



**T.C.  
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**HÜCRE KÜLTÜRÜNDEN HÜCRESİZLEŞTİRME TEKNİĞİ İLE ELDE  
EDİLEN HÜCRE DIŞI MATRİKS YAPISININ DOKU MÜHENDİSLİĞİ  
UYGULAMALARINDA KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Çiğdem İNCİ AYDEMİR**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Doktora Programı**

**TEMMUZ 2024**

T.C.  
BURSA TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

HÜCRE KÜLTÜRÜNDEN HÜCRESİZLEŞTİRME TEKNİĞİ İLE ELDE  
EDİLEN HÜCRE DIŞI MATRİKS YAPISININ DOKU MÜHENDİSLİĞİ  
UYGULAMALARINDA KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Çiğdem İNCİ AYDEMİR

(171083201)

ORCID: 0000-0001-6814-0585

Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Biyoteknoloji Doktora Programı

Danışman: Doç. Dr. Gökçe TANER

ORCID: 0000-0002-0290-1166

TEMMUZ 2024



BTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 171083201 numaralı Doktora Öğrencisi Çiğdem İNCİ AYDEMİR, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “HÜCRE KÜLTÜRÜNDEN HÜCRESİZLEŞTİRME TEKNİĞİ İLE ELDE EDİLEN HÜCRE DIŞI MATRİKS YAPISININ DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARINDA KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :**      **Doç. Dr. Gökçe TANER** .....  
Bursa Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :**      **Prof. Dr. Ferda ARI** .....  
Bursa Uludağ Üniversitesi

**Prof. Dr. Nilüfer ÇINKILIÇ** .....  
Bursa Uludağ Üniversitesi

**Prof. Dr. Mete YILMAZ** .....  
Bursa Teknik Üniversitesi

**Doç. Dr. Emel TAMAHKAR IRMAK** .....  
Bursa Teknik Üniversitesi

**Teslim Tarihi**      :  
**Savunma Tarihi**    : **10 Temmuz 2024**



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Bursa Teknik Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, Bursa Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün 210ÖAP05 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 223S660 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

## İNTİHAL BEYANI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belgelediğimi, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Çiğdem İnci Aydemir

İmzası:

X X X X X

## ÖNSÖZ

Doktora öğrenimim ve tez sürecim boyunca desteğini, hoşgörüsünü ve güler yüzünü eksik etmeyen, bilgi ve tecrübelerini araştırmamın her aşamasında benimle paylaşan ve yol gösteren değerli danışman hocam Doç. Dr.Gökçe TANER'e,

Tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Ferda ARI ve Doç. Dr. Emel TAMAHKAR IRMAK'a,

Her zaman yanımda olan, birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım sevgili arkadaşım Araş. Gör. Elife KILDALI'ya,

Hayatıma güzellik katan, manevi desteği ile her zaman benimle olan sevgili dostum Dr. Gizem TURAÇ KARAKURT'a,

Her anımda desteklerini hissettiğim, hiçbir fedakarlıktan çekinmeyen ve bana yol gösteren annem Zekiye İNCİ ve babam Kenan İNCİ'ye,

Desteğiyle çok güçlü hissettiren, her zaman beni cesaretlendiren ve yanımda olan sevgili eşim Osman AYDEMİR'e, hayattaki en büyük şansım, sevgi dolu, biricik kızım İnci AYDEMİR'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmamı TÜBİTAK 1002-A Hızlı Destek Modülü Programı kapsamında 223S660 numaralı proje ile destekleyen TÜBİTAK'a,

210ÖAP05 numaralı proje desteği ile Bursa Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne,

Doktora sürecim boyunca beni Bursa Teknik Üniversitesi YÖK 100/2000 "Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği" öncelikli alanlar doktora burs programı ile destekleyen Yükseköğretim Kurulu'na,

TÜBİTAK 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı ile desteklerinden dolayı TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Temmuz 2024

Çiğdem İNCİ AYDEMİR

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
KISALTMALAR .....	x
SEMBOLLER .....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xvi
SUMMARY .....	xviii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ .....</b>	<b>4</b>
2.1 Hücre Dışı Matriks .....	4
2.1.1 HDM'nin yapısı .....	5
2.1.1.1 Proteoglikan ve Glikozaminoglikan.....	5
2.1.1.2 Kolajen .....	6
2.1.1.3 Elastin.....	6
2.1.1.4 Fibronektin .....	7
2.1.1.5 Laminin .....	7
2.1.2 HDM'nin yeniden şekillenmesi .....	7
2.1.3 HDM'nin görevleri .....	9
2.2 Doku Mühendisliği ve HDM.....	10
2.3 Hüresizleştirme (Deselülarizasyon).....	12
2.3.1 Doku ve organlarda hüresizleştirme.....	12
2.3.2 Hücre kültüründe hüresizleştirme .....	13
2.3.3 HDM eldesinde doku/organ ya da kültürlenmiş hücrelerin kullanımı.....	15
2.4 Biyomalzemeler .....	16
2.4.1 Biyopolimerler .....	18
2.4.1.1 Polivinil alkol (PVA) .....	18
2.4.1.2 Kitosan .....	19
2.4.1.3 Jelatin .....	20
2.4.2 Metaller .....	20
2.4.3 Seramikler .....	20
2.4.4 Kompozitler .....	21
2.5 Yara Örtüsü .....	21
2.5.1 Hidrojel yara örtüleri.....	23
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>25</b>
3.1 L929 Hücre Kültürü, Çoğaltılması ve Depolanması .....	25
3.2 HDM Sentezi İçin Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmaları .....	25
3.3 Hüresizleştirme Teknikleri İle HDM'nin Elde Edilmesi.....	25
3.3.1 Triton X-100/amonyum hidroksit uygulaması.....	26
3.3.2 Termal şok uygulaması .....	26

