değerlendirildiğinde en verimli scCO2 protokolünün SCSIS-6 grubunda olduğu görülmektedir. DNA miktarının 29,52 ng olarak bulunması etkili bir hücresizleştirme protokolü olduğunun göstergesidir. Çizelge 4.1 optimizasyon gruplarındaki DNA azalma miktarını vermektedir.

Çizelge 4.1. Kontrol Grubu ve Deselülerize Grupların Genomik DNA miktarı ve Azalma Yüzdeleri.

	DNA Miktarı (ng DNA / mg kuru doku)	**Yüzde Azalma (%)**
Kontrol	408,44 ± 32,28	-
SCSIS-1	249,95 ± 15,89	38,8
SCSIS-2	272,18 ± 99,06	33,36
SCSIS-3	438,06 ± 42,89	-
SCSIS-4	472,14 ± 88,37	-
SCSIS-5	735,79 ± 116,41	-
SCSIS-6	29,52 ± 11,29	92,77

Çizelge 4.1'de verilen bilgiler değerlendirildiğinde uygulama süresinin arttırılması ile DNA miktarında artış olduğu gözlemlenmiştir. İşlem görmüş grupta, kontrol grubuna kıyasla daha fazla DNA miktarı gözlemlenmesinin sebebinin kontrol grubunun sıkı kolajen demetlerinin hücreleri koruyarak proteinaz K ile yeterli oranda parçalanamamasından kaynaklanmaktadır. Sonuçlar doğrultusunda proteolitik parçalama da enzim konsantrasyonunun yetersiz olduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir [118]. Optimizasyon gruplarında ön işlem uygulaması ile dokuda bulunan kolajen demetleri gevşetilerek hücresizleştirme ajanının dokuya daha iyi penetre olması sağlanarak hücre lizisi veriminin arttırılması sağlanmıştır. Lizis sonrası hücre kalıntılarının uzaklaştırılamaması işlem görmüş gruplardaki DNA miktar artışının bir diğer sebebi olarak değerlendirilmektedir (Çizelge 4.1) [119]. Süperkritik akışkan sonrası açığa çıkan DNA'nın uzaklaştırılması için endonükleaz enzimi kullanımı bu durumun oluşumunu engeller nitelikte olmakla birlikte ECM hasarına sebebiyet vermemektedir [120]. Sonuçlar bu hipotezi desteklemektedir.

Uygulanan $scCO_2$ protokollerinin doku hasarının sayısal analizi GAG miktar tayini ile yapılmıştır. Şekil 4.9 kontrol grubu ve SCSIS gruplarının GAG miktarlarını göstermektedir.



Şekil 4.9. Kontrol grubu ve scCO2 gruplarının GAG miktarları. *** P < 0.001, ** P < 0.01.

Kontrol grubuna karşılık SCSIS-1 ve SCSIS-2 grupları karşılaştırıldığında GAG miktarında anlamlı bir azalma gerçekleşmiştir. SCSIS-3, SCSIS-4, SCSIS-5 ve SCSIS-6 gruplarında GAG kaybının diğer iki gruba göre daha az olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 4.9). Çizelge 4.2 kontrol grubu ve SCSIS gruplarının GAG miktarı ve azalma yüzdelerini vermektedir.

Çizelge 4.2. Kontrol Grubu ve SCSIS Grupları GAG Miktarı ve Azalma Yüzdeleri.

	GAG Miktarı (µg GAG / mg kuru doku)	**Yüzde Azalma (%)**
Kontrol	16.54 ± 0,85	-
SCSIS-1	10.52 ± 0.82	36.37
SCSIS-2	8.71 ± 2.15	47.34
SCSIS-3	13.16 ± 0.93	20.42
SCSIS-4	11.15 ± 1.36	32.6
SCSIS-5	17.16 ± 1.87	-
SCSIS-6	14.33 ± 2.2	2.08

Elde edilen sonuçlar çerçevesinde ön işlem ve yüksek basınç uygulamasının SIS üzerinde yüksek hasara sebebiyet vermediği gösterilmiştir. ECM yapısının korunması (Şekil 4.6), etkili bir şekilde genomik DNA'nın uzaklaştırılması (Şekil 4.7) ve GAG miktarının yüksek oranda korunması (Şekil 4.9) değerlendirildiğinde $scCO_2$ deselülerizasyon yönteminin SIS için uygun bir hücresizleştirme yöntemi olduğu kanıtlanmıştır.

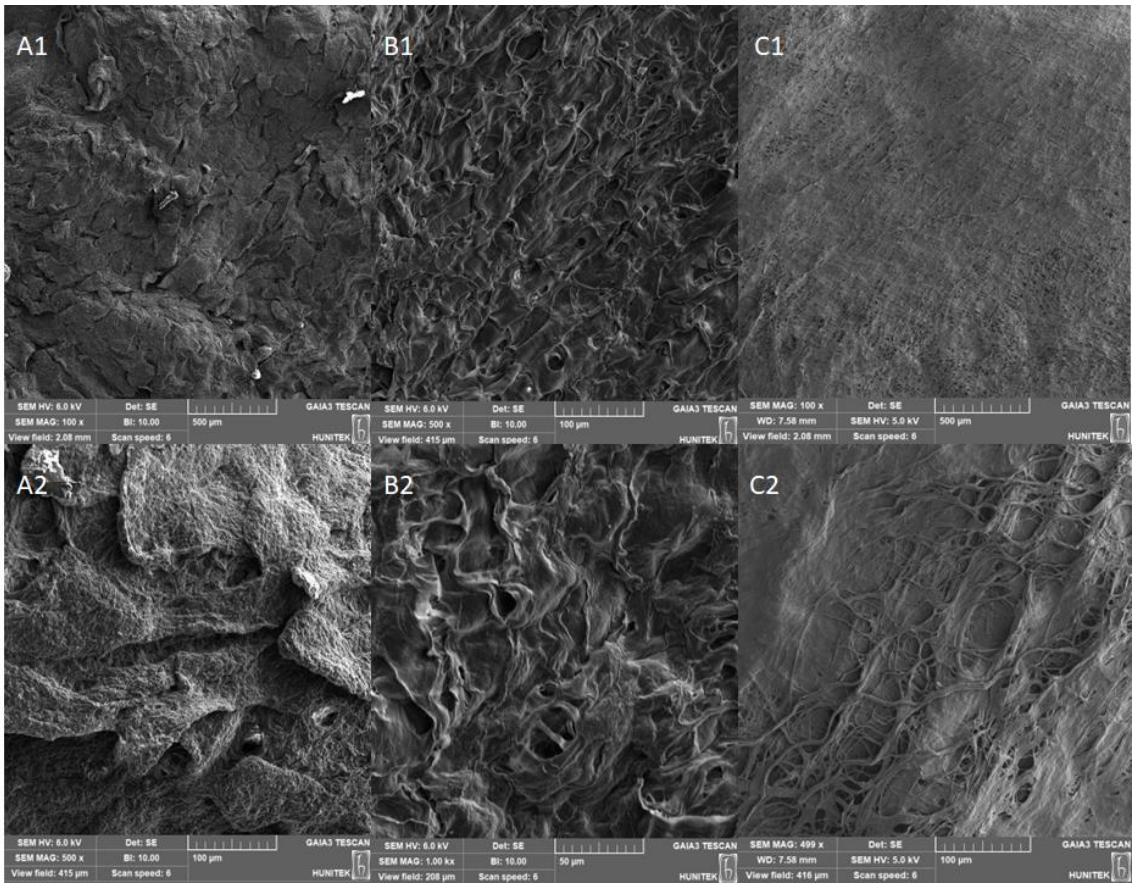
Sonuçlar değerlendiğinde $scCO_2$ protokollerinde en etkili grubun SCSIS-6 olduğu görülmektedir. Diğer karakterizasyonlar SCSIS-6 grubu ile gerçekleştirilmiştir.

4.1.3. SIS Deselülerizasyon Metotlarının Karşılaştırılması

D3 ve SCSIS-6 grupları kullanılarak SEM, mekanik analiz ve sitotoksisite analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak SIS deselülerizasyonunda en uygun protokol belirlenmiştir.

4.1.3.1. SEM Karakterizasyonu

Kontrol grubu ve deselülerize grupların yüzey mikroyapıları SEM ile incelenmiştir. Şekil 4.10 tüm gruplara ait SEM sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 4.10: Kontrol ve deselülerize örneklerin SEM görüntüleri. A1) Kontrol grubu 100X büyütme, A2) Kontrol grubu 500X büyütme, B1) D3 grubu 500X büyütme, B2) D3 grubu 1000X büyütme, C1) SCSIS-6 grubu 500X büyütme, C2) SCSIS-6 grubu 1000X büyütme.

Şekil 4.10A1-A2 incelendiğinde işlem görmemiş kontrol grubu yüzeyinde endotel hücre tabakası ve düzenli kolajen fiber yapısı görülmektedir. D3 grubunda daha pürüzsüz bir yüzey görülmekle birlikte, kolajen fiber demetlerinin gevşediği görülmektedir (Şekil 4.10B1-B2). Ayrıca kolajen fiberler arası boşluğun artması ve bazı bölgelerde kolajen dokunun bozulduğu gözlemlenmektedir (Şekil 4.10B1-B2). D3 grubunda yüksek oranda GAG azalması bunun sebebi olarak görülmektedir [114]. SCSIS-6 grubu incelendiğinde kolajen demetlerinin daha düzenli bir yapıda olduğu ve D3 grubu ile kıyaslandığında yüzeyinin daha pürüzlü olması kolajen fiberlerinin demet formunu daha iyi koruduğunu

göstermektedir (Şekil 4.10C1-C2). SCSIS-6 grubunda membran yapısındaki yırtılmaların D3 grubuna kıyasla daha az olduğu göze çarpmaktadır (Şekil 4.10B2 – C2).

4.1.3.2. Mekanik Analiz

Tez kapsamında kontrol grubu, D3 ve SCSIS-6 gruplarının kuru örnekleri kullanılarak mekanik özelliklerinin değişimi çekme testi ile incelenmiştir. Çizelge 4.2 gruplara ait elastik modülüs, çekme mukavemeti ve uzama değerlerini vermektedir.

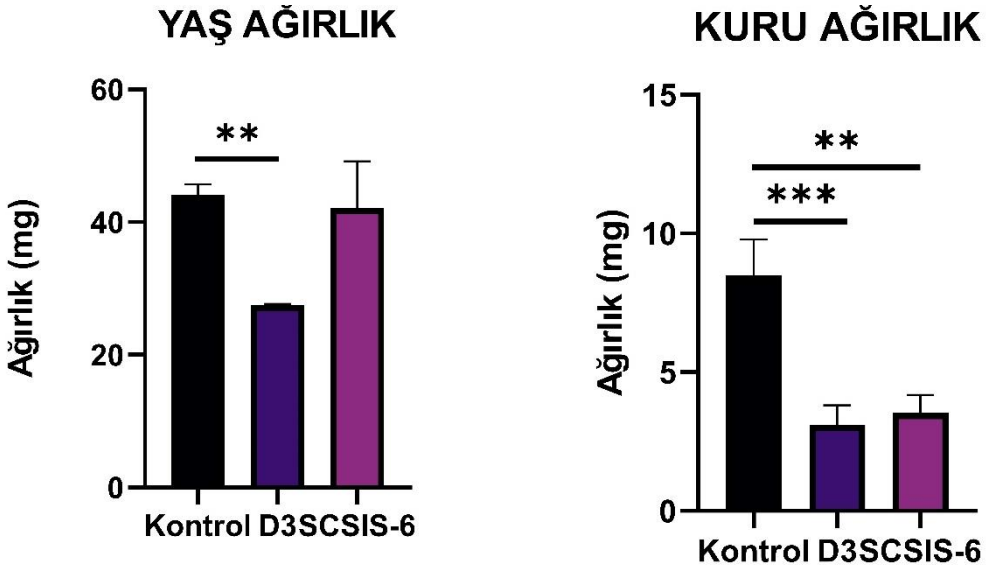
Çizelge 4.3. İşlem Görmemiş ve Deselülerize Grupların Çekme Dayanımı (kPa), % Uzaması ve Elastik Modülü (kPa).

Örnek	**Elastik Modül (kPa)**	**Çekme Mukavemeti (kPa)**	**% Uzama**
Kontrol	5,467 ± 0,62	12,41 ± 0,46	17,96 ± 0,62
D3	4,984 ± 1,74	7,43 ± 13,42	5,24 ± 2,95
SCSIS-6	4,066 ± 0,22	8,83 ± 1,56	15,49 ± 0,62

Kontrol ve deselülerize grupların elastik modülü, çekme mukavemeti ve uzama değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Uygulanan hücresizleştirme protokolleri dokuda anlamlı bir mekanik hasara sebebiyet vermemiştir [121].

4.1.3.3. Yaş ve Kuru Ağırlık Değişimi Analizi

Uygulanan deselülerizasyon protokollerinin doku da sebep olduğu ağırlık değişiminin analizi işlem öncesi ve işlem sonrası dokuların yaş ağırlıkları ile liyofilizasyon sonrası kuru ağırlıklarının tartılması ile incelenmiştir. SCSIS-6 ve D3 deselülerize gruplarında elde edilen sonuçlar kontrol grubu olarak işlem görmemiş doku ile karşılaştırılmıştır. Şekil 4.11 gruplara ait yaş ve kuru ağırlık değişimini göstermektedir.



Şekil 4.11. Kontrol Grubu ve Deselülerize Grupların Yaş ve Kuru Ağırlık Değişimleri. (** P < 0,01, *** P < 0,001).

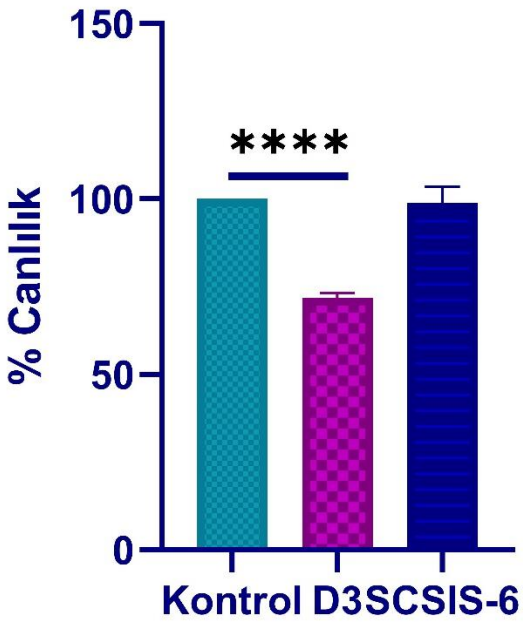
Kontrol grubu, D3 grubu ve SCSIS-6 gruplarının kuru ağırlıkları sırasıyla 8,5 ± 1,27 mg, 3,1 ± 0,7 mg ve 3,55 ± 0,65 mg olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.11 değerlendirildiğinde her iki deselülerizasyon grubunda da kuru ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı azalma gerçekleşmiştir. Kuru ağırlıkta azalma hücresizleştirme işlemi sonucu ECM de bulanan yapısal olmayan ve genomik proteinlerin uzaklaşmış olduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Buna ek olarak D3 ve SCSIS-6 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir. D3 grubunda ve SCSIS-6 grubunda sırasıyla %63,53 ve %58,23 oranında kuru ağırlık kaybı meydana gelmiştir.

Yaş ağırlık değişimi incelendiğinde kontrol grubu ve D3 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmakla beraber kontrol grubu ve SCSIS-6 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 4.11). Kontrol grubu, D3 grubu ve SCSIS-6 gruplarının liyofilizasyon öncesi yaş ağırlıkları sırasıyla 44,06 ± 1,66 mg, 22,56 ± 8,63 mg ve 42,15 ± 7,05 mg ve su tutma kapasiteleri ise sırasıyla %80,76 ± 2,2, %85,44 ± 3,23 ve %91,59 ± 0,13 olarak elde edilmiştir. Deselülerizasyon işlemi sonrası yapısal olmayan proteinlerin uzaklaşması su tutma kapasitesini arttırıcı etkiye sebebiyet vermiştir [122].