3.3.3 EDTA uygulaması.....	26
3.4 Hüresizleştirme İşleminin Gösterilmesi .....	26
3.5 HDM İçeriğinin Belirlenmesi.....	27
3.5.1 BCA analizi.....	27
3.5.2 Sirius red boyaması.....	27
3.6 HDM'lerin Sitotoksik/Genotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi .....	28
3.6.1 Sitotoksitenin değerlendirilmesi.....	28
3.6.2 Genotoksitenin değerlendirmesi.....	29
3.7 Antibiyotik Yüklü Jelatin Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu ....	29
3.7.1 SEM analizi.....	30
3.7.2 Jelatin nanopartiküllere antibiyotik yüklenmesi .....	30
3.8 HDM Katkılı PVA-Gel-Cs-GelNP Hidrojellerin Hazırlanması.....	30
3.9 Hidrojellerin Karakterizasyonu .....	32
3.9.1 FTIR analizi .....	32
3.9.2 SEM analizi.....	32
3.9.3 Çekme-basma testi .....	32
3.9.4 Şişme testleri .....	32
3.9.5 Termal Gravimetrik Analiz.....	33
3.9.6 Hidrolitik degradasyon testleri.....	33
3.9.7 Su buharı geçirgenlik testleri .....	33
3.10 Hidrojellerin <i>in vitro</i> Biyouyumluluklarının Belirlenmesi.....	34
3.11 Hidrojellerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	35
3.12 Hidrojellerin Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri .....	35
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>37</b>
4.1 L929 Hücre Kültürü .....	37
4.2 HDM Sentezi.....	37
4.3 Hüresizleştirme İşlemleri.....	39
4.4 Hüresizleştirme İşleminin Gösterilmesi .....	40
4.4.1 SEM analizi.....	43
4.5 HDM İçeriğinin Belirlenmesi.....	44
4.5.1 BCA analizi.....	44
4.5.2 Sirius red boyaması.....	46
4.6 HDM'lerin Sitotoksik/Genotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi .....	49
4.6.1 Sitotoksitenin değerlendirilmesi.....	49
4.6.2 Genotoksitenin değerlendirilmesi.....	50
4.7 Antibiyotik Yüklü Jelatin Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu ....	52
4.7.1 SEM analizi ve boyut ölçümü.....	52
4.7.2 Jelatin nanopartiküllere antibiyotik yüklenmesi .....	52
4.8 HDM Katkılı PVA-Gel-Cs-GelNP Hidrojellerin Hazırlanması.....	53
4.9 Hidrojel Karakterizasyonu .....	54
4.9.1 FTIR analizi .....	54
4.9.2 SEM analizi.....	56
4.9.3 Çekme-basma testi .....	60
4.9.4 Şişme testleri .....	62
4.9.5 Termal gravimetrik analiz.....	63
4.9.6 Hidrolitik degradasyon testleri.....	64
4.9.7 Su buharı geçirgenlik testleri .....	65
4.10 Hidrojellerin <i>in vitro</i> Biyouyumluluklarının Belirlenmesi.....	66
4.10.1 MTT analizi.....	70
4.10.2 Nötral kırmızı alım testi .....	70

4.11 Hidrojellerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	72
4.12 Hidrojellerin Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri .....	75
<b>5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER .....</b>	<b>81</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>85</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>95</b>



## KISALTMALAR

<b>Cm</b>	: Santimetre
<b>Cs</b>	: Kitosan
<b>FGF</b>	: Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>g</b>	: Gram
<b>GAG</b>	: Glikozaminoglikan
<b>Gel</b>	: Jelatin
<b>GelNP</b>	: Jelatin Nanopartikül
<b>HDM</b>	: Hücre Dışı Matriks
<b>LOX</b>	: Lizil Oksidaz
<b>mg</b>	: Miligram
<b>MKH</b>	: Mezenkimal Kök Hücre
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>MMP</b>	: Matriks Metalloproteinaz
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
<b>NKA</b>	: Nötral Kırmızı Alım
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>PG</b>	: Proteoglikan
<b>PGA</b>	: Poliglikolik Asit
<b>PLA</b>	: Polilaktik Asit
<b>PVA</b>	: Polivinil Alkol
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre

## SEMBOLLER

<b>w<sub>0</sub></b>	: Şişen Hidrojelin Ağırlığı
<b>w<sub>T</sub></b>	: Kuru Hidrojelin Ağırlığı
<b>W<sub>0</sub></b>	: Hidrojelin Başlangıçtaki Kuru Ağırlığı
<b>W<sub>f</sub></b>	: Hidrojelin İşlem Sonundaki Kuru Ağırlığı
<b>A</b>	: Membran Alanı
<b>WVTR</b>	: Su Buharı Geçirgenlik Değeri
<b>W<sub>t</sub></b>	: Salınan İlaç Miktarı
<b>W<sub>c</sub></b>	: Hidrojelin Bileşimindeki Toplam İlaç Miktarı

## ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1 Hibrit hidrojel gruplarının adlandırılması.....	31
Çizelge 4.1 Bir hafta kültür sonrası DNA ölçümlerinin p değerleri. ....	41
Çizelge 4.2 Üç hafta kültür sonrası DNA ölçümlerinin p değerleri. ....	41
Çizelge 4.3 Altı hafta kültür sonrası DNA ölçümlerinin p değerleri. ....	41
Çizelge 4.4 Hidrojellerin elastisite modülü ve basma dayanımı ölçüm sonuçları. ....	61
Çizelge 4.5 Hidrojellerin <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> ve <i>E. coli</i> üzerinde belirlenmiş zon çapları (mm). ....	74

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 HDM-hücre etkileşimi sonucu düzenlenen hücresel süreçler [22].....	9
Şekil 2.2 Biyomalzemelerin tarihçesi [60].....	17
Şekil 4.1 L929 hücrelerinin kültürün birinci (A) ve üçüncü (B) günlerdeki inverted mikroskopta alınan görüntüleri (10X).....	37
Şekil 4.2 L929 hücre kültürünün 1 hafta sonunda inverted mikroskopta alınan görüntüsü (10X). ....	38
Şekil 4.3 L929 hücre kültürünün 3 hafta sonunda inverted mikroskopta alınan görüntüsü (10X). ....	38
Şekil 4.4 L929 hücre kültürünün 6 hafta sonunda inverted mikroskopta alınan görüntüsü (10X). ....	39
Şekil 4.5 Hücre ve matriksin kültür kabından kazınarak toplanması. ....	39
Şekil 4.6 Uygulanan farklı hücresizleştirme yöntemleri sonrasında ortamda kalan DNA miktarları. ....	40
Şekil 4.7 EDTA uygulaması ile hücresizleştirmede sonrası kalan yüzde DNA miktarlarının kültür süresine göre değişimi. ....	42
Şekil 4.8 EDTA ile hücresizleştirme sonrası DNase uygulanan ve uygulanmayan örneklerde kalan DNA miktarları ( $p=0,09$ ).....	42
Şekil 4.9 Triton X100/amonyum hidroksit ile hücresizleştirme sonrasında DNase uygulamasının DNA miktarı üzerindeki etkisi ( $p<0,05$ ).....	43
Şekil 4.10 HDM gruplarının (A,B: Triton X100/amonyum hidroksit; C,D: dondurma/çözme; E,F: EDTA) SEM görüntüleri. ....	44
Şekil 4.11 Bir T75 flastktan elde edilen dHDM'lerdeki toplam protein miktarları... 45	45
Şekil 4.12 Bir hafta kültür sonrası elde edilen HDM'lerin sirius red boyama görüntüleri (A: Triton X100/amonyum hidroksit, B: Dondurma/çözme, C:EDTA, D:Kontrol).....	46
Şekil 4.13 Üç hafta kültür sonrası elde edilen HDM'lerin sirius red boyama görüntüleri (A: Triton X100/amonyum hidroksit, B: Dondurma/çözme, C:EDTA, D:Kontrol).....	47
Şekil 4.14 Altı hafta kültür sonrası elde edilen HDM'lerin sirius red boyama görüntüleri (A: Triton X100/amonyum hidroksit, B: Dondurma/çözme, C:EDTA, D:Kontrol).....	48
Şekil 4.15 Sirius red boyamalarının spektrofotometrik ölçümleri.....	48
Şekil 4.16 HDM kaplı yüzeylerde 24 saat kültür edilen hücrelerin MTT canlılık analizi sonuçları.....	50
Şekil 4.17 HDM üzerinde bir gün kültür edilen hücrelerin comet analizi sonuçları. 51	51
Şekil 4.18 HDM üzerinde bir gün kültür edilen hücrelerin comet analizi sonuçları. 51	51
Şekil 4.19 Jelatin nanopartiküllere ait SEM görüntüleri.....	52
Şekil 4.20 Gentamisine ait, 285 nm dalgaboyunda alınan ölçümler ile elde edilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi.....	53
Şekil 4.21 HDM katkılı ve katkısız hidrojellerin kurutmadan sonraki görünüşleri. 54	54

Şekil 4.22 Hidrojel 1'e ait FTIR spektrumu. ....	54
Şekil 4.23 Hidrojel 2'ye ait FTIR spektrumu. ....	55
Şekil 4.24 Hidrojel 3'e ait FTIR spektrumu. ....	55
Şekil 4.25 Hidrojel Kontrol'e ait FTIR spektrumu. ....	55
Şekil 4.26 Hidrojel Katkısız'a ait FTIR spektrumu. ....	56
Şekil 4.27 Hidrojel-1'e ait SEM görüntüsü. ....	57
Şekil 4.28 Hidrojel-2'ye ait SEM görüntüsü. ....	57
Şekil 4.29 Hidrojel-3'e ait SEM görüntüsü. ....	58
Şekil 4.30 Kontrol hidrojele ait SEM görüntüsü. ....	58
Şekil 4.31 Katkısız hidrojele ait SEM görüntüleri. ....	59
Şekil 4.32 Hidrojellerin ortalama gözenek boyutları. ....	60
Şekil 4.33 Hidrojellerin çekme testi, kuvvet-uzama grafikleri (A: Hidrojel 1, B: Hidrojel 2, C: Hidrojel 3, D: Hidrojel Kontrol, E: Hidrojel Katkısız). ...	61
Şekil 4.34 Hidrojellerin basma testi, kuvvet-uzama grafikleri (A: Hidrojel 1, B: Hidrojel 2, C: Hidrojel 3, D: Hidrojel Kontrol, E: Hidrojel Katkısız). ...	62
Şekil 4.35 Hidrojellerin şişme testi sonuçları. ....	63
Şekil 4.36 Hidrojel gruplarının TGA eğrileri (1: Hidrojel 1, 2: Hidrojel 2, 3: Hidrojel 3, 4: Hidrojel kontrol, 5: Hidrojel katkısız). ....	64
Şekil 4.37 Hidrojel gruplarının günlere göre degradasyon oranı. ....	65
Şekil 4.38 HDM katkılı ve kontrol grubu hidrojellerin WVTR değerleri. ....	66
Şekil 4.39 Hidrojel-1 ekstraktının farklı konsantrasyonları ile 24 saat kültür edilen hücrelerin mikroskop görüntüleri (A:%25, B:%50, C:%75, D:%100). ..	67
Şekil 4.40 Hidrojel-2 ekstraktının farklı konsantrasyonları ile 24 saat kültür edilen hücrelerin mikroskop görüntüleri (A:%25, B:%50, C:%75, D:%100). ..	67
Şekil 4.41 Hidrojel-3 ekstraktının farklı konsantrasyonları ile 24 saat kültür edilen hücrelerin mikroskop görüntüleri (A:%25, B:%50, C:%75, D:%100). ..	68
Şekil 4.42 Hidrojel-kontrol ekstraktının farklı konsantrasyonları ile 24 saat kültür edilen hücrelerin mikroskop görüntüleri (A:%25, B:%50, C:%75, D:%100). ....	69
Şekil 4.43 Standart kültür kabı yüzeyinde kültür edilen kontrol hücrelerinin mikroskop görüntüleri. ....	69
Şekil 4.44 Hidrojel ve hidrojel içeriğindeki polimerlerin farklı konsantrasyonlarının uygulandığı fibroblastların MTT analizi. ....	70
Şekil 4.45 Hidrojel ve hidrojel içeriğindeki polimerlerin farklı konsantrasyonlarının uygulandığı fibroblastların nötral kırmızı alım testi sonuçları. ....	71
Şekil 4.46 Hidrojellerin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> üzerinde oluşturdukları zon görüntüleri. ....	73
Şekil 4.47 Hidrojellerin <i>Staphylococcus aureus</i> üzerinde oluşturdukları zon görüntüleri. ....	74
Şekil 4.48 Hidrojellerin <i>Escherichia coli</i> üzerinde oluşturdukları zon görüntüleri. ....	74
Şekil 4.49 Hidrojel 1 ekstraktı ile inkübasyon sırasında <i>in vitro</i> yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat). ....	75
Şekil 4.50 Hidrojel 1 (%50) ekstraktı ile inkübasyon sırasında <i>in vitro</i> yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat). ....	76
Şekil 4.51 Hidrojel 2 ekstraktı ile inkübasyon sırasında <i>in vitro</i> yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat). ....	76
Şekil 4.52 Hidrojel 2 (%50) ekstraktı ile inkübasyon sırasında <i>in vitro</i> yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat). ....	77
Şekil 4.53 Hidrojel 3 ekstraktı ile inkübasyon sırasında <i>in vitro</i> yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat). ....	77

<b>Şekil 4.54</b> Hidrojel 3 (%50) ekstraktı ile inkübasyon sırasında <i>in vitro</i> yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat).....	<b>78</b>
<b>Şekil 4.55</b> Hidrojel Kontrol ekstraktı ile inkübasyon sırasında <i>in vitro</i> yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat).....	<b>79</b>
<b>Şekil 4.56</b> Hidrojel Kontrol (%50) ekstraktı ile inkübasyon sırasında <i>in vitro</i> yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat).	<b>79</b>
<b>Şekil 4.57</b> Kontrol grubu <i>in vitro</i> yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat).....	<b>80</b>



# HÜCRE KÜLTÜRÜNDEN HÜCRESİZLEŞTİRME TEKNİĞİ İLE ELDE EDİLEN HÜCRE DIŞI MATRİKS YAPISININ DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARINDA KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

## ÖZET

Günümüzde işlevselliğin yitirmiş ya da kaybedilen olan doku ve organların yerine konması amacıyla doku mühendisliği çalışmaları yoğun ilgi görmektedir. Doğal ya da sentetik polimerler kullanılarak dokunun doğal yapısına uygun özelliklerde üretilen yapı iskeleleri ile başarı oranının artırılması hedeflenmektedir. Bu amaçla genellikle doğal doku yapısı örnek alınmakta ve dokunun özelliklerini en iyi şekilde taklit edebilecek malzemeler ve tasarımlar seçilmektedir.