D3 grubu için yaş ve kuru ağırlık değişimleri incelendiğinde uygulanan yöntemin ECM'de sebep olduğu hasar dikkat çekmektedir. Elde edilen GAG miktar analizi ve histolojik boyama sonuçları birbirini desteklemektedir. SCSIS-6 grubunda ise yaş ve kuru ağırlık incelendiğinde ECM hasarının D3 grubuna kıyasla daha az olduğu düşünülmektedir. GAG miktar tayini ve histolojik boyamalar birbirini ve sonuçları destekler nitelikte olup hipotezi doğrulamaktadır.

4.1.3.4. *In Vitro* Sitotoksisite Analizi

SCSIS-6 ve D3 deselülerize grupların hücre canlılık analizleri MTT testi ile incelenmiştir. Şekil 4.11 sitotoksisite analizi sonuçlarını vermektedir. Kontrol grubu olarak besiyerinde inkübe edilen L929 hücreleri kullanılmıştır.



Şekil 4.12. Deselülerize Grupların % Canlılık Analizi. **** P < 0,0001

Hücre canlılık oranı D3 ve SCSIS-6 gruplarında sırasıyla % 71,82 ± 0,04 ve % 99,17 ± 0,11 olarak hesaplanmıştır. Bir malzemenin biyouyumlu olarak kabul edilebilmesi için hücre canlılık oranı minimum %70 olmalıdır. D3 grubu sitotoksik özellik göstermemekle beraber hücre canlılık oranında kontrol ve SCSIS-6 grubuna kıyasla anlamlı fark bulunmaktadır. Hücresizleştirme işlemi sonrası SDS'nin dokudan başarılı bir şekilde uzaklaştırılamamış olması hücre canlılık oranını düşürmüştür [108]. SCSIS-6 grubu ise

yüksek biyouyumluluk göstermektedir. Hücre canlılık oranında kontrol grubu ile anlamlı bir farklı olmaması bu hipotezi desteklemektedir [123].

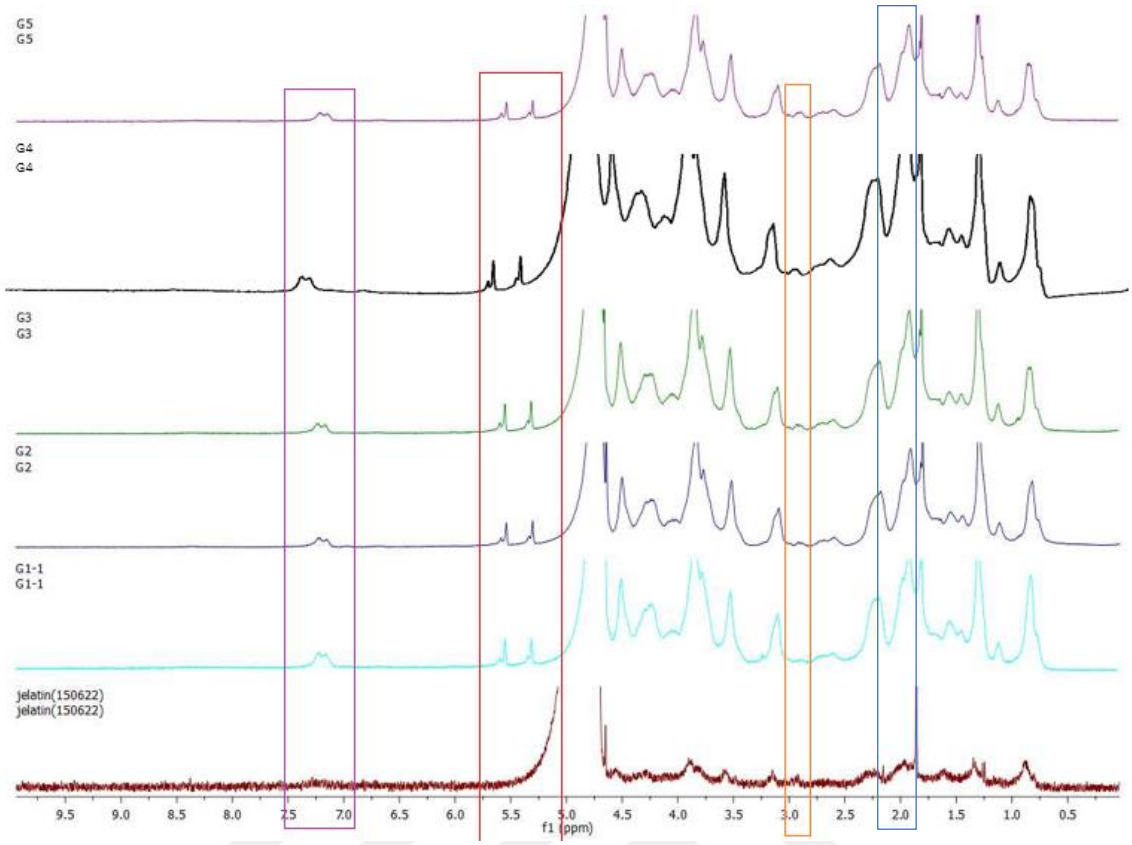
Deselülerizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen histolojik, biyokimyasal, morfolojik ve *in vitro* sonuçlar değerlendirildiğinde SCSIS-6 grubu hibrit membran eldesi için seçilmiştir.

4.2. GelMA Sentezi ve Hidrojeli Eldesi

Bu bölümde tez kapsamında hibrit membran eldesinde kullanılmak üzere sentezlenen GelMA pre-polimeri ve hidrojellerinin üretim süreci optimizasyonu gerçekleştirilmiş olup karşılaştırılması yapılmıştır.

4.2.1. GelMA Prepolimer Karakterizasyonu

GelMA fonksiyonelleşme derecesi daha önce bahsedildiği gibi şişme, rijidite, mekanik dayanım gibi fiziksel özellikleri etkilemektedir. Bu bağlamda Çizelge 3.3'te verilen GelMA pre-polimer gruplarında modifikasyon derecesi (MD) ^{1}H-NMR analizi ile belirlenmiştir. Şekil 4.13 jelatin ve GelMA pre-polimer gruplarına ait ^{1}H-NMR spektrumlarını göstermektedir.



Şekil 4.13. Jelatin ve GelMA Prepolimer Grupları ^{1}H-NMR Spektrumu.

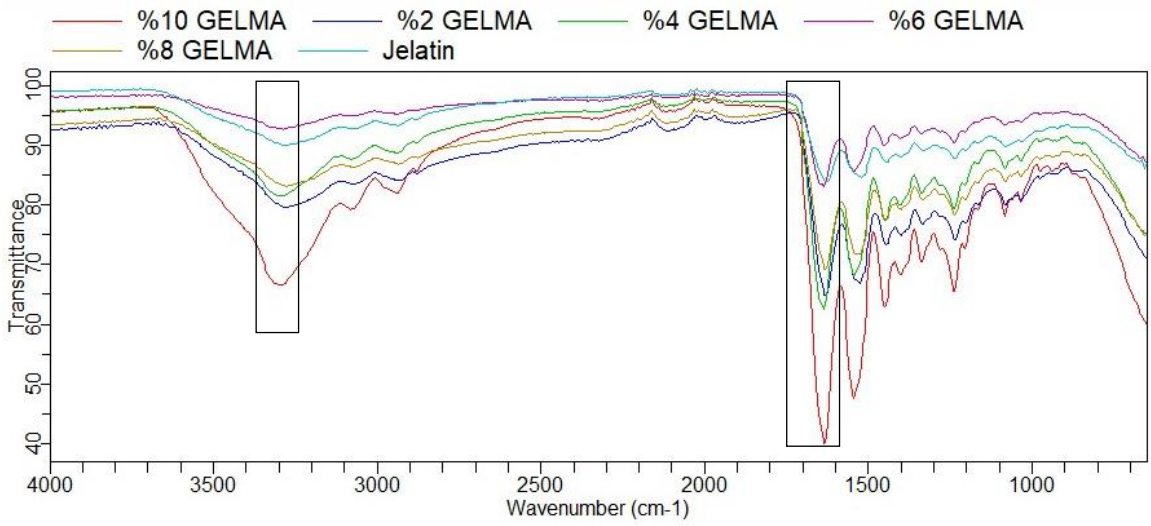
Şekil 4.13 incelendiğinde 5.4 ppm, 5.7 ppm ve 1.99 ppm de oluşan yeni pik sinyalleri artışı jelatinin başarılı bir şekilde modifiye edildiğinin göstergesidir [124]. 5.4 ppm ve 5.7 ppm de oluşan pik metakrilik anhidrit yapısında bulunan metakrilat vinil protonlarını ifade etmektedir. 1.99 ppm de oluşan pik ise metakrilik asidin metil gruplarını göstermektedir. Buna ek olarak 2.8-3 ppm arası lizin sinyali metilen protonu pik sinyal azalması modifikasyonun derecesini vermektedir [125]. Metakrilik asit konsantrasyonu ile 2,8-3 ppm sinyal alanında ters orantılı olarak azalma gözlemlenmektedir. MD derecesi Bölüm 3.2.2.1. de verilen *Eşitlik 1* kullanılarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.4 GelMA pre-polimer MD sonuçlarını vermektedir.

Çizelge 4.4. GelMA Prepolimer Fonksiyonelleşme Derecesi.

Sentez Grupları	**Modifikasyon Derecesi %**	**Metakrilik Anhidrat Konsantrasyonu**
G1	75,76	%10
G2	74,31	%8
G3	33,3	%6
G4	24,44	%4
G5	8,75	%2

Artan metakrilik anhidrit konsantrasyonu ile MD arasında doğru orantı gözlemlenmektedir (Çizelge 4.4). Yüksek MD değeri reolojik olarak mekanik dayanımı yüksek ve termostabilitesi yüksek jel eldesi sağlamaktadır [126].

GelMA pre-polimer gruplarında yapısal analiz FT-IR ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.14 GelMA pre-polimer grupları FT-IR spektrumlarını göstermektedir.



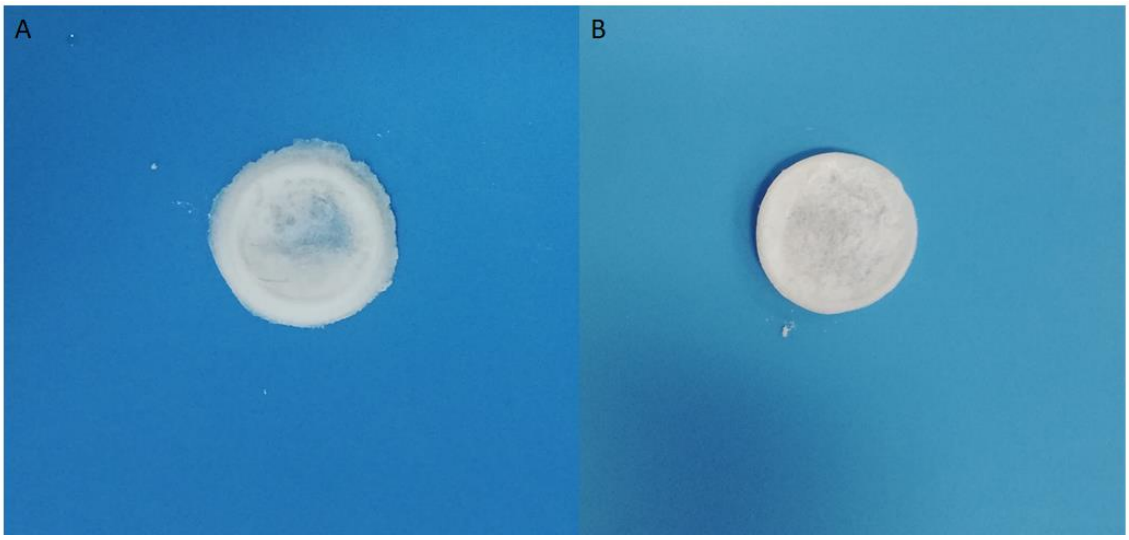
Şekil 4.14. Jelatin ve GelMA Pre-polimer FT-IR Spektrumu

Şekil 4.14 değerlendirildiğinde jelatinin yapısından kaynaklı olarak metakrilat değişimi FT-IR spektrumunda net bir şekilde görüntülenememektedir. Jelatin doğal bir polimer olarak kimyasal yapısında çok fazla peptit zinciri bulundurmaktadır. MA modifikasyonun bu protein gruplarının %5'inden daha azında gerçekleşmesi fonksiyonelleşmenin FT-IR spektrumunda belirgin bir bağ yapısı göstermesini engeller niteliktedir [127]. Jelatinde 3280 cm^{-1} pikinde gözlemlenen N-H amin bağı esnemesi GelMA pre-polimer gruplarında 3295 cm^{-1} dalga boyunda gözlemlenmektedir. Ayrıca pik şiddetlerinin GelMA pre-polimer gruplarında metakrilik asit konsantrasyonuyla artış göstergesi metakrilik asit modifikasyonunun bir diğer indikatörü olarak kabul edilmiştir [127]. Buna ek olarak 1625 cm^{-1} gözlemlenen amit bağının pikinin artması bu hipotezi destekler niteliktedir. Bu sebeple FT-IR spektrumu GelMA yapısal analizinde yetersiz olsa da ^{1}H-NMR sonuçlarını destekler niteliktedir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde en yüksek MD oranı gözlemlenen G1 grubu hidrojel sentezi için seçilmiştir.

4.2.2. GelMA Hidrojel Karakterizasyonu

Işıl-duyarlı GelMA pre-polimeri Çizelge 3.4'te verilen parametreler kullanılarak foto-başlatıcı ile UV ışık altında kovalent çapraz bağlanmıştır. Şekil 4.14 liyofilize hidrojelleri göstermektedir.

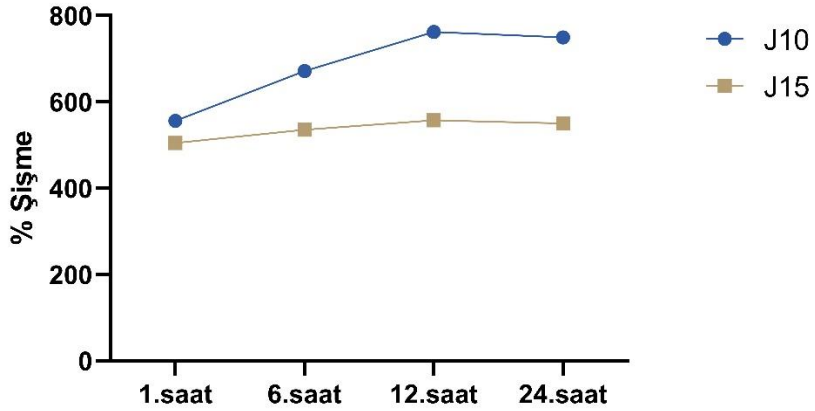


Şekil 4.15. Liyofilize GelMA hidrojeli. (A) J10 Grubu (B) J15 Grubu

Foto-başlatıcı olarak Irgacure2959 %0.5 (a/h) konsantrasyonda çapraz bağlama için kullanılmıştır. Irgacure2959 bilinen en düşük toksisiteye sahip foto-başlatıcı olarak en çok tercih edilen UV çapraz bağlayıcıdır [128].

4.2.2.1. Şişme Testi

Hidrojeller de şişme kapasitesi çapraz bağlanma derecesini, mekanik ve difüzyon özelliklerini ve degradasyon oranını etkilemekle birlikte bahsedilen özellikler hakkında da bilgi vermektedir. Çizelge 3.4'te verilen gruplar kullanılarak şişme testi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16. J10 ve J15 Hidrojellerinin Şişme Oranı. * P <0,05.