Hücreler tarafından üretilen hücre dışı matriks (HDM), sağladığı mekanik destek ile dokularda doğal bir iskele görevi üstlenmektedir. Bunun yanında hücresel süreçlerin düzenlenmesinde kritik bir rolü bulunmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle HDM, doku mühendisliği çalışmalarında hücrelerin desteklenmesi ve biyouyumluluğun artırılması amacıyla kullanılabilir önemli bir kaynaktır. Gelişimin erken evrelerinde oluşturulan HDM içeriği, dokunun ihtiyacına göre sürekli yeniden düzenlenmektedir. Çeşitli sinyal molekülleri ve yapısal proteinlerden oluşan HDM içeriği dokuya özgün ve dinamik bir yapıdır. Sentetik olarak taklit edilmesi neredeyse imkansızdır.

Hücre kültüründen hücresizleştirme ile HDM elde edilebilmekte ve yapı iskelelerinin üretiminde kullanılabilir. Fiziksel, kimyasal, biyolojik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen hücresizleştirme ile HDM mümkün olduğunca korunarak elde edilebilmektedir. Büyük ölçekli üretime elverişli, biyoaktif içeriğin düzenlenebildiği ve otolog üretimin de mümkün olduğu bir yöntemdir. Hücre kültüründe HDM üretiminde kullanılan hücre tipi, kültür koşulları ve hücresizleştirme yöntemleri, elde edilen matriksin yapısını ve içeriğini etkilemektedir. Bu nedenle her bir hücre tipi için hücresizleştirmede kullanılan tekniklerin detaylıca araştırılması, biyolojik özelliklerinin belirlenmesi önem arz etmektedir. Sunulan tez çalışmasında fibroblast hücre hattı kullanılarak farklı yöntemler ile elde edilen HDM'lerin protein içeriği ve sito/genotoksik etkilerinin karşılaştırılması ve HDM katkılı hidrojel yara örtüsü üretimi, karakterizasyonu ve yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler ile elde edilen HDM'lerde DNA ve toplam protein miktarlarının karşılaştırılması yapılarak kullanılan tekniklerin etkinliği belirlenmiştir. Ayrıca matriks yapısında bulunan kolajen miktarı ve dağılımları incelenmiştir. Uygulanan fiziksel ve kimyasal yöntemlerin biyolojik yönetime göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda farklı kültür sürelerinin elde edilen HDM miktarları ve yapıları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Uygulanan bir, üç ve altı haftalık kültürlerde üretilen HDM'lerin protein miktarları karşılaştırıldığında üç haftalık kültürün en verimli kültür süresi olduğu belirlenmiştir. Fiziksel ve biyolojik yöntemlerin dHDM yapısındaki kolajen miktarını daha iyi koruduğu tespit edilmiştir.

Farklı teknikler ile elde edilen HDM'ler, gentamisin yüklü jelatin nanopartikül içeren PVA-Gel-Cs (polivinil alkol-jelatin-kitosan) hibrit hidrojel üretiminde katkı olarak kullanılmıştır. Gentamisin içeren hidrojellerin antimikrobiyal etkileri disk difüzyon testi ile gösterilmiştir. Hidrojellerin karakterizasyon, biyoyumluluk testleri ve *in vitro* çizik testleri yapılmıştır. dHDM katkılı hidrojellerin biyoyumlu olduğu, hücre çoğalmasını desteklediği ve yara iyileşmesini hızlandırdığı belirlenmiştir.

Farklı hücreleştirme yöntemleri, elde edilen HDM'nin yapı ve biyolojik aktivitelerini değiştirmektedir. Bu nedenle yöntem karşılaştırmalarının yapıldığı daha detaylı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Hücre kültüründen elde edilen dHDM'lerin biyomalzemelerin etkinliğini artırmak için önemli bir katkı malzemesi olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Hücreleştirme, Hücre Dışı Matriks, Hücre Kültürü, Hidrojel, Yara Örtüsü, Nanopartikül.



# **INVESTIGATION OF THE USE OF EXTRACELLULAR MATRIX STRUCTURE OBTAINED FROM CELL CULTURE BY DECELLULARIZATION TECHNIQUE FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS**

## **SUMMARY**

Tissue engineering research focused on restoring missing or injured tissues and organs has recently received much interest. The goal is to improve success rates by creating scaffolds that imitate the essential characteristics of tissues, which are frequently produced from natural or synthetic polymers. In this pursuit, the natural tissue structure is often used as a reference, and materials and designs that can best mimic the tissue's properties are selected.

Cells produce extracellular matrix (ECM), which acts as a natural scaffold in tissues, providing mechanical support and playing an important role in regulating cellular processes. Due to these properties, ECM is a valuable resource that can be used for tissue engineering to support cells and improve biocompatibility. The ECM content generated during the early stages of development is constantly changed according to the needs of the tissue. The ECM content is a tissue-specific and dynamic structure made of numerous signaling chemicals and structural proteins, making synthetic replication almost impossible.

ECM can be obtained through decellularization from cell cultures and can be used in the production of scaffolds. Decellularization, which can be carried out using physical, chemical, and biological methods, aims to preserve the ECM as much as possible. This method is suitable for large-scale production, allows for the regulation of bioactive content, and enables autologous production. The type of cells used in ECM production in cell culture, culture conditions, and decellularization methods affect the structure and content of the obtained matrix. Therefore, it is crucial to thoroughly investigate the techniques used for decellularization for each cell type and to determine their biological properties. In the presented thesis, it is aimed to compare the protein content and cyto/genotoxic effects of ECMs obtained using different methods with a fibroblast cell line and to investigate the production, characterization, and effects on wound healing of ECM-supplemented hydrogel wound dressings.

The effectiveness of the techniques was determined by comparing the DNA and total protein amounts in ECMs obtained by physical, chemical, and biological methods. Additionally, the amount and distribution of collagen in the matrix structure were examined. It was determined that physical and chemical methods were more effective than the biological method. The effects of different culture durations on the amounts and structures of the obtained ECMs were also investigated. Comparing the protein amounts in ECMs produced in one, three, and six-week cultures, it was found that a three-week culture was the most efficient duration. It was also shown that the collagen content in the dHDM structure was more effectively retained by physical and biological techniques.

ECMs obtained using different techniques were used as additives in the production of PVA-Gel-Cs (polyvinyl alcohol-gelatin-chitosan) hybrid hydrogel containing gentamicin-loaded gelatin nanoparticles. The antimicrobial effects of the hydrogels containing gentamicin were demonstrated by the disk diffusion method. Characterization, biocompatibility tests, and *in vitro* scratch tests of the hydrogels were conducted. It was determined that the hydrogels with dHDM additives were biocompatible, supported cell proliferation, and accelerated wound healing.

Different decellularization methods alter the structure and biological activities of the obtained HDMs. Therefore, more detailed research is needed to compare these methods. It is considered that dHDMs obtained from cell cultures are important additive materials to enhance the effectiveness of biomaterials.

**Keywords:** Decellularization, Extracellular Matrix, Cell Culture, Hydrogel, Wound Dressing, Nanoparticle.



## 1. GİRİŞ

Günümüzde doku/organ kaybı ya da hasarı durumunda yaygın olarak başvuru alan yöntemler organ nakli, mekanik tıbbi cihazlar veya cerrahi rekonstrüksiyondur. Pek çok insanın hayatını kurtaran ve şüphesiz önemli ilerlemeler kaydedilen bu teknikler bir yandan da çeşitli komplikasyonlara neden olmaktadır. Doku kaybı için kullanılan mekanik cihazlar, protezler doğal dokunun gerçekleştirdiği tüm fonksiyonları yerine getiremeyebilir. Organ nakillerinin en önemli kısıtlayıcı faktörü ise oluşan talebi karşılayacak yeterli donörün bulunmamasıdır. Bunun yanında doku reddi olasılığı da önemli bir engel olarak karşımıza çıkmaktadır. Yanık tedavileri, doğuştan gelen anomaliler, doku kayıpları gibi çeşitli alanlarda kullanılan rekonstrüktif cerrahi teknikleri ise her zaman işlevselliğin geri kazanılmasını sağlayamaz. Doku mühendisliği, bu komplikasyonlara karşı bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. İlk olarak 1993 yılında kullanılan doku mühendisliği terimi, doku fonksiyonlarının geri kazanılması, korunması ya da iyileştirilmesi amacıyla mühendislik ve yaşam bilimi prensiplerinin kullanılarak biyolojik yedeklerin geliştirilmesi olarak tanımlanmaktadır [1].

Doku mühendisliği işlevsel yapay dokular üretmek için sentetik ya da doğal malzemelerden üretilen biyoiskeleler, hücreler ve büyüme faktörleri gibi hücresel süreçler üzerinde etkisi olan biyomolekülleri kullanır. Doğru kompozisyonun oluşturulması için ise kaynak olarak başvuru alan en önemli unsur doğal doku yapısıdır. Dokunun fiziksel özellikleri, yapısındaki hücre tipleri ve hücre dışı matriks (HDM) bileşenleri kritik bir çıkış noktası olarak görülebilir.

Dokular; hücre, HDM ve sinyal sistemlerinin bir araya geldiği dinamik ve kompleks yapılardır. Karmaşık ve değişken yapısı nedeniyle sentetik olarak taklit edilmesi mümkün olmayan HDM, hücrelerin desteklenmesi ve biyoyumluluğun artırılmasına yönelik kullanılacak en uygun malzemelerden biridir. HDM, hedef dokunun doğal yapısına en yakın yapı iskelelerinin üretilmesi için kullanılabilir. HDM'nin elde edilmesinde kullanılan yöntem ise hücresizleştirme (deselülarizasyon) teknikleridir. Bu işlemde amaç, doku/organdan ya da hücre kültüründe bulunan hücre/matriks

yapısından hücrelerin uzaklaştırılması ve HDM yapısının mümkün olduğunca korunarak elde edilmesidir. Yapılan ilk çalışmalar, organların bütününden ya da belirli küçük parçalarından hücrelerin arındırılmasına odaklanmıştır. Karaciğer, mesane, plasenta, kalp gibi pek çok organ hücreleştirilerek HDM yapı iskelesi olarak kullanılmıştır [2–5]. Hücre kültüründe HDM sentezi ve hücreleştirme teknikleriyle matriksin elde edilmesi ise daha yeni bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. Organ kaynaklı HDM üretimine göre sahip olduğu benzersiz avantajlar nedeniyle ilgi çekici bir araştırma alanı olarak görülmektedir. Patojen transferi ve konağın immün cevap oluşturma riski gibi dezavantajların aşılmasını sağlamanın yanı sıra hücre kaynaklı HDM üretimi, büyük ölçekli üretimler için de uygundur.