J10 ve J15 jelleri şişme oranları arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Konsantrasyonun artması ile jel şişme oranın da anlamlı bir azalma gerçekleşmiştir. Konsantrasyonun artması çapraz bağlanma gerçekleştiren metakrilik asit serbest grup sayısını artırarak çapraz bağlanma derecesini yükselterek su tutma kapasitesini azaltmıştır [129]. Bu durum çapraz bağlanmanın etkinliğinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

4.2.2.2. Reoloji Analizi

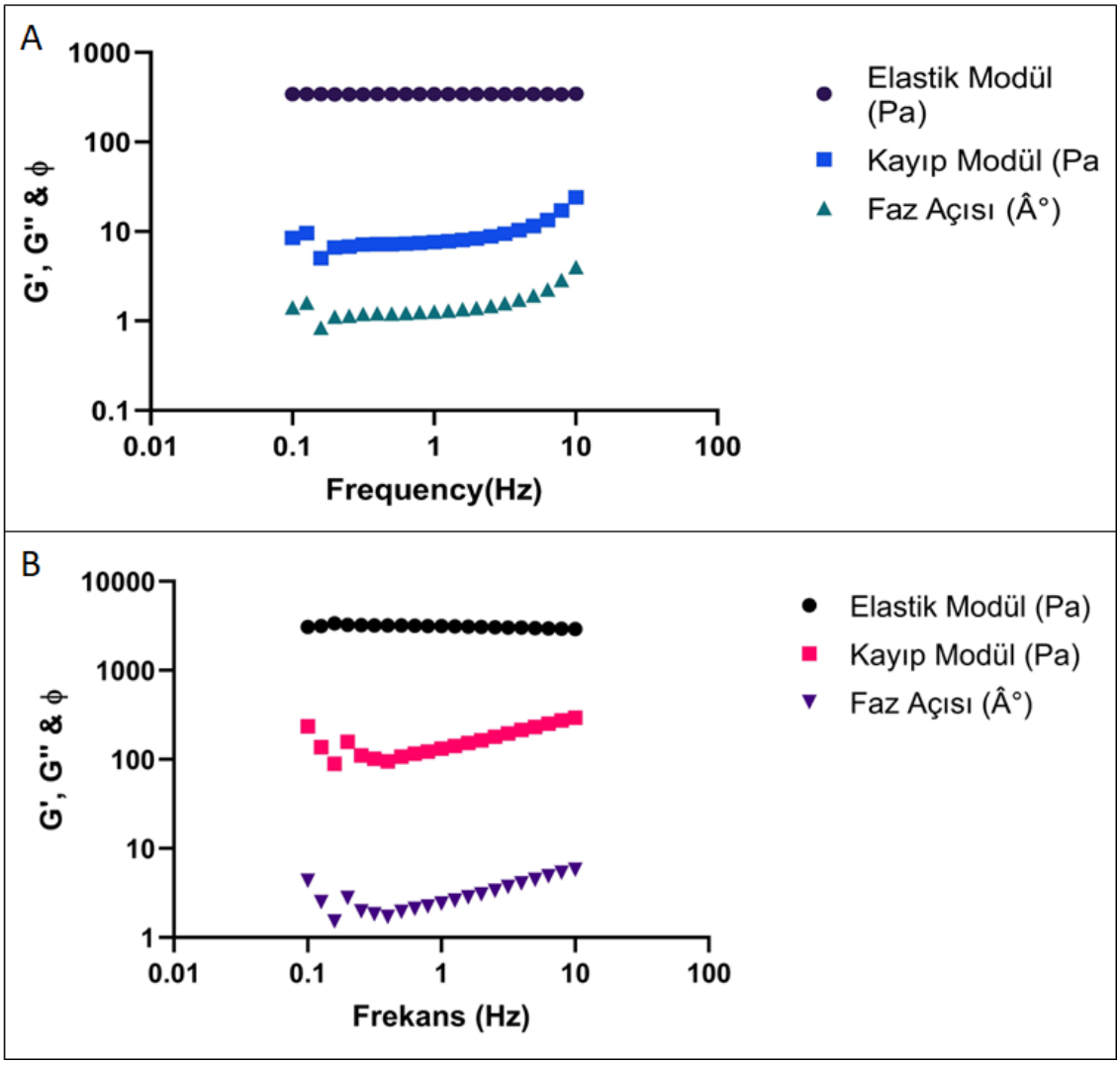
Hidrojellerin fizikokimyasal özelliklerinden elastisite modülü (G'), kayıp modülü (G''), faz açısı ve kompleks viskozite değerleri frekans taraması olarak reoloji analizi ile tespit edilmiştir. G' değeri jelin elastik yani tersinir davranışını ifade ederken G'' değeri ise jelin polimerik yapısındaki viskoz kalıcı deformasyonunu ifade etmektedir [130]. Çizelge 4.5 jellere ait reolojik analiz sonuçlarını göstermektedir.

Çizelge 4.5. J10 ve J15 Hidrojelleri Reolojik Ölçüm Sonuçları. (*** P <0,001).

	G' **(Pa)**	G" **(Pa)**	Kompleks Viskozite **(Pa.s)**	Faz Açısı **(Âº)**
J10	318,7 ***	5,671	292,7333 ***	1,126667
J15	4280 ***	86,65	3964 ***	1,475

J10 ve J15 hidrojeli elastik modül ve kompleks viskozite değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmakla birlikte kayıp modülü ve faz açısı arasında anlamlı fark bulunmamaktadır (Çizelge 4.5). Konsantrasyonun artması elastik modül ve kompleks viskozitede anlamlı bir artışa sebep olmuştur. Yüksek kompleks viskozite

jellerde rijit yapının göstergesi olarak kabul edilmiştir [131]. J10 grubu daha yumuşak bir jel oluştururken J15 grubu daha katı ve rijit bir jel yapısına sahiptir.

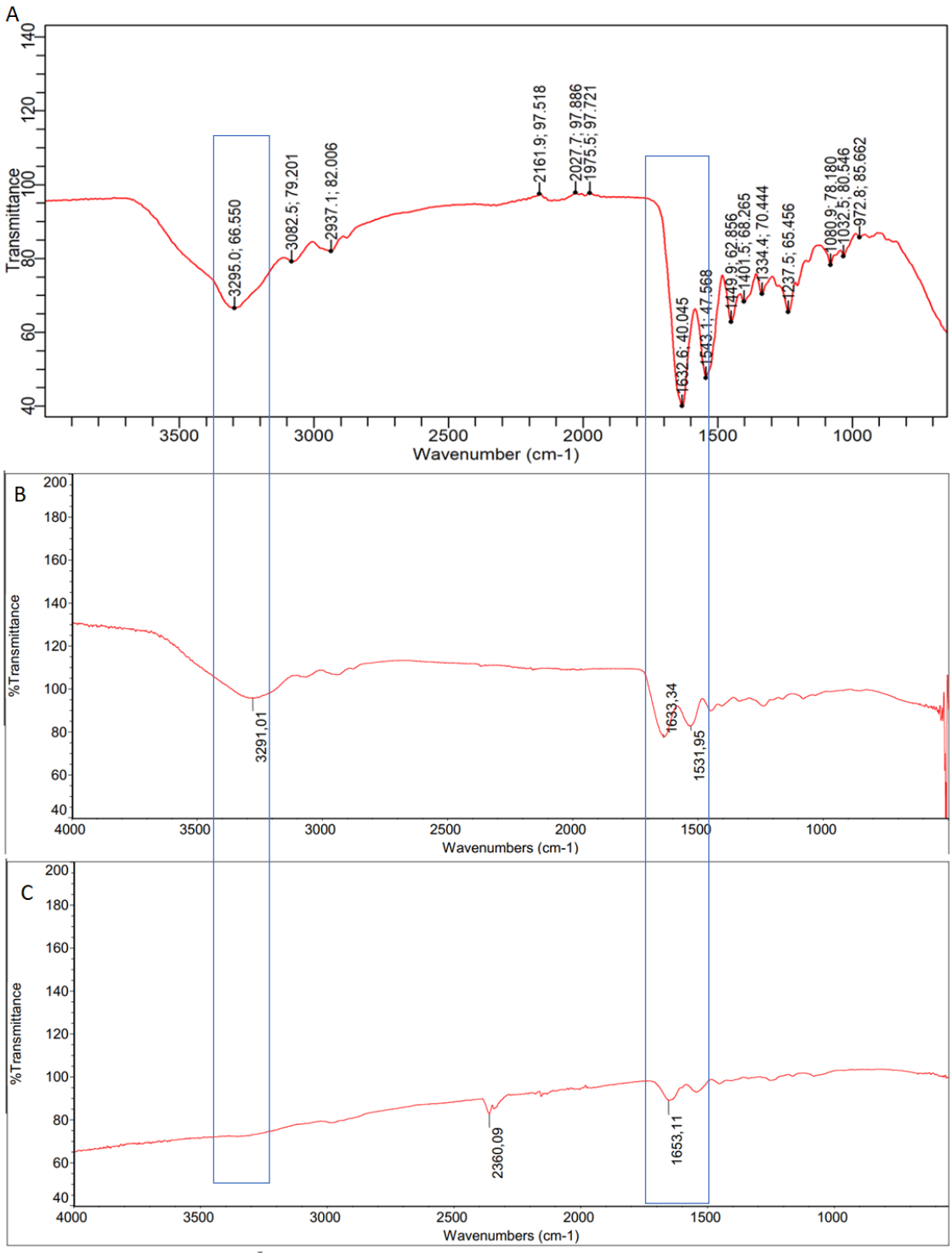


Şekil 4.17. Hidrojel Reoloji Sonuç Grafikleri. (A) J10 Grubu (B) J15 Grubu.

Her iki grupta da elastik modül kayıp modülden büyüktür. Bu durum jelin elastik davranışının göstergesidir (Şekil 4.17). Ayrıca faz açısının sıfıra yakın olması bu hipotezi desteklemektedir [132].

4.2.2.3. FT-IR Analizi

Kovalent çapraz bağlanmanın polimer yapısında sebep olduğu kalıcı değişiklerin tespiti FT-IR ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.18 J10 ve J15 hidrojellerin FT-IR spektrumunu göstermektedir. G1 kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

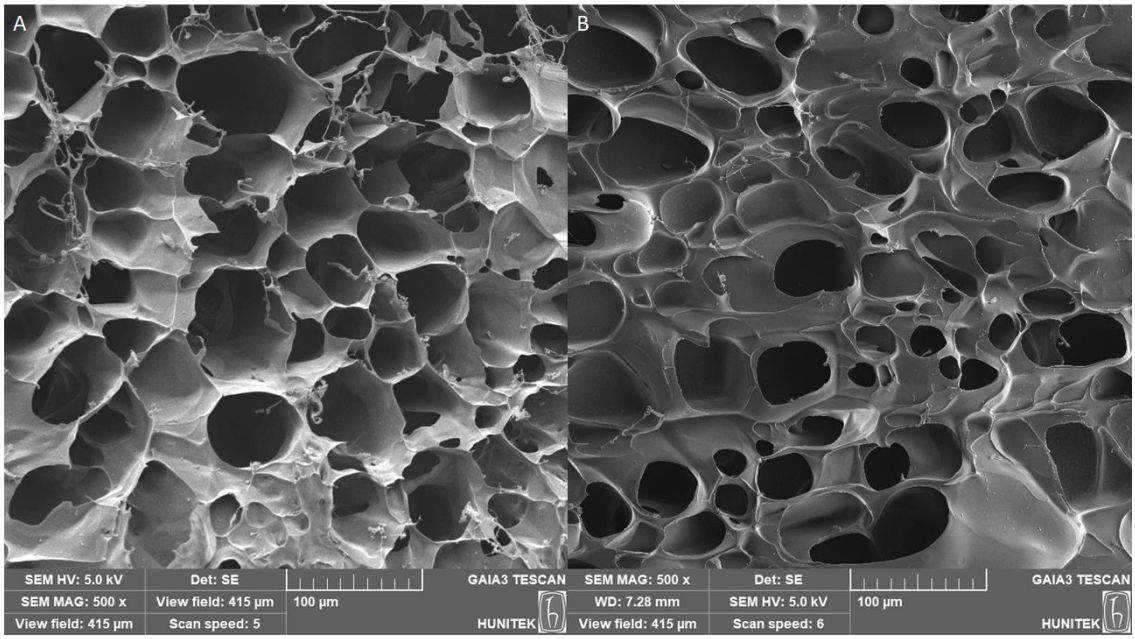


Şekil 4.18. GelMA Pre-polimer ve GelMA Hidrojelleri FT-IR Spektrumları. (A) G1 GelMA Pre-polimer (B) J10 Grubu (C) J15 Grubu.

Şekil 4.18 incelendiğinde çapraz bağlanma 3295 cm^{-1} O-H esnemesini ve 1633 cm^{-1} amit bağı C=O esnemesini gösteren pik şiddetlerinde azalmaya sebebiyet vermiştir. Literatür taraması sonucu bu hipotezi destekler niteliktedir [131].

4.2.2.4. SEM Analizi

GelMA hidrojelleri yüzey morfolojisi SEM ile incelenmiştir. Şekil 4.19 J10 ve J15 jellerine ait SEM görüntülerini göstermektedir.



Şekil 4.19. GelMA Hidrojelleri SEM Görüntüleri. (A) J10 Grubu (B) J15 Grubu.

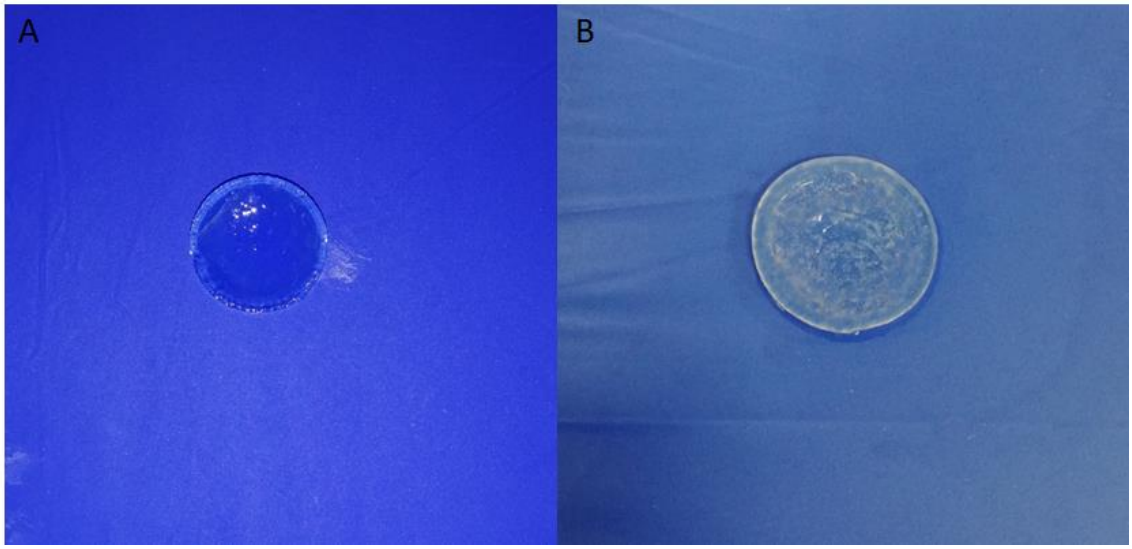
Şekil 4.19 incelendiğinde her iki grupta da heterojen gözenek yapısı ve gözenek boyutu dağılımı gözlemlenmektedir. Gözenek duvarları ince olmakla birlikte konsantrasyonda artış gözenek boyutunun azalmasına sebebiyet vermiştir [133]. Buna ek olarak her iki grupta da iç içe geçmiş gözenek yapısı bulunmaktadır.

Gözeneklilik mekanik dayanım, şişme degradasyon gibi mekanik özellikler ve hücre davranışını etkilemektedir. Şişme oranı gözeneklilik ile artmaktadır. J10 ve J15 grubunda şişme oranlarında bulunan anlamlı fark bu durumun göstergesidir. Yüksek gözeneklilik

mekanik dayanımın azalmasına sebebiyet vermiştir [134]. Gruplar arası G' değerleri arasındaki anlamlı fark bu hipotezi desteklemektedir.