Hücre kültüründen elde edilen HDM'nin bileşenlerini ve aktivitesini etkileyen birçok faktör vardır. Kültür koşulları, hücre tipi, hücreleştirme tekniği gibi değişkenler HDM kompozisyonu üzerinde etkili olabilmektedir. Bu nedenle, farklı hücrelerin kültürü ile elde edilen HDM'ler ile ilgili detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca hücreleştirme işlemlerinin HDM yapısında meydana getirdiği farklılıkların tespit edilmesi ile kullanım alanına göre deselülarizasyon tekniğinin belirlenmesi için de araştırmalar yapılmalıdır. Çalışmanın ilk aşamasında fibroblast hücre kültüründe farklı teknikler ile hücreleştirme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen HDM'ler içerik, sitotoksikite ve genotoksikite analizleri yapılarak karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızın ikinci bölümünde hücre kültürlerinden elde edilen HDM'nin doku mühendisliği alanında kullanım potansiyelini belirlemek amacıyla katkı malzemesi olarak kullanıldığı hibrit hidrojel yara örtüleri geliştirilmiştir. Yara örtüleri iyileşmeye destek sağlamak ve süreç için en uygun ortamı oluşturmak için tasarlanmış ürünlerdir. Geleneksel yara tedavileri gazlı bez gibi kuru pansuman malzemeleri ile gerçekleştirilmekteydi. Ortamın nemli olmasının yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri keşfedildikten sonra yara örtüleri de buna uygun olarak geliştirilmiştir [6]. Modern yara örtüleri, yarayı kurutmayan, fazla eksüdanın uzaklaşmasını sağlayan ve enfeksiyon riskini azaltan özelliklere sahiptir. Bunun yanı sıra yaranın türüne ve aşamalarına göre tercih edilen çeşitli yara örtüleri vardır. Film, köpük, hidrojel gibi formlarda üretilen biyoaktif yara örtüleri iyileşme sürecini desteklemektedir.

Hidrojel yara örtüleri, yüksek su içerikleri sayesinde yara ortamının nemli kalmasını sağlar. Aynı zamanda hücre göçünü ve ölü dokuların ortamdaki uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Yara üzerindeki soğutucu etkileri ağrının azalmasında fayda sağlar.

Yaradan kolayca ayrılabilirdiği için çıkarılması sırasında dokuda travma yaratmazlar. Hidrojeller, özellikle kuru yaraların tedavisinde sıklıkla kullanılırken, yüksek su içerikleri nedeniyle yoğun eksüdalı yaralarda tercih edilmemektedir.

Hidrojel yara örtülerinin iyileşme sürecini hızlandırması ve güvenli olduğu ile ilgili yapılan çalışmalar bulunmaktadır [7,8]. Ayrıca, hidrojellerin ilaçların kontrollü salınımı için kullanılabilmesi kronik yaraların tedavisinde önemli bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında yara örtüsü olarak kullanılmak üzere HDM katkılı PVA-Gel-Cs (polivinil alkol-jelatin-kitosan) hibrit hidrojel üretimi gerçekleştirilmiştir. Antimikrobiyal özelliğinin artırılması için gentamisin yüklü jelatin nanopartiküller hibrit hidrojel yapısına eklenmiştir. Yara örtülerinin tasarımında sentetik yaklaşım, orijinal HDM içeriğinin tam doğal bağlamından yoksundur. Dolayısıyla doğal HDM'nin elde edilmesi ve biyomalzeme amaçlı kullanılması gelecekteki terapötik uygulamaların geliştirilmesi için büyük bir potansiyel taşımaktadır. Elde ettiğimiz HDM'nin hidrojelde katkı malzemesi olarak kullanılarak yara iyileşme etkinliğinin artırılması hedeflenmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Hücre Dışı Matriks

Hücre dışı matriks (HDM), dokuya yapısal destek sağlayan ve hücresel işlevleri düzenleyen karmaşık bir makromolekül ağıdır. Çoklu iç ya da dış sinyalleri koordine ederek organ ve dokulardaki hücreler arasında iletişimi sağlar [9]. Bu nedenle, homeostazı sürdürmede kritik bir rol oynar ve hayatta kalma, büyüme, göç ve farklılaşma gibi çeşitli hücresel süreçlere katılır [10]. Dokuların mekanik özelliklerine katkıda bulunan yapısal bir destek olup aynı zamanda büyüme faktörleri ve biyoaktif moleküllerinin yer aldığı bir depo görevini üstlenir [11].

HDM bileşenleri, hücreler tarafından sentezlenir ve salgılanır. Matriks parçalayan enzimler aracılığıyla sürekli yeniden şekillenme sürecinde olan dinamik bir yapıdır. İçeriğindeki moleküllerin kompozisyonu dokuya, gelişim aşamalarına ve patofizyolojik koşullara bağlı olarak farklılık gösterir. Her organın HDM içeriği erken embriyonik dönemde oluşturulur ve benzersizdir [12]. Kolajen, proteoglikan (PG), glikozaminoglikan (GAG), elastin, fibronektin, laminin ve diğer glikoproteinleri içerir [10]. Bu bileşenler, birbirleriyle ve hücre adezyon reseptörleri ile etkileşime girerek, hücresel işlevler ve dokusal homeostaz için kritik olan bir yapı ağı oluştururlar.