4.3. Hibrit Membran Eldesi ve Karakterizasyonu

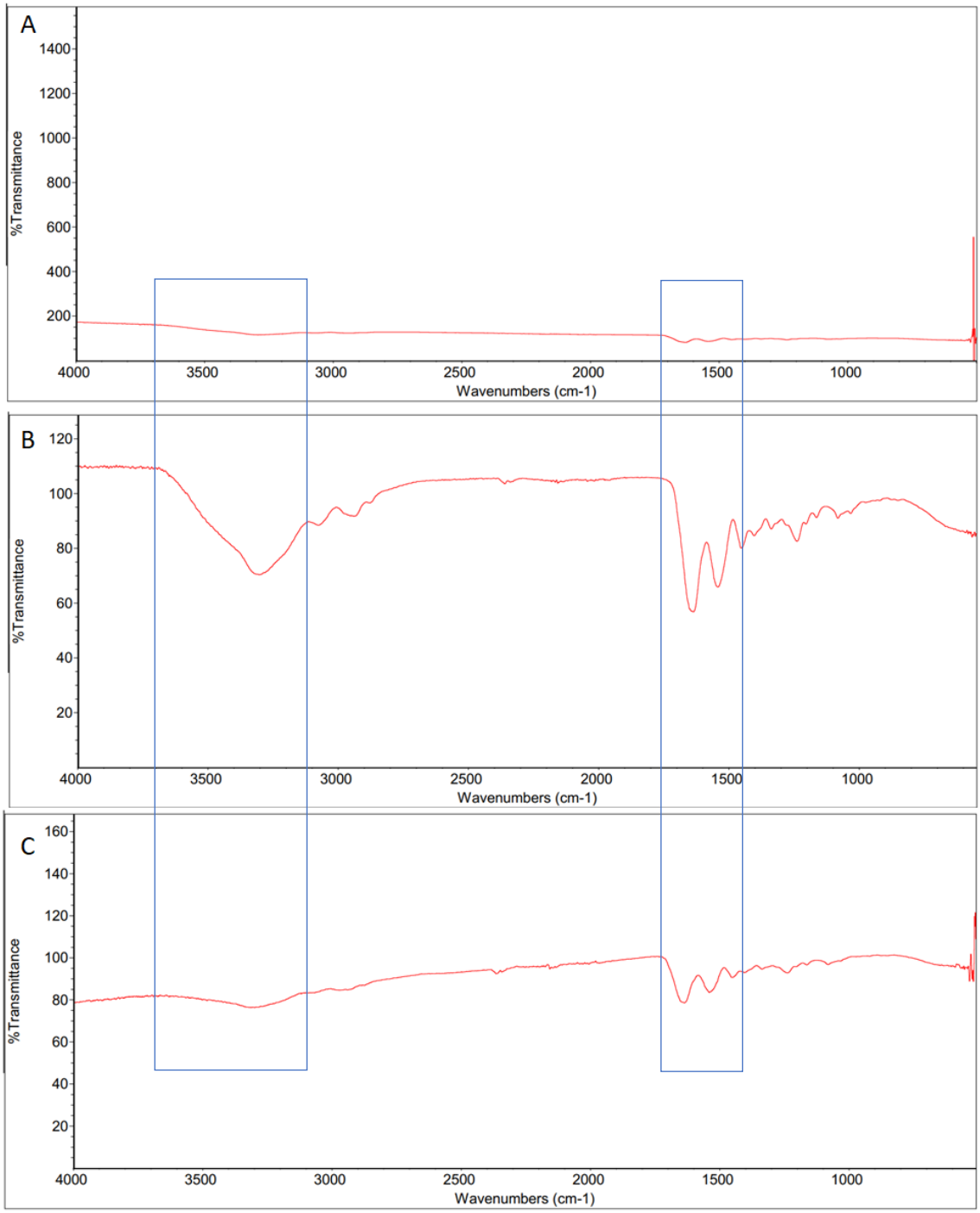
Tez kapsamında Bölüm 3.3.'te üretilmiş olan hibrit membranların karakterizasyonu ve karşılaştırılması bu bölümde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.19 elde edilen hibrit membranları göstermektedir.



Şekil 4.20. Hibrit Membranlar. (A) H1 Grubu (B) H2 Grubu

4.3.1. FT-IR Analizi

Hibrit membranların yüzey yapısal analizi FT-IR ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.21 hibrit membranlara ait FT-IR spektrumlarını göstermektedir. SCSIS-6 grubu kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

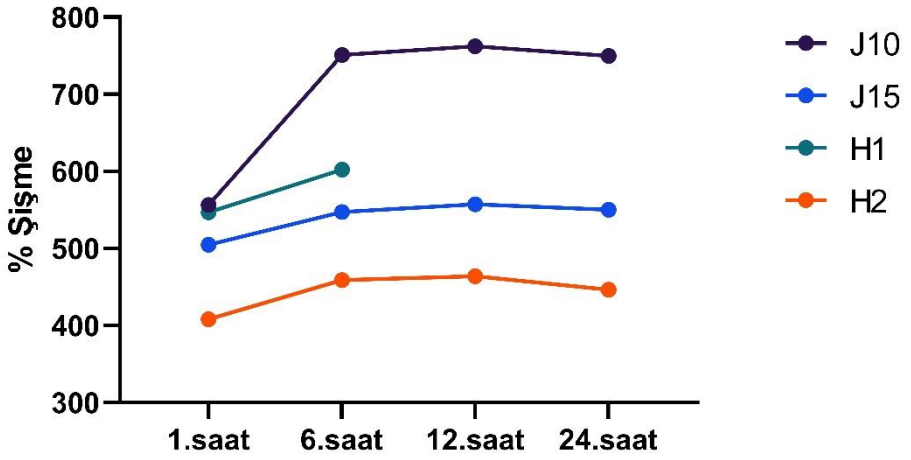


Şekil 4.21. Hibrit Membran FT-IR Spektrumları. (A) SCSIS-6 Grubu (B) H1 Grubu (C) H2 Grubu.

Spektrum sonuçları değerlendirildiğinde H1 ve H2 gruplarında 3303 cm^{-1} de gözlemlenen N-H amin bağı, 1635 ve 1540 cm^{-1} dalga boyunda gözlemlenen amit bağları hibrit membranların başarılı bir şekilde eldesini göstermektedir (Şekil 4.21). Şekil 4.18 bu sonuçları desteklemektedir.

4.3.2. Şişme Testi

Polimer konsantrasyonu, çapraz bağlanma yoğunluğu, hidrofilisite gibi biyomalzeme yapısal özellikleri bir biyomalzemenin şişme davranışını etkilemektedir. Bu sebeple farklı konsantrasyonlarda GelMA konsantrasyonuna sahip jeller ile hibrit doku iskelelerinin kütlece % şişme oranları incelenmiştir. Şekil 4.22 hibrit membranlara ait % şişme oranlarını göstermektedir.



Şekil 4.22. Hibrit Membran Şişme Testi Sonuçları.

Şekil 4.22 incelendiğinde GelMA konsantrasyonun artması ile % şişme oranının azaldığı görülmektedir. Hidrojelin içine aselüler doku gömülmesi şişme oranının azalmasına sebebiyet vermiştir. H1 ve H2 grupları J10 ve J15 hidrojelleri ile karşılaştırıldığında 24 saatlik kütlece şişme oranında sırasıyla %18,44 ve %17,68 oranında azalma gözlemlenmekle birlikte GelMA konsantrasyonu ve kütlece şişme oranında ters korelasyon tespit edilmiştir. Tüm gruplarda şişme dengesi 1.saat sonunda ulaşılmıştır. Şişme oranları arasında 1.saat sonrası anlamlı fark olmaması dengenin ulaşıldığının göstergesi olarak kabul edilmiştir [135]. Şişme dengesi anında J10, J15, H1 ve H2 grupları için kütlece şişme oranları sırasıyla %556,27 ± 28,09, 504,73 ± 5,23, 546,72 ± 2,26 ve 407,96 ± 2,41 olarak bulunmuştur. Tüm gruplarda istatistiki olarak anlamlı bir azalma gerçekleşmiştir (**** $P < 0,0001$). Şişme oranındaki azalma ECM'nin başarılı bir şekilde hidrojel ile entegrasyonunun gerçekleştiğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir.

4.3.3.Mekanik Analiz

Hibrit membranların mekanik dayanımları çekme testi ile incelenmiştir. Çizelge 4.6 hibrit membranlara ait mekanik test sonuçlarını göstermektedir. Karşılaştırma SCSIS-6 ve işlem görmemiş doğal doku (kontrol) grubu ile gerçekleştirilmiştir. GelMA hidrojellerinin liyofilizasyon sonrası kırılgan hale gelmesi sonucu çekme testi yapılamamıştır.

Çizelge 4.6 Hibrit Membran Çekme Testi Sonuçları. (*** P < 0,001 , **** P < 0,0001)

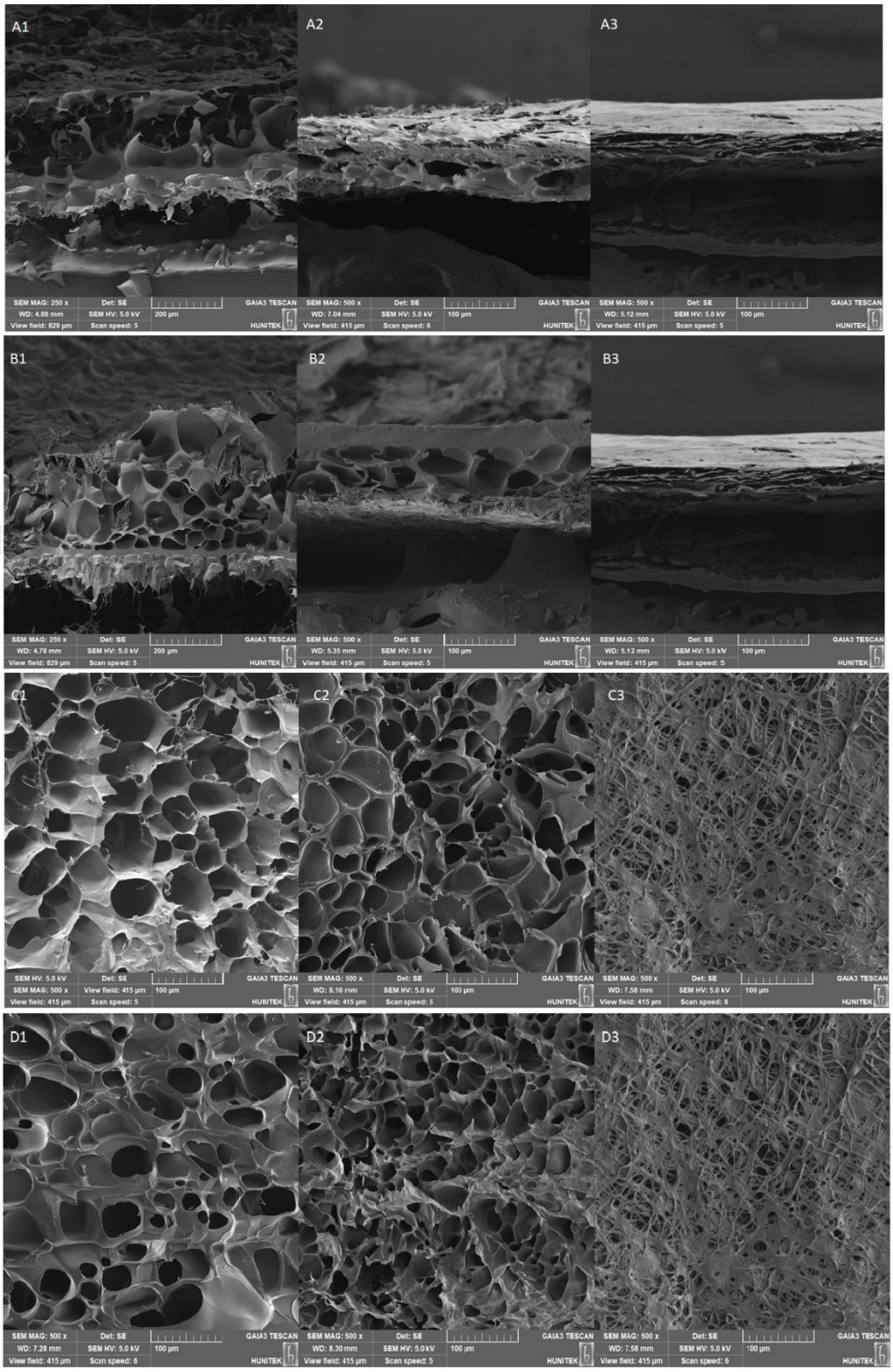
Örnek	**Elastik Modül (kPa)**	**Çekme Mukavemeti (kPa)**	**% Uzama**
SCSIS-6	4,066 ± 0,22	8,83 ± 1,56	15,49 ± 0,62
H1	-	-	-
H2	283,59 ± 37,57 ***	105,22 ± 11,08 ***	67,26 ± 3,38 ****

H1 grubu test esnasında parçalanarak anlamlı bir sonuç vermemiştir. ECM'nin jel içerisine başarılı bir şekilde entegre olamaması ve yetersiz çapraz bağlanmanın bu duruma sebebiyet verdiği düşünülmektedir [136]. Şişme analizi sonuçları destekler niteliktedir. H2 ve SCSIS-6 grupları karşılaştırıldığında elastik modül, çekme mukavemeti ve uzama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır. Aselüler membranın GelMA ile modifikasyonu mekanik dayanımı ve kopma uzamasında artışa sebep olmuştur.

4.3.4. SEM Analizi

Hibrit membranların morfolojik analizleri SEM ile gerçekleştirilmiştir. Hibritleme sonrası yüzey morfolojisi ve kesit alanı incelenmiştir. Şekil 4.23 hibrit membranlara ait SEM görüntülerini göstermektedir. SCSIS-6, J10 ve J15 grupları kontrol olarak kullanılmıştır.

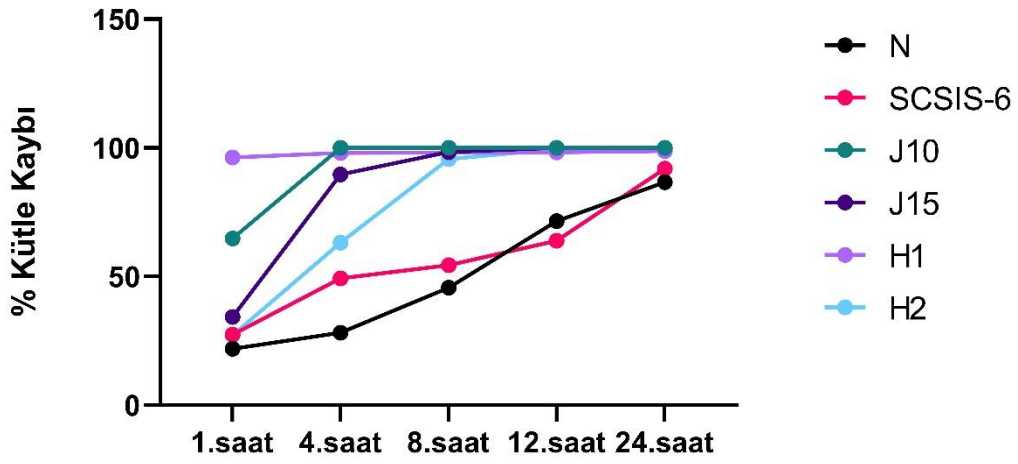
Şekil 4.23A2 ve Şekil 4.23B2 incelendiğinde SCSIS-6 tabaka olarak jel içerisinde görüntülenmektedir. Ayrıca J10 ve J15 gruplarına ait kesit alanları GelMA hidrojelinin iç içe geçmiş gözenek yapısını da göstermektedir (Şekil 4.23). Yüzey alanları incelendiğinde gözenekli hibrit yüzey her iki grupta da bulunmaktadır. Hücresizleştirme ile ECM de oluşan hasar GelMA ile giderilmiştir. H1 ve H2 yüzey gözenekliliği değerlendirildiğinde J10 ve J15 gruplarına kıyasla gözenek boyutunun azaldığı gözlemlenmiştir [137].



Şekil 4.23. Hibrit Membran SEM Görüntüleri. (A1) J10 Kesit Alanı (A2) H1 Kesit Alanı (A3) SCSIS-6 Kesit Alanı (B1) J15 Kesit Alanı (B2) H2 Kesit Alanı (B3) SCSIS-6 Kesit Alanı (C1) J10 Yüzeyi (C2) H1 Yüzeyi (C3) SCSIS-6 Yüzeyi (D1) J15 Yüzeyi (D2) H2 Yüzeyi (D3) SCSIS-6 Yüzeyi.

4.3.5. Degradasyon Testi

Hidrojellerin degradasyon hızı doku mühendisliği çalışmaları için kritik öneme sahip özelliklerden birisidir. Hidrojeller doku ve hücre morfojenezini destekleyerek hücrelerin yeniden yapılanmasını ve kendi ECM'lerini oluşturmalarına olanak sağlamalıdır. Hızlı degradasyon bu duruma engel olarak inflamasyona sebebiyet verebilmektedir. Degradasyon hızı jellere yönelik polimer konsantrasyonu ve çapraz bağlanma derecesi gibi fiziksel olarak kontrol edilebilir ve önemli bir özellik olmakla birlikte jellerde *in vitro* stabilitenin araştırılmasını da sağlamaktadır [138]. Bu sebeple tez kapsamında sentezlenen hibrit membranların *in vitro* enzim degradasyonu kolejenaz A ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.24 işlem görmemiş doğal doku, aselüler SIS, GelMA hidrojel ve hibrit membranlara ait kütleye bağlı degradasyon grafiğini vermektedir.



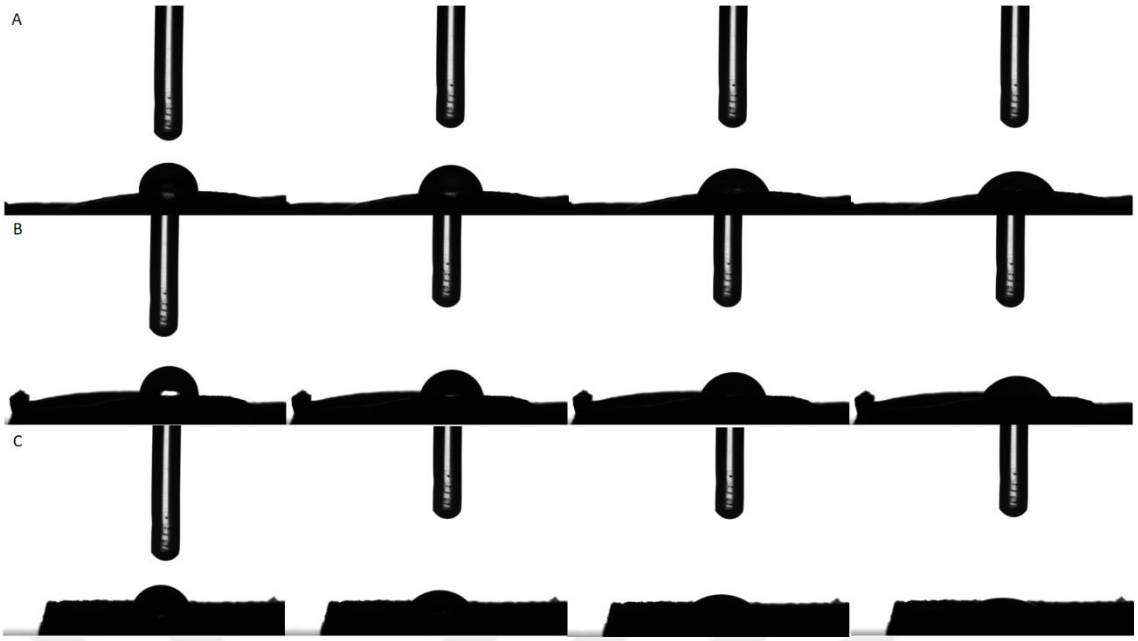
Şekil 4.24. Doğal Doku, Aselüler SIS, GelMA ve Hibrit Hidrojellerin *In Vitro* Enzimatik Bozunmaya Bağlı % Kütle Kaybı.

Kolejenaz enzimi vücut içi protein degradasyonundan sorumlu MMP türü bir enzimdir. Bu sebeple in vitro enzimatik degradasyon *in vivo* degradasyonu taklit etmek amacı ile kolejenaz enzim ile gerçekleştirilmiştir. 24 saat süre ile yapılan deney sonucunda doğal doku ve SCSIS-6 gruplarında bozunma hızları sırasıyla %86,66 ± 11,9 ve %91,9 ± 7,73 olarak hesaplanmıştır. J10 grubunda 1.saat sonunda %100 degradasyon gözlemlenirken J15 grubunda 8.saat sonunda %100 degradasyon gözlemlenmiştir. H1 grubunda 1.saat

sonunda %96,29 oranında bozunma gerçekleşirken, H2 grubunda 8.saat sonunda %95 oranında bozunma gerçekleşmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında GelMA hidrojel filmlerinin bozunma hızının diğer gruplardan daha hızlı olduğu tespit edilmiştir [139]. Bölüm 4.2. de verilen mekanik analiz ve şişme testleri elde edilen sonuçlar ile tutarlılık göstermektedir. Çapraz bağlanma derecesinin düşük olması bu duruma sebebiyet verdiği düşünülmektedir. Ayrıca kullanılan enzim konsantrasyonunun da degradasyon hızını etkilediği literatürde raporlanmıştır [140]. H1 ve H2 grupları aselüler membran ile karşılaştırıldığında bozunma hızlarının yüksek olduğu görülmekle birlikte J10 ve J15 grupları ile karşılaştırıldığında daha stabil oldukları dikkat çekmiştir.

4.3.6. Temas Açısı Analizi

Doku mühendisliği çalışmalarında biyomalzeme yüzey karakteristiği hücre-biyomalzeme etkileşimlerinde önemli bir role sahiptir. Yüzeyin ıslanabilirliği hücre tutunması, proliferasyonu ve göçü gibi etkileşimlerle birlikte doku iskelesi biyoaktivitesi, difüzyon hızı gibi fiziksel ve biyokimyasal özelliklerini de etkilemektedir. Temas açısı analizinde biyomalzeme yüzeyine damlatılan sıvı ile katı yüzey arasında oluşan açı ölçülmektedir. Temas açısının derecesi biyomalzemenin ıslanabilirliği ve yüzey hidrofilisite/hidrofobisite karakteristiği hakkında bilgi vermektedir [141]. Şekil 4.25 temas açısı sonuçlarını vermektedir.



Şekil 4.25 Temas Açısı Analizi. (A) H1 Grubu, (B) H2 Grubu (C) J15 Grubu. Tüm görüntüler soldan sırasıyla 1.s, 3.s, 6.s ve 10.s anlarına aittir.

Temas açısı analizinde J15 grubu için 1.s, 3.s, 6.s ve 10.s zaman dilimlerinde temas açıları sırasıyla 56,18º, 38,41º, 27,57º ve 0º olarak ölçülmüştür. H2 grubunda aynı zaman dilimlerinde sırasıyla 98,49º, 81,49º, 69,42º ve 61,43º olarak ölçülmüştür. H1 grubunda ise 83,13º, 61,73º, 45,02º ve 36,95º olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde temas açılarının 90ºden küçük olması yüzeylerin hidrofilik olduğunun göstergesidir [142]. H1 ve H2 grupları değerlendirildiğinde temas açıları birbirine yakın olmakla beraber yüzey ıslanabilirliğinin azalmış olduğu sonuçlar çerçevesinde gözlemlenmektedir. H2 grubunda yüzey hidrofilisite/hidrofobisite dengesi diğer gruplara göre daha yüksek olmakla beraber difüzyon hızı diğer iki gruptan daha düşüktür. Yüzey ıslanabilirliğinin diğer iki gruba göre daha yavaş olması bu hipotezi desteklemektedir [143].

İşlem görmemiş doğal doku, SCSIS-6 ve J10 gruplarında damlanın yüzeyde dağılmasından kaynaklı olarak bu ölçüm yapılamamıştır.

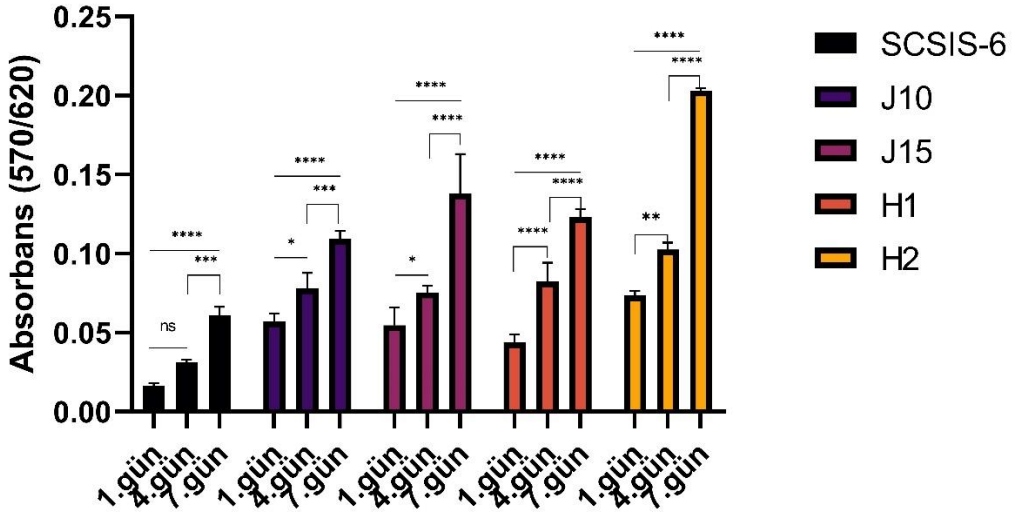
4.4. *In vivo* Hücre Kültürü

Tez kapsamında sentezlenen hibrit membranların PC12 hücreleri ile etkileşimi bu bölümde incelenmiştir.

4.4.1. Hücre Metabolik Aktivite ve Sitotoksisite Analizi

PC12 hücre hattının hibrit doku iskeleleri üzerindeki proliferasyonu ve hücre canlılığı Alamar Mavisi analizi ile incelenmiştir. Alamar Mavisi resazurin temelli floresan boya olup canlı hücre metabolik aktivitesi sonucu resorufine indirgenmektedir [144].

Sitotoksisite ve hücre proliferasyonu kültür çalışmasının 1., 4. ve 7. günlerinde elde edilen absorbans değerleri kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.26 hücre proliferasyonuna ait sonuçları göstermektedir.



Şekil 4.26. SCSIS-6, J10, J15, H1 ve H2 Gruplarının Proliferasyon Analizi.

Şekil 4.26 değerlendirildiğinde tüm gruplarda analiz günlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunması PC12 hücre hattının proliferasyonunu ifade etmektedir. Tüm gruplarda 1.günden itibaren hücre proliferasyonunda artış gözlemlenmiştir. Hücre proliferasyonunda artış gözlemlenmesi hibrit doku iskelelerinin sitotoksik etki göstermediğinin kanıtı olarak değerlendirilebilir.

SCSIS-6 grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında kültür boyunca metabolik aktivitede anlamlı fark gözlemlenmiş olup en düşük proliferasyonun SCSIS-6 grubunda olduğu dikkat çekmektedir (**** P <0,0001). J10 grubunda ise kültürün 4.gününde H2 grubuyla (* P < 0,05) ve kültürün 7.gününde ise J15 grubu (** P < 0,01) ve H2 grubuyla (**** P < 0,0001) anlamlı bir fark bulunmaktadır. J15 grubu kültürün 4. Ve 7. günlerinde H2 grubu ile metabolik aktivitede anlamlı bir fark göstermiştir (* P <0,05, **** P <0,0001). H1 ve H2 grupları arasında kültürün 1. ve 7. günlerinde anlamlı fark görülmüştür (** P <0,01, **** P < 0,0001).

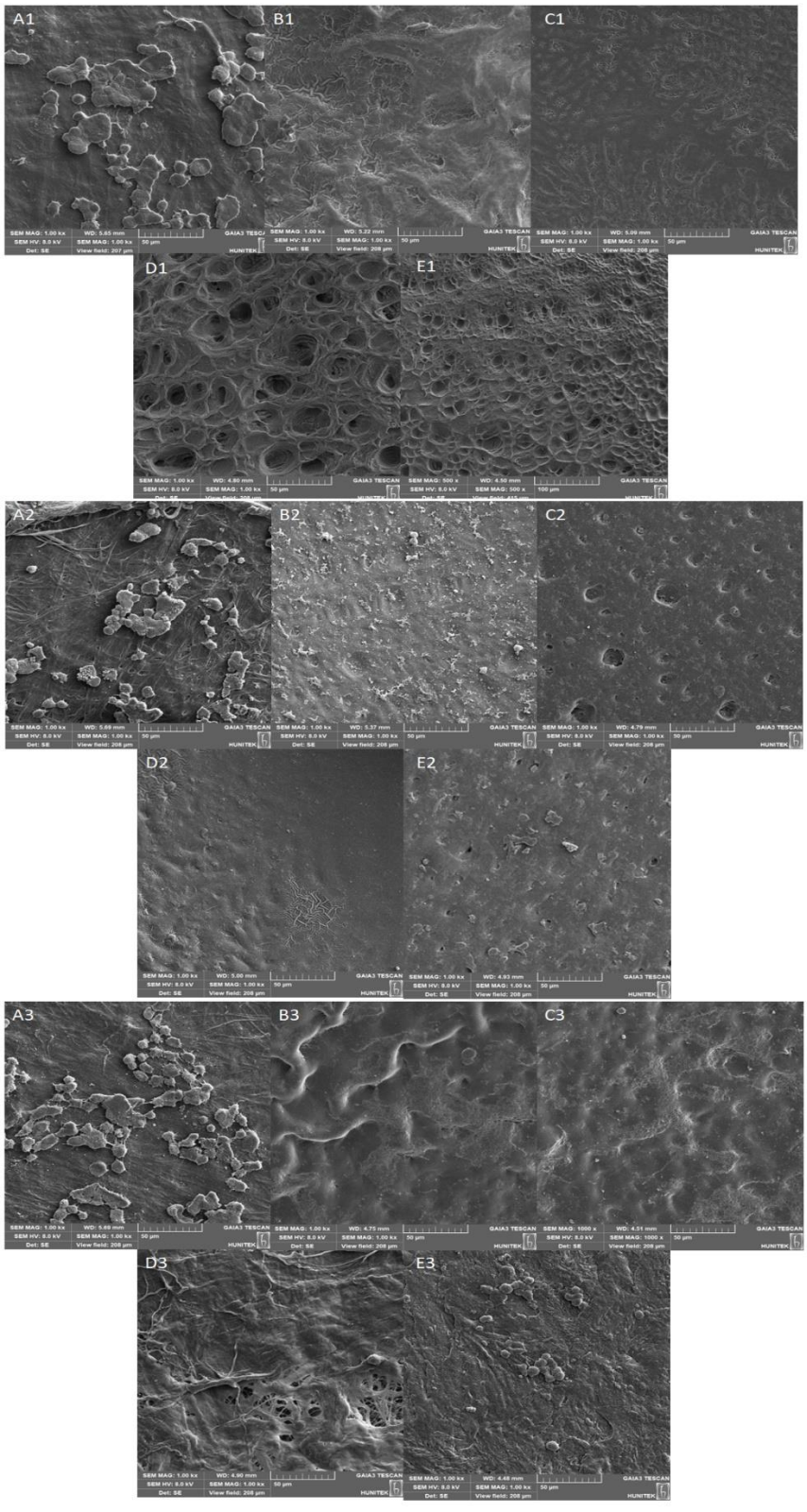
Sonuçlar incelendiğinde en düşük proliferasyon hızının SCSIS-6 grubunda olduğu gözlemlenmektedir. Tüm gruplarda proliferasyon 4.günden sonra yaklaşık olarak iki katına çıkmış olmakla birlikte hibrit membranlarda proliferasyon oranının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Hibrit membranlarda hem aselüler SIS'in sağladığı mikro-çevre ile gelen büyüme faktörleri ve nörotropik faktörler hem de GelMA da bulunan RGD protein dizisinin hücre proliferasyonunu ve canlılığını arttırdığı düşünülmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı farklar bu hipotezi desteklemektedir. H1 ve H2 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasına rağmen proliferasyon hızı H1 grubunda daha düşük olduğu dikkat çekmektedir. Bu durumun olası sebeplerinden birinin hibritleme esnasında membranının jel içerisine entegre edilememesi ve yetersiz çapraz bağlanma olduğu düşünülmektedir. Mekanik dayanım, şişme ve degradasyon testi bu hipotezi destekler niteliktedir [141, 145]. En yüksek proliferasyon H2 grubunda gözlemlenmiştir.

4.4.2. SEM Analizi

PC12 hücrelerinin hibrit iskele üzerindeki davranışları ve morfoloji değişimleri SEM ile incelenmiştir. Kültür çalışmasının 1., 4. ve 7. günlerinde alınan SEM görüntüleri Şekil 4.27'de verilmiştir.

SCSIS-6 grubunda ilk günde hücrelerin kümelenme eğilimleri dikkat çekmektedir. Kültürün 4.gününe gelindiğinde hücre yoğunluğu çok değişmemiş olmakla birlikte 7.gününde daha fazla hücre kümesi bulunmaktadır (Şekil 4.27 A1, A2, A3). J10 ve J15

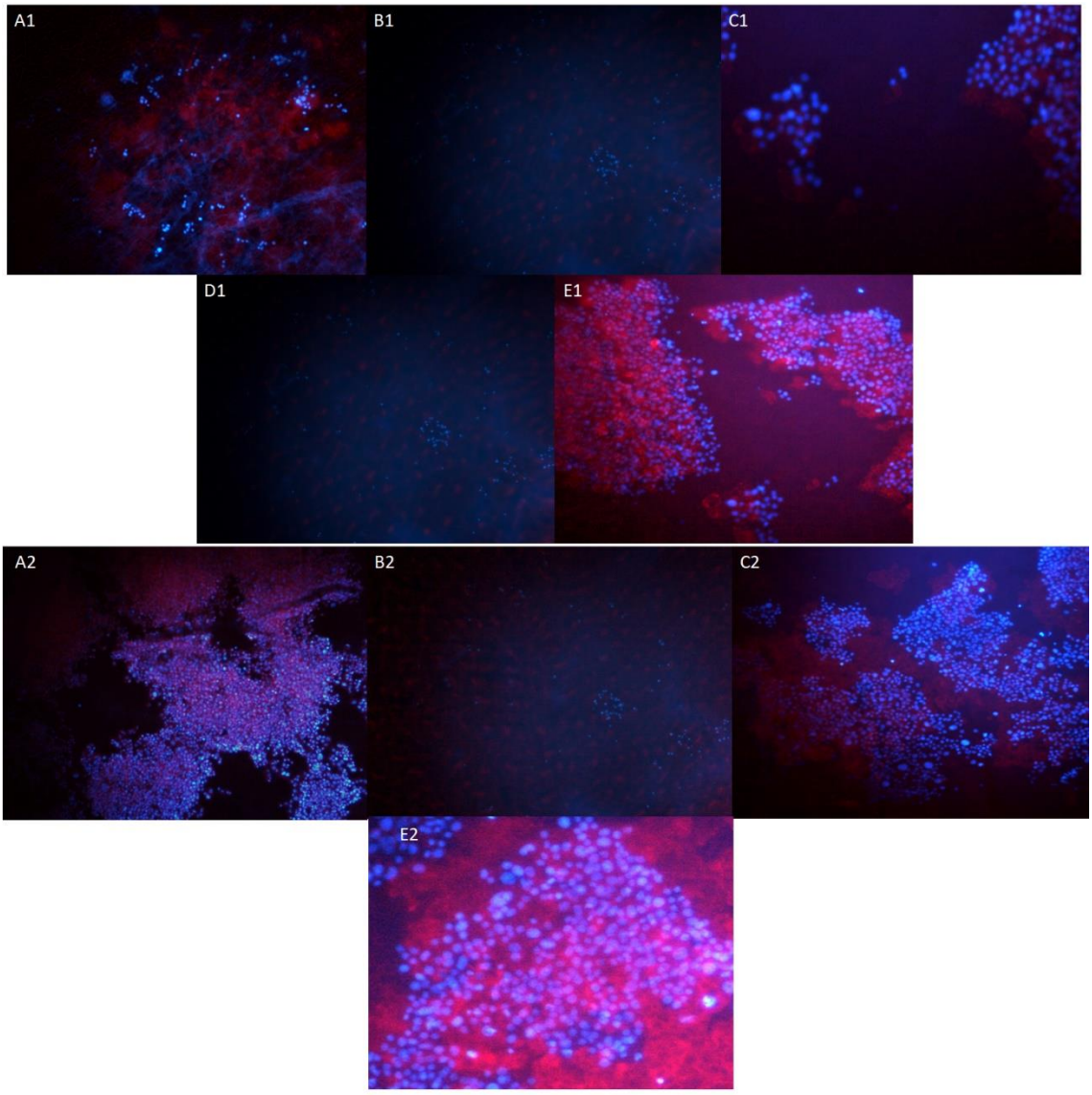
gruplarında 4. ve 7. günlerinde hücre proliferasyonunun artmış olduğu görülmektedir (Şekil 4.27 B1, B2, B3 – Şekil 4.26 C1, C2, C3). H1 ve H2 gruplarında ise benzer durum gözlemlenmekle beraber hücrelerin 4.günde malzeme yüzeyine yayılmış olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 4.27 D1, D2, D3 – Şekil 4.27 E1, E2, E3).



Şekil 4.27. PC12 Hücre Kültürünün 1., 4. ve 7. Günlerinde Elde Edilen SEM Görüntüleri. (A1 - A2 – A3) 1., 4. ve 7. günler SCSIS-6 Grubu (B1 - B2 – B3) 1., 4. ve 7. günler J10 Grubu, (C1 – C2 – C3) 1., 4. ve 7. günler J15 Grubu, (D1 – D2 – D3) 1., 4. ve 7. günler H1 Grubu ve (E1- E2 – E3) 1., 4. ve 7. günler H2 Grubu.

4.4.3. Hücre Yayılma Analizi

PC12 hücrelerinin hibrit iskele üzerindeki davranışları ve yayılma alanları floresan mikroskobu ile incelenmiştir. Kültür çalışmasının 1., ve 7. günlerinde alınan görüntüler Şekil 4.28 de verilmiştir.



Şekil 4.28. Kültürün 1. ve 7. Günlerinde Alınan DAPI-Phalloidin 594 Boyama Sonuçları. (A1- A2) SCSIS-6 Grubu (B1 – B2) J10 Grubu (C1- C2) J15 Grubu (D1 – D2) H1 Grubu (E1-E2) H2 Grubu.

Şekil 4.28 incelendiğinde kültürün 1.gününde PC12 hücre hattının kümelenme davranışı dikkat çekmektedir. Hücre ekiminde 21G şırınga kullanımı kümelenmeyi engellememiştir. 7.gün sonuçları değerlendirildiğinde tüm gruplar da proliferasyon ve hücre yaylımı gerçekleşmiştir. Özellikle SCSIS-6, J15 ve H2 gruplarında proliferasyon ve hücre yayılması gözlemlenmiştir. Aselüler SIS'in sağladığı doğal ECM ve yapısında bulunan büyüme faktörleri PC12 hücre hattı yayılımını ve proliferasyonunu indükleyici etki gösterdiği düşünülmektedir.

5. YORUM

Tez çalışması kapsamında periferal sinir hasarının tedavisin de kullanılabilecek doku iskeleleri sentezlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda aselüler SIS elde edilerek GelMA hidrojeli ile hibrit doku iskeleleri sentezlenmiştir.

- ✓ 2 farklı yöntem kullanılarak SIS deselülerizasyonu gerçekleştirilerek karşılaştırılması yapılmıştır. İlk metot literatürde tercih edilen bir metot olup fiziksel, kimyasal ve enzimatik uygulamaların kombinasyonundan oluşmaktadır. İkinci metot olarak $scSCO_2$ teknolojisi kullanılarak SIS deselülerizasyonu için yeni bir protokol geliştirilmiştir.

- ✓ Uygulanan metotların süreç optimizasyonu yapılmış olup, ECM üzerindeki etkileri H&E ve DAPI boyamaları ile incelenmiştir. Kantitatif metot verimi GAG miktar tayini ve genomik DNA tayini ile incelenmiştir. Bu bağlamda $scCO_2$ teknolojisinin SIS deselülerizasyonunda konvansiyonel yöntemden daha etkili ve verimli bir yöntem olduğu ve ECM biyokimyasal yapısını koruduğu gösterilmiştir.

- ✓ Deselülerizasyon yöntemlerinin SIS mekanik özellikleri noktasında anlamlı bir hasar vermediği gösterilmiştir.

- ✓ GelMA pre-polimer sentez parametreleri optimize edilerek ideal MD belirlenmiş olup hidrojel sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda GelMA pre-polimerinin konsantrasyonun çapraz bağlanma, hidrojel özelliklerine ve hücre etkileşimi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

- ✓ GelMA pre-polimer konsantrasyonunun arttırılmasının hidrojel mekanik ve yapısal özelliklerini arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca *in vitro* çalışmalarda hücre proliferasyonun da jel konsantrasyonunun ve çapraz bağlanmanın etkileri incelenerek sonuçları tartışılmıştır. Sinir doku mühendisliğine yönelik farklı

konsantrasyonlarda çalışmalar yapılarak daha detaylı incelemeler yapılması ihtiyacı ortaya çıkmıştır.

- ✓ Hibrit doku iskelesi sentez parametreleri optimize edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda GelMA pre-polimeri ile aselüler SIS hibrit doku iskeleleri elde edilerek SIS dokusunun mekanik özellikleri geliştirilmiştir. SIS dokusunun polimerler ile hibrit sistemlerinde ECM'nin yapısal özelliklerinin korunduğu düşünülmektedir.

- ✓ SIS/GelMA hibrit doku iskelelerinin nöral hücreler ile etkileşimi *in vitro* koşullarda incelenmiş olup hibrit doku iskelelerinde hücre proliferasyonunun GelMA modifiye SIS doku iskelelerinde artmış olduğu gösterilmiştir. Hibrit doku iskelesinde mikro-çevrenin sinir hücreleri için uygun bir ortam olduğu gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

[1] C. Clarke, R. Lemon, Nervous system structure and function, Neurology: A Queen Square Textbook, (2016) 11-67.

[2] D. Purves, G. Augustine, D. Fitzpatrick, L. Katz, A. LaMantia, J. McNamara, S. Williams, Early Brain Development. Purves, D., et al., editors. Sunderland, MA, Sinauer Associates, Inc, 2001.

[3] C.R. Noback, D.A. Ruggiero, N.L. Strominger, R.J. Demarest, The human nervous system: structure and function, Springer Science & Business Media2005.

[4] C.E. Hagan, B. Bolon, C.D. Keene, Nervous system, Comparative Anatomy and Histology, Elsevier2012, pp. 339-394.

[5] B. Goldstein, Anatomy of the peripheral nervous system, Physical medicine and rehabilitation clinics of North America, 12 (2001) 207-236.

[6] C.A. Kuliasha, B.S. Spearman, E.W. Atkinson, P. Rustogi, A.S. Furniturewalla, E.A. Nunamaker, K.J. Otto, C.E. Schmidt, J.W. Judy, Robust and scalable tissue-engineerined electronic nerve interfaces (Teeni), Solid-State Sensors, Actuators Microsystems Work, (2018) 46-49.

[7] D. Arslantunali, T. Dursun, D. Yucel, N. Hasirci, V. Hasirci, Peripheral nerve conduits: technology update, Medical Devices: Evidence and Research, (2014) 405-424.

[8] N.P. Patel, K.A. Lyon, J.H. Huang, An update–tissue engineered nerve grafts for the repair of peripheral nerve injuries, Neural regeneration research, 13 (2018) 764.

[9] S.-l. Chen, Z.-g. Chen, H.-l. Dai, J.-x. Ding, J.-s. Guo, N. Han, B.-g. Jiang, H.-j. Jiang, J. Li, S.-p. Li, Repair, protection and regeneration of peripheral nerve injury, Neural regeneration research, 10 (2015) 1777.

[10] S. Houshyar, A. Bhattacharyya, R. Shanks, Peripheral nerve conduit: Materials and structures, ACS chemical neuroscience, 10 (2019) 3349-3365.

[11] R. Deumens, A. Bozkurt, M.F. Meek, M.A. Marcus, E.A. Joosten, J. Weis, G.A. Brook, Repairing injured peripheral nerves: bridging the gap, Progress in neurobiology, 92 (2010) 245-276.

[12] C. Aijie, L. Xuan, L. Huimin, Z. Yanli, K. Yiyuan, L. Yuqing, S. Longquan, Nanoscaffolds in promoting regeneration of the peripheral nervous system, Nanomedicine (Lond), 13 (2018) 1067-1085.

[13] R. Sridharan, R.B. Reilly, C.T. Buckley, Decellularized grafts with axially aligned channels for peripheral nerve regeneration, Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 41 (2015) 124-135.

[14] T. Li, R. Javed, Q. Ao, Xenogeneic Decellularized Extracellular Matrix-based Biomaterials For Peripheral Nerve Repair and Regeneration, Current Neuropharmacology, 19 (2021) 2152-2163.

[15] X. Zhang, W. Qu, D. Li, K. Shi, R. Li, Y. Han, E. Jin, J. Ding, X. Chen, Functional polymer-based nerve guide conduits to promote peripheral nerve regeneration, Advanced Materials Interfaces, 7 (2020) 2000225.

[16] A.M. Moore, R. Kasukurthi, C.K. Magill, H.F. Farhadi, G.H. Borschel, S.E. Mackinnon, Limitations of conduits in peripheral nerve repairs, Hand, 4 (2009) 180-186.

[17] R. Gaudin, C. Knipfer, A. Henningsen, R. Smeets, M. Heiland, T. Hadlock, Approaches to peripheral nerve repair: generations of biomaterial conduits yielding to replacing autologous nerve grafts in craniomaxillofacial surgery, BioMed research international, 2016 (2016).

[18] M.F. Meek, J.H. Coert, US Food and Drug Administration/Conformit Europe-approved absorbable nerve conduits for clinical repair of peripheral and cranial nerves, Annals of plastic surgery, 60 (2008) 110-116.

[19] R. Poongodi, Y.-L. Chen, T.-H. Yang, Y.-H. Huang, K.D. Yang, H.-C. Lin, J.-K. Cheng, Bio-scaffolds as cell or exosome carriers for nerve injury repair, International Journal of Molecular Sciences, 22 (2021) 13347.

[20] M. Sarker, S. Naghieh, A.D. McInnes, D.J. Schreyer, X. Chen, Strategic design and fabrication of nerve guidance conduits for peripheral nerve regeneration, Biotechnology journal, 13 (2018) 1700635.

[21] H. Jiang, Y. Qian, C. Fan, Y. Ouyang, Polymeric Guide Conduits for Peripheral Nerve Tissue Engineering, Front Bioeng Biotechnol, 8 (2020) 582646.

[22] C. Dong, Y. Lv, Application of collagen scaffold in tissue engineering: recent advances and new perspectives, Polymers, 8 (2016) 42.

[23] F. Stang, H. Fansa, G. Wolf, G. Keilhoff, Collagen nerve conduits–assessment of biocompatibility and axonal regeneration, Bio-medical materials and engineering, 15 (2005) 3-12.

[24] A.F. Sulong, N.H. Hassan, N.M. Hwei, Y. Lokanathan, A.S. Naicker, S. Abdullah, M.R. Yusof, O. Htwe, R.B.H. Idrus, N.H.M. Haflah, Collagen-coated polylactic-glycolic acid (PLGA) seeded with neural-differentiated human mesenchymal stem cells as a potential nerve conduit, Advances in Clinical and Experimental Medicine, 23 (2014) 353-362.

[25] J. Zhang, Y. Zhang, Y.K. Jiang, J.A. Li, W.F. Wei, M.P. Shi, Y.B. Wang, G.L. Jia, The effect of poly (lactic-co-glycolic acid) conduit loading insulin-like growth factor 1 modified by a collagen-binding domain on peripheral nerve injury in rats, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 110 (2022) 2100-2109.

[26] R. Boni, A. Ali, A. Shavandi, A.N. Clarkson, Current and novel polymeric biomaterials for neural tissue engineering, Journal of biomedical science, 25 (2018) 1-21.

[27] F. Stang, H. Fansa, G. Wolf, M. Reppin, G. Keilhoff, Structural parameters of collagen nerve grafts influence peripheral nerve regeneration, Biomaterials, 26 (2005) 3083-3091.

[28] W. Sun, H. Lin, B. Chen, W. Zhao, Y. Zhao, J. Dai, Promotion of peripheral nerve growth by collagen scaffolds loaded with collagen-targeting human nerve growth factor-β, Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 83 (2007) 1054-1061.

[29] Y. Yao, Y. Cui, Y. Zhao, Z. Xiao, X. Li, S. Han, B. Chen, Y. Fang, P. Wang, J. Pan, Efect of longitudinally oriented collagen conduit combined with nerve growth factor on nerve regeneration after dog sciatic nerve injury, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 106 (2018) 2131-2139.

[30] Y. Cui, C. Lu, D. Meng, Z. Xiao, X. Hou, W. Ding, D. Kou, Y. Yao, B. Chen, Z. Zhang, Collagen scaffolds modified with CNTF and bFGF promote facial nerve regeneration in minipigs, Biomaterials, 35 (2014) 7819-7827.

[31] B. Yuan, X. Zheng, M.-L. Wu, Y. Yang, J.-w. Chen, H.-C. Gao, J. Liu, Platelet-Rich Plasma Gel-Loaded Collagen/Chitosan Composite Film Accelerated Rat Sciatic Nerve Injury Repair, ACS Omega, (2023).

[32] J. Yoo, J.H. Park, Y.W. Kwon, J.J. Chung, I.C. Choi, J.J. Nam, H.S. Lee, E.Y. Jeon, K. Lee, S.H. Kim, Augmented peripheral nerve regeneration through elastic nerve guidance conduits prepared using a porous PLCL membrane with a 3D printed collagen hydrogel, Biomaterials science, 8 (2020) 6261-6271.

[33] V. Zolfagharzadeh, J. Ai, H. Soltani, S. Hassanzadeh, M. Khanmohammadi, Sustain release of loaded insulin within biomimetic hydrogel microsphere for sciatic tissue engineering in vivo, International Journal of Biological Macromolecules, 225 (2023) 687-700.

[34] W. Yu, W. Zhao, C. Zhu, X. Zhang, D. Ye, W. Zhang, Y. Zhou, X. Jiang, Z. Zhang, Sciatic nerve regeneration in rats by a promising electrospun collagen/poly (ε-caprolactone) nerve conduit with tailored degradation rate, BMC neuroscience, 12 (2011) 1-14.

[35] Y. Li, K. Takanari, R. Nakamura, M. Kambe, K. Ebisawa, M. Oishi, Y. Kamei, Artificial PGA/Collagen-based Bilayer Conduit in Short Gap Interposition Setting Provides Comparable Regenerative Potential to Direct Suture, Plastic and Reconstructive Surgery–Global Open, 11 (2023) e4875.

[36] L. Giampetruzzi, L. Blasi, A. Quarta, S. Argentiere, C. Cella, L. Salvatore, M. Madaghiele, G. Gigli, A. Sannino, Poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles embedded in a micropatterned collagen scaffold for neuronal tissue regeneration, International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 66 (2017) 359-368.

[37] C. Wang, T. Yokota, T. Someya, Natural biopolymer-based biocompatible conductors for stretchable bioelectronics, Chemical Reviews, 121 (2021) 2109-2146.

[38] P. Prang, R. Müller, A. Eljaouhari, K. Heckmann, W. Kunz, T. Weber, C. Faber, M. Vroemen, U. Bogdahn, N. Weidner, The promotion of oriented axonal regrowth in the

injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels, Biomaterials, 27 (2006) 3560-3569.

[39] H. Zhang, J. Guo, Y. Wang, L. Shang, R. Chai, Y. Zhao, Natural Polymer-Derived Bioscaffolds for Peripheral Nerve Regeneration, Advanced Functional Materials, 32 (2022) 2203829.

[40] L. Ning, H. Sun, T. Lelong, R. Guilloteau, N. Zhu, D.J. Schreyer, X. Chen, 3D bioprinting of scaffolds with living Schwann cells for potential nerve tissue engineering applications, Biofabrication, 10 (2018) 035014.

[41] M.-D. Wang, P. Zhai, D.J. Schreyer, R.-S. Zheng, X.-D. Sun, F.-Z. Cui, X.-B. Chen, Novel crosslinked alginate/hyaluronic acid hydrogels for nerve tissue engineering, Frontiers of Materials Science, 7 (2013) 269-284.

[42] A. Rajaram, D. Schreyer, D. Chen, Bioplotting alginate/hyaluronic acid hydrogel scaffolds with structural integrity and preserved schwann cell viability, 3D Printing and Additive Manufacturing, 1 (2014) 194-203.

[43] Y. Bu, H.-X. Xu, X. Li, W.-J. Xu, Y.-x. Yin, H.-l. Dai, X.-b. Wang, Z.-J. Huang, P.-H. Xu, A conductive sodium alginate and carboxymethyl chitosan hydrogel doped with polypyrrole for peripheral nerve regeneration, RSC advances, 8 (2018) 10806-10817.

[44] Y. Wang, Y. Zhao, C. Sun, W. Hu, J. Zhao, G. Li, L. Zhang, M. Liu, Y. Liu, F. Ding, Chitosan degradation products promote nerve regeneration by stimulating schwann cell proliferation via miR-27a/FOXO1 axis, Molecular neurobiology, 53 (2016) 28-39.

[45] W. Marcol, M. Larysz-Brysz, M. Kucharska, A. Niekraszewicz, W. Slusarczyk, K. Kotulska, P. Wlaszczuk, A. Wlaszczuk, H. Jedrzejowska-Szypulka, J. Lewin-Kowalik, Reduction of post-traumatic neuroma and epineural scar formation in rat sciatic nerve by application of microcrystallic chitosan, Microsurgery, 31 (2011) 642-649.

[46] Y.-T. Lau, L.-F. Kwok, K.-W. Tam, Y.-S. Chan, D.K.-Y. Shum, G.K.-H. Shea, Genipin-treated chitosan nanofibers as a novel scaffold for nerve guidance channel design, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 162 (2018) 126-134.

[47] A. Boecker, S.C. Daeschler, U. Kneser, L. Harhaus, Relevance and Recent Developments of Chitosan in Peripheral Nerve Surgery, Front Cell Neurosci, 13 (2019) 104.

[48] M. Bąk, O.N. Gutkowska, E. Wagner, J. Gosk, The role of chitin and chitosan in peripheral nerve reconstruction, Polimery w Medycynie, 47 (2017) 43-47.

[49] K. Dalamagkas, M. Tsintou, A. Seifalian, Advances in peripheral nervous system regenerative therapeutic strategies: a biomaterials approach, Materials Science and Engineering: C, 65 (2016) 425-432.

[50] J. Sayanagi, H. Tanaka, M. Ebara, K. Okada, K. Oka, T. Murase, H. Yoshikawa, Combination of electrospun nanofiber sheet incorporating methylcobalamin and PGA-collagen tube for treatment of a sciatic nerve defect in a rat model, JBJS, 102 (2020) 245-253.

[51] P. Sensharma, G. Madhumathi, R.D. Jayant, A.K. Jaiswal, Biomaterials and cells for neural tissue engineering: Current choices, Materials Science and Engineering: C, 77 (2017) 1302-1315.

[52] S. Rhatomy, A. Arif, D.N. Utomo, D. Mulyadi, M.B. Salipi, R. Setyawan, N.R. Soekarno, Posterior Cruciate Ligament reconstruction augmentation on avulsion PCL: A case series, International Journal of Surgery Open, 20 (2019) 15-19.

[53] A. Cooper, N. Bhattarai, M. Zhang, Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan–PCL fibers for nerve tissue regeneration, Carbohydrate polymers, 85 (2011) 149-156.

[54] J. Gerardo-Nava, T. Führmann, K. Klinkhammer, N. Seiler, J. Mey, D. Klee, M. Möller, P.D. Dalton, G.A. Brook, Human neural cell interactions with orientated electrospun nanofibers in vitro, (2009).

[55] M. Fadaie, E. Mirzaei, B. Geramizadeh, Z. Asvar, Incorporation of nanofibrillated chitosan into electrospun PCL nanofibers makes scaffolds with enhanced mechanical and biological properties, Carbohydrate polymers, 199 (2018) 628-640.

[56] D. Gupta, J. Venugopal, M.P. Prabhakaran, V.G. Dev, S. Low, A.T. Choon, S. Ramakrishna, Aligned and random nanofibrous substrate for the in vitro culture of Schwann cells for neural tissue engineering, Acta biomaterialia, 5 (2009) 2560-2569.

[57] J. Xie, M.R. MacEwan, S.M. Willerth, X. Li, D.W. Moran, S.E. Sakiyama-Elbert, Y. Xia, Conductive core–sheath nanofibers and their potential application in neural tissue engineering, Advanced functional materials, 19 (2009) 2312-2318.

[58] K. Su, C. Wang, Recent advances in the use of gelatin in biomedical research, Biotechnology letters, 37 (2015) 2139-2145.

[59] S. Xiao, T. Zhao, J. Wang, C. Wang, J. Du, L. Ying, J. Lin, C. Zhang, W. Hu, L. Wang, K. Xu, Gelatin Methacrylate (GelMA)-Based Hydrogels for Cell Transplantation: an Effective Strategy for Tissue Engineering, Stem Cell Rev Rep, 15 (2019) 664-679.

[60] L. Di Muzio, F. Cienzo, P. Paolicelli, S. Petralito, S. Garzoli, C. Brandelli, J. Trilli, M.A. Casadei, A convenient strategy to synthesize highly tunable gelatin methacryloyl with very low gelation temperature, European Polymer Journal, 154 (2021) 110538.

[61] A. Assmann, A. Vegh, M. Ghasemi-Rad, S. Bagherifard, G. Cheng, E.S. Sani, G.U. Ruiz-Esparza, I. Noshadi, A.D. Lassaletta, S. Gangadharan, A. Tamayol, A. Khademhosseini, N. Annabi, A highly adhesive and naturally derived sealant, Biomaterials, 140 (2017) 115-127.

[62] B.J. Klotz, D. Gawlitta, A.J. Rosenberg, J. Malda, F.P. Melchels, Gelatin-methacryloyl hydrogels: towards biofabrication-based tissue repair, Trends in biotechnology, 34 (2016) 394-407.

[63] K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M.M. Alvarez, A. Tamayol, N. Annabi, A. Khademhosseini, Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels, Biomaterials, 73 (2015) 254-271.

[64] Y. Hu, Y. Wu, Z. Gou, J. Tao, J. Zhang, Q. Liu, T. Kang, S. Jiang, S. Huang, J. He, 3D-engineering of cellularized conduits for peripheral nerve regeneration, Scientific reports, 6 (2016) 1-12.

[65] W. Ye, H. Li, K. Yu, C. Xie, P. Wang, Y. Zheng, P. Zhang, J. Xiu, Y. Yang, F. Zhang, Y. He, Q. Gao, 3D printing of gelatin methacrylate-based nerve guidance conduits with multiple channels, Materials & Design, 192 (2020).

[66] Z. Wei, B.T. Harris, L.G. Zhang, Gelatin methacrylamide hydrogel with graphene nanoplatelets for neural cell-laden 3D bioprinting, Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc, 2016 (2016) 4185-4188.

[67] Y. Huang, K. Xu, J. Liu, G. Dai, J. Yin, P. Wei, Promotion of Adrenal Pheochromocytoma (PC-12) Cell Proliferation and Outgrowth Using Schwann Cell-Laden Gelatin Methacrylate Substrate, Gels, 8 (2022) 84.

[68] H. Zhuang, S. Bu, L. Hua, M.A. Darabi, X. Cao, M. Xing, Gelatin-methacrylamide gel loaded with microspheres to deliver GDNF in bilayer collagen conduit promoting sciatic nerve growth, Int J Nanomedicine, 11 (2016) 1383-1394.

[69] J. Park, J. Jeon, B. Kim, M.S. Lee, S. Park, J. Lim, J. Yi, H. Lee, H.S. Yang, J.Y. Lee, Electrically Conductive Hydrogel Nerve Guidance Conduits for Peripheral Nerve Regeneration, Advanced Functional Materials, 30 (2020).

[70] D. Choudhury, M. Yee, Z.L.J. Sheng, A. Amirul, M.W. Naing, Decellularization systems and devices: State-of-the-art, Acta Biomater, 115 (2020) 51-59.

[71] H. Capella-Monsonis, D.I. Zeugolis, Decellularized xenografts in regenerative medicine: From processing to clinical application, Xenotransplantation, 28 (2021) e12683.

[72] D. Schultheiss, A.I. Gabouev, S. Cebotari, I. Tudorache, T. Walles, N. Schlote, J. Wefer, P.M. Kaufmann, A. Haverich, U. Jonas, Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeding technique and short-term implantation in a porcine model, The Journal of urology, 173 (2005) 276-280.

[73] H. Ren, X. Shi, L. Tao, J. Xiao, B. Han, Y. Zhang, X. Yuan, Y. Ding, Evaluation of two decellularization methods in the development of a whole-organ decellularized rat liver scaffold, Liver International, 33 (2013) 448-458.

[74] S.E. Gilpin, J.P. Guyette, G. Gonzalez, X. Ren, J.M. Asara, D.J. Mathisen, J.P. Vacanti, H.C. Ott, Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale, The Journal of heart and lung transplantation, 33 (2014) 298-308.

[75] L.J. White, A.J. Taylor, D.M. Faulk, T.J. Keane, L.T. Saldin, J.E. Reing, I.T. Swinehart, N.J. Turner, B.D. Ratner, S.F. Badylak, The impact of detergents on the tissue decellularization process: a ToF-SIMS study, Acta biomaterialia, 50 (2017) 207-219.

[76] A. Gilpin, Y. Yang, Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications, Biomed Res Int, 2017 (2017) 9831534.

[77] T.J. Keane, I.T. Swinehart, S.F. Badylak, Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance, Methods, 84 (2015) 25-34.

[78] J.M. Aamodt, D.W. Grainger, Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response, Biomaterials, 86 (2016) 68-82.

[79] K. Sawada, D. Terada, T. Yamaoka, S. Kitamura, T. Fujisato, Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue, Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 83 (2008) 943-949.

[80] N. Çolak, Y. Tülek, Supercritical Fluid Extraction, Gıda Dergisi; Cilt: 28 Sayı: 3, (2003).

[81] B. Topuz, G. Gunal, S. Guler, H.M. Aydin, Use of supercritical CO2 in soft tissue decellularization, Methods Cell Biol, 157 (2020) 49-79.

[82] R.L. Mendes, B.P. Nobre, M.T. Cardoso, A.P. Pereira, A.F. Palavra, Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae, Inorganica Chimica Acta, 356 (2003) 328-334.

[83] S. Guler, B. Aslan, P. Hosseinian, H.M. Aydin, Supercritical Carbon Dioxide-Assisted Decellularization of Aorta and Cornea, Tissue Eng Part C Methods, 23 (2017) 540-547.

[84] T. Yu, Q. Ao, T. Ao, M.A. Ahmad, A. Wang, Y. Xu, Z. Zhang, Q. Zhou, Preparation and assessment of an optimized multichannel acellular nerve allograft for peripheral nerve regeneration, Bioengineering & Translational Medicine, (2022) e10435.

[85] V.K. Kuna, A. Lundgren, L.O. Anerillas, P. Kelk, M. Brohlin, M. Wiberg, P.J. Kingham, L.N. Novikova, G. Andersson, L.N. Novikov, Efficacy of Nerve-Derived Hydrogels to Promote Axon Regeneration Is Influenced by the Method of Tissue Decellularization, International Journal of Molecular Sciences, 23 (2022) 8746.

[86] T. Meder, T. Prest, C. Skillen, L. Marchal, V. Yupanqui, L. Soletti, P. Gardner, J. Cheetham, B. Brown, Nerve-specific extracellular matrix hydrogel promotes functional regeneration following nerve gap injury, NPJ Regenerative Medicine, 6 (2021) 69.

[87] K.A. Alberti, C.I. Neufeld, J. Wang, Q. Xu, In vivo peripheral nerve repair using tendon-derived nerve guidance conduits, ACS Biomaterials Science & Engineering, 2 (2016) 937-945.

[88] T. Wüthrich, I. Lese, D. Haberthür, C. Zubler, R. Hlushchuk, E. Hewer, L. Maistriaux, P. Gianello, B. Lengelé, R. Rieben, Development of vascularized nerve scaffold using perfusion-decellularization and recellularization, Materials Science and Engineering: C, 117 (2020) 111311.

[89] P.H. Suss, V.S.T. Ribeiro, C.E. Motooka, L.C. de Melo, F.F. Tuon, Comparative study of decellularization techniques to obtain natural extracellular matrix scaffolds of human peripheral-nerve allografts, Cell and Tissue Banking, (2021) 1-10.

[90] C. Philips, F. Campos, A. Roosens, M.d.C. Sánchez-Quevedo, H. Declercq, V. Carriel, Qualitative and quantitative evaluation of a novel detergent-based method for decellularization of peripheral nerves, Annals of biomedical engineering, 46 (2018) 1921-1937.

[91] W. Wang, S. Itoh, K. Takakuda, Comparative study of the efficacy of decellularization treatment of allogenic and xenogeneic nerves as nerve conduits, Journal of biomedical materials research Part A, 104 (2016) 445-454.

[92] L. Shi, V. Ronfard, Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review, International journal of burns and trauma, 3 (2013) 173.

[93] B. Yang, L. Zhou, Z. Sun, R. Yang, Y. Chen, Y. Dai, In vitro evaluation of the bioactive factors preserved in porcine small intestinal submucosa through cellular biological approaches, Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 93 (2010) 1100-1109.

[94] G. Cao, Y. Huang, K. Li, Y. Fan, H. Xie, X. Li, Small intestinal submucosa: superiority, limitations and solutions, and its potential to address bottlenecks in tissue repair, J Mater Chem B, 7 (2019) 5038-5055.

[95] K.-J. Yang, K.C. Park, H. Choi, J.-H. Choi, S.-R. Park, I.-W. Lee, H.-J. Lee, Identification and characterization of neurotrophic factors in porcine small intestinal submucosa, Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 11 (2014) 372-378.

[96] J.-S. Yi, H.-J. Lee, H.-J. Lee, I.-W. Lee, J.-H. Yang, Rat peripheral nerve regeneration using nerve guidance channel by porcine small intestinal submucosa, Journal of Korean Neurosurgical Society, 53 (2013) 65-71.

[97] R.M. Smith, C. Wiedl, P. Chubb, C.H. Greene, Role of small intestine submucosa (SIS) as a nerve conduit: preliminary report, Journal of Investigative Surgery, 17 (2004) 339-344.

[98] J.R. Suryavanshi, C. Cox, B.O. Osemwengie, H.B. Jones, B.J. MacKay, Sutureless repair of a partially transected median nerve using Tisseel glue and Axoguard nerve protector: A case report, Microsurgery, 40 (2020) 896-900.

[99] S. Guler, P. Hosseinian, H.M. Aydin, Hybrid aorta constructs via in situ crosslinking of poly (glycerol-sebacate) elastomer within a decellularized matrix, Tissue Engineering Part C: Methods, 23 (2017) 21-29.

[100] J. Xu, H. Fang, S. Zheng, L. Li, Z. Jiao, H. Wang, Y. Nie, T. Liu, K. Song, A biological functional hybrid scaffold based on decellularized extracellular matrix/gelatin/chitosan with high biocompatibility and antibacterial activity for skin tissue engineering, International Journal of Biological Macromolecules, 187 (2021) 840-849.

[101] S. Hong, G. Kim, Electrospun micro/nanofibrous conduits composed of poly (ε-caprolactone) and small intestine submucosa powder for nerve tissue regeneration, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 94 (2010) 421-428.

[102] S. Ghanbari Asl, S. Mashayekhan, M. Khanmohammadi, A cellular cardiac matrix-based porous microcarrier as a cell delivery system in myocardial tissue engineering application, Iranian Polymer Journal, 31 (2022) 1079-1091.

[103] H. Ramaraju, A. Ul-Haque, A.S. Verga, M.L. Bocks, S.J. Hollister, Modulating nonlinear elastic behavior of biodegradable shape memory elastomer and small intestinal submucosa (SIS) composites for soft tissue repair, Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 110 (2020) 103965.

[104] F.G. Mondalek, B.J. Lawrence, B.P. Kropp, B.P. Grady, K.-M. Fung, S.V. Madihally, H.-K. Lin, The incorporation of poly (lactic-co-glycolic) acid nanoparticles into porcine small intestinal submucosa biomaterials, Biomaterials, 29 (2008) 1159-1166.

[105] J.C. Luo, W. Chen, X.H. Chen, T.W. Qin, Y.C. Huang, H.Q. Xie, X.Q. Li, Z.Y. Qian, Z.M. Yang, A multi-step method for preparation of porcine small intestinal submucosa (SIS), Biomaterials, 32 (2011) 706-713.

[106] G. Zihna, B. Topuz, G. Günal, H.M. Aydin, Preparation of hybrid meniscal constructs using hydrogels and acellular matrices, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, (2022) 1-25.

[107] M. Uyaniklar, G. Gunal, A. Tevlek, P. Hosseinian, H.M. Aydin, Hybrid Cornea: Cell Laden Hydrogel Incorporated Decellularized Matrix, ACS Biomater Sci Eng, 6 (2020) 122-133.

[108] Y. Ji, J. Zhou, T. Sun, K. Tang, Z. Xiong, Z. Ren, S. Yao, K. Chen, F. Yang, F. Zhu, X. Guo, Diverse preparation methods for small intestinal submucosa (SIS): Decellularization, components, and structure, J Biomed Mater Res A, 107 (2019) 689-697.

[109] M. Rashtbar, J. Hadjati, J. Ai, S. Shirian, I. Jahanzad, M. Azami, S. Asadpuor, E. Sadroddiny, Critical-sized full-thickness skin defect regeneration using ovine small intestinal submucosa with or without mesenchymal stem cells in rat model, J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 106 (2018) 2177-2190.

[110] Y. Chai, J. Xu, Y. Zhang, J. Zhang, Z. Hu, H. Zhou, Evaluation of decellularization protocols for production of porcine small intestine submucosa for use in abdominal wall reconstruction, Hernia, 24 (2020) 1221-1231.

[111] T.K. Rajab, T.J. O'Malley, V. Tchantchaleishvili, Decellularized scaffolds for tissue engineering: Current status and future perspective, Artif Organs, 44 (2020) 1031-1043.

[112] S. Qiu, L. Liang, P. Zou, Q. Chen, Decellularized small intestine submucosa/polylactic-co-glycolic acid composite scaffold for potential application in hypopharyngeal and cervical esophageal tissue repair, Regen Biomater, 8 (2021) rbaa061.

[113] A. Ferdowsi Khosroshahi, J. Soleimani Rad, R. Kheirjou, B. Roshangar, M. Rashtbar, R. Salehi, M.R. Ranjkesh, L. Roshangar, Adipose tissue-derived stem cells upon decellularized ovine small intestine submucosa for tissue regeneration: An optimization and comparison method, J Cell Physiol, 235 (2020) 1556-1567.

[114] F.E. Uhl, F. Zhang, R.A. Pouliot, J.J. Uriarte, S.R. Enes, X. Han, Y. Ouyang, K. Xia, G. Westergren-Thorsson, A. Malmström, Functional role of glycosaminoglycans in decellularized lung extracellular matrix, Acta biomaterialia, 102 (2020) 231-246.

[115] M. Parmaksiz, A.E. Elcin, Y.M. Elcin, Decellularization of bovine small intestinal submucosa and its use for the healing of a critical-sized full-thickness skin defect, alone and in combination with stem cells, in a small rodent model, J Tissue Eng Regen Med, 11 (2017) 1754-1765.

[116] D.M. Casali, R.M. Handleton, T. Shazly, M.A. Matthews, A novel supercritical CO2-based decellularization method for maintaining scaffold hydration and mechanical properties, The Journal of Supercritical Fluids, 131 (2018) 72-81.

[117] Y. Seo, Y. Jung, S.H. Kim, Decellularized heart ECM hydrogel using supercritical carbon dioxide for improved angiogenesis, Acta biomaterialia, 67 (2018) 270-281.

[118] Z. Frazer, C. Yoo, M. Sroya, C. Bellora, B.L. DeWitt, I. Sanchez, G.A. Thomas, W. Mathieson, Effect of different proteinase K digest protocols and deparaffinization methods on yield and integrity of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 68 (2020) 171-184.

[119] B.S. Kim, J.U. Kim, K.H. So, N.S. Hwang, Supercritical fluid-based decellularization technologies for regenerative medicine applications, Macromolecular Bioscience, 21 (2021) 2100160.

[120] P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, Biomaterials, 32 (2011) 3233-3243.

[121] H. Xie, W. Yang, J. Chen, J. Zhang, X. Lu, X. Zhao, K. Huang, H. Li, P. Chang, Z. Wang, A silk sericin/silicone nerve guidance conduit promotes regeneration of a transected sciatic nerve, Advanced Healthcare Materials, 4 (2015) 2195-2205.

[122] G. Totonelli, P. Maghsoudlou, M. Garriboli, J. Riegler, G. Orlando, A.J. Burns, N.J. Sebire, V.V. Smith, J.M. Fishman, M. Ghionzoli, A rat decellularized small bowel scaffold that preserves villus-crypt architecture for intestinal regeneration, Biomaterials, 33 (2012) 3401-3410.

[123] N.N. Giang, X.T. Trinh, J. Han, P.N. Chien, J. Lee, S.R. Noh, Y. Shin, S.Y. Nam, C.Y. Heo, Effective decellularization of human skin tissue for regenerative medicine by supercritical carbon dioxide technique, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 16 (2022) 1196-1207.

[124] X. Li, S. Chen, J. Li, X. Wang, J. Zhang, N. Kawazoe, G. Chen, 3D Culture of Chondrocytes in Gelatin Hydrogels with Different Stiffness, Polymers (Basel), 8 (2016).

[125] X. Zhao, X. Sun, L. Yildirimer, Q. Lang, Z.Y.W. Lin, R. Zheng, Y. Zhang, W. Cui, N. Annabi, A. Khademhosseini, Cell infiltrative hydrogel fibrous scaffolds for accelerated wound healing, Acta Biomater, 49 (2017) 66-77.

[126] I. Pepelanova, K. Kruppa, T. Scheper, A. Lavrentieva, Gelatin-methacryloyl (GelMA) hydrogels with defined degree of functionalization as a versatile toolkit for 3D cell culture and extrusion bioprinting, Bioengineering, 5 (2018) 55.

[127] X. Zhou, W. Zhu, M. Nowicki, S. Miao, H. Cui, B. Holmes, R.I. Glazer, L.G. Zhang, 3D bioprinting a cell-laden bone matrix for breast cancer metastasis study, ACS applied materials & interfaces, 8 (2016) 30017-30026.

[128] C.G. Williams, A.N. Malik, T.K. Kim, P.N. Manson, J.H. Elisseeff, Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation, Biomaterials, 26 (2005) 1211-1218.

[129] V. Dulong, S. Lack, D. Le Cerf, L. Picton, J. Vannier, G. Muller, Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. Synthesis and characterization, Carbohydrate Polymers, 57 (2004) 1-6.

[130] J.M. Zuidema, C.J. Rivet, R.J. Gilbert, F.A. Morrison, A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 102 (2014) 1063-1073.

[131] G. Stojkov, Z. Niyazov, F. Picchioni, R.K. Bose, Relationship between structure and rheology of hydrogels for various applications, Gels, 7 (2021) 255.

[132] I.A. Barroso, K. Man, T.E. Robinson, S.C. Cox, A.K. Ghag, Photocurable gelma adhesives for corneal perforations, Bioengineering, 9 (2022) 53.

[133] K. Rahali, G. Ben Messaoud, C.J.F. Kahn, L. Sanchez-Gonzalez, M. Kaci, F. Cleymand, S. Fleutot, M. Linder, S. Desobry, E. Arab-Tehrany, Synthesis and Characterization of Nanofunctionalized Gelatin Methacrylate Hydrogels, Int J Mol Sci, 18 (2017).

[134] M. Sun, X. Sun, Z. Wang, S. Guo, G. Yu, H. Yang, Synthesis and Properties of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels and Their Recent Applications in Load-Bearing Tissue, Polymers (Basel), 10 (2018).

[135] M. Zhu, Y. Wang, G. Ferracci, J. Zheng, N.-J. Cho, B.H. Lee, Gelatin methacryloyl and its hydrogels with an exceptional degree of controllability and batch-to-batch consistency, Scientific reports, 9 (2019) 1-13.

[136] D. Loessner, C. Meinert, E. Kaemmerer, L.C. Martine, K. Yue, P.A. Levett, T.J. Klein, F.P. Melchels, A. Khademhosseini, D.W. Hutmacher, Functionalization,

preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl–based hydrogels as modular tissue culture platforms, Nature protocols, 11 (2016) 727-746.

[137] W. Zhu, B.T. Harris, L.G. Zhang, Gelatin methacrylamide hydrogel with graphene nanoplatelets for neural cell-laden 3D bioprinting, 2016 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), IEEE, 2016, pp. 4185-4188.

[138] T.T. Lau, D.-A. Wang, Bioresponsive hydrogel scaffolding systems for 3D constructions in tissue engineering and regenerative medicine, Nanomedicine, 8 (2013) 655-668.

[139] M. Vigata, C. Meinert, S. Pahoff, N. Bock, D.W. Hutmacher, Gelatin methacryloyl hydrogels control the localized delivery of albumin-bound paclitaxel, Polymers, 12 (2020) 501.

[140] A.H. Annor, M.E. Tang, C.L. Pui, G.C. Ebersole, M.M. Frisella, B.D. Matthews, C.R. Deeken, Effect of enzymatic degradation on the mechanical properties of biological scaffold materials, Surgical endoscopy, 26 (2012) 2767-2778.

[141] K.L. Menzies, L. Jones, The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials, Optometry and Vision Science, 87 (2010) 387-399.

[142] R.L. Alexa, H. Iovu, B. Trica, C. Zaharia, A. Serafim, E. Alexandrescu, I.-C. Radu, G. Vlasceanu, S. Preda, C.M. Ninciuleanu, Assessment of naturally sourced mineral clays for the 3D printing of biopolymer-based nanocomposite inks, Nanomaterials, 11 (2021) 703.

[143] D. Wei, W. Xiao, J. Sun, M. Zhong, L. Guo, H. Fan, X. Zhang, A biocompatible hydrogel with improved stiffness and hydrophilicity for modular tissue engineering assembly, Journal of Materials Chemistry B, 3 (2015) 2753-2763.

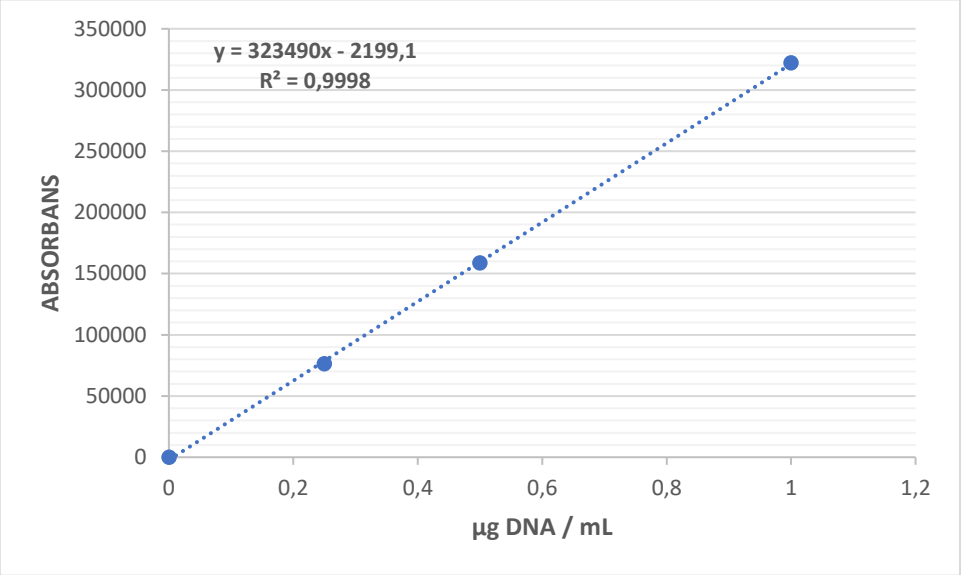
[144] M.A. Zachari, P.S. Chondrou, S.E. Pouliliou, A.G. Mitrakas, I. Abatzoglou, C.E. Zois, M.I. Koukourakis, Evaluation of the alamarblue assay for adherent cell irradiation experiments, Dose-Response, 12 (2014) dose-response. 13-024. Koukourakis.

[145] H. Yin, M. Zhu, Y. Wang, L. Luo, Q. Ye, B.H. Lee, Physical properties and cellular responses of gelatin methacryloyl bulk hydrogels and highly ordered porous hydrogels, Frontiers in Soft Matter, 2 32.

EKLER

EK 1 – KALİBRASYON GRAFİKLERİ

1.1.DNA KALİBRASYON GRAFİĞİ



1.2.GAG KALİBRASYON GRAFİĞİ