Yapısal özellikleri ve bileşimleri göz önünde bulundurulduğunda HDM, interstisyel ve perisellüler HDM olmak üzere iki ana türde sınıflandırılmaktadır [10]. İnterstisyel matriks, hücreleri çevreler ve doku bütünlüğünü sağlar [9]. Genellikle fibriller kolajen, fibronektin, proteoglikan gibi çoğu HDM bileşenlerini içerir. Perisellüler matriks, hücrelerle yakın temas halindedir ve interstisyel matriksten farklı bileşenlere ve özelliklere sahiptir. Perisellüler matriksler belirli hücrelere özgüdür. Örneğin; bazal membranlar, endotel ve epitel hücrelere özgü bir tür perisellüler matriks olarak kabul edilir [13]. Bazal membranlar genellikle tabaka şeklinde ve dayanıklı yapılardır. Laminin, kollajen tip IV, nidojen, fibulin, agrin gibi bileşenlerden oluşur. Parankimal hücreler ile bağ dokusu arasında bulunur ve bu hücreleri organize eden, yerlerinde tutan bir destek tabakası görevi görür [14].

### **2.1.1 HDM'nin yapısı**

Memelilerde HDM, "core" matrisom olarak bilinen yaklaşık 300 proteinden oluşmaktadır [11]. Temel bileşenleri kolajen, elastin, fibronektin, laminin, glikoprotein, proteoglikan ve GAG gibi lifli yapıya sahip proteinlerdir. HDM içeriği dokuya özgün olmakla birlikte çoğu dokunun ana bileşeni tip I ve tip II kolajendir. Bu proteinler, diğer bileşenler arasında büyük fibriller yapılar oluşturarak hücreler arası boşluğu dolduran karmaşık bir ağ meydana getirir [15].

#### **2.1.1.1 Proteoglikan ve Glikozaminoglikan**

Proteoglikanlar, heparan sülfat (HS), heparin (Hep), kondroitin sülfat (CS), keratan sülfat (KS) ve dermatan sülfat (DS) gibi negatif yüklü GAG zincirlerinin aynı veya farklı türlerinin, kovalent olarak bağlı olduğu bir çekirdek proteinden oluşurlar. Çok hücreli hayvanlarda ve tüm memeli HDM fenotiplerinde bulunur [9]. Salgılanan proteoglikanlar, büyük proteoglikan (aggrecan ve versican), küçük lösin bakımından zengin proteoglikan (dekorin ve lumican), ve bazal membran proteoglikan (perlecan) olarak gruplandırılabilir [11]. Moleküler çeşitlilikleri proteoglikanların hem yapısal hem de biyolojik süreçlerde yer almasını sağlar. Hücreler arası boşluğu doldurur ve dokuların mekanik direncinden sorumludur [9]. Örneğin, kıkırdakta bulunan aggrecan dokuya elastikiyet ve yüksek biyomekanik direnç kazandırır. Aynı zamanda proteoglikanlar yapısındaki negatif yüklü GAG zincirleriyle doku içindeki suyu bağlayarak hidrasyon fonksiyonlarını yerine getirir [15].

Proteoglikanlar, çekirdek proteinleri veya GAG yan zincirleri aracılığıyla birçok büyüme faktörü, sitokin ve kemokin, hücre yüzey reseptörleri ve HDM molekülleri ile etkileşime girerler [10]. GAG'lar, sülfatlanmış GAG ve sülfatlanmamış GAG olmak üzere iki türe ayrılır. Sülfatlanmamış GAG olan hyaluronik asit (HA), HDM yapısındaki en büyük moleküldür. Proteoglikanların çekirdek proteinleri ile kovalent olmayan bağlar kurarak HDM sinyal iletiminin düzenlenmesinde görev alır. Sülfatlanmış GAG'lar (HS, Hep, CS, KS ve DS) ise proteoglikan yapısındaki çekirdek proteinler ile kovalent bağlar kurar. HS proteoglikanlar fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2) gibi büyüme faktörleri ile heparin bağlayıcı alanları aracılığıyla etkileşime girerek sinyal iletimini kolaylaştırabilirler [13].

HDM yapısındaki proteoglikan kompozisyonu fizyolojik ve patolojik durumlarda değişkenlik gösterir. Örneğin, tümör mikroçevreleri değişen proteoglikan bileşimi ile

karakterizedir [14]. Malign dönüşüm sürecinde değişen GAG yapıları, proteoglikanların fonksiyonlarını değiştirerek tümörogeneze katkıda bulunabilir.

### **2.1.1.2 Kolajen**

HDM yapısındaki kolajen tipleri ve miktarı doku ve organa özgün olarak değişiklik göstermektedir. Bununla birlikte tip I ve tip II kolajen çoğu dokuda HDM'nin ana bileşeni oluşturmaktadır [15]. İnsanda bulunan toplam proteinin %30'unu kolajenler oluşturur [10]. Dokunun şeklinin, düzeninin ve üç boyutlu yapısının belirlenmesinde önemli bir rol oynarlar.

Kolajen üç polipeptit  $\alpha$  zincirinden meydana gelir ve üçlü bir heliks yapısı oluşturur. Omurgalılarda kolajen süper ailesi, en az 46 farklı polipeptit zinciri tarafından oluşturulan 28 üyeden oluşur ve supramoleküler yapılarına ve işlevlerine göre alt sınıflara ayrılırlar. Bu alt sınıflar; fibril oluşturan kolajenler (tip I, II, III, V, XI, XXIV ve XXVII), ağ oluşturan kolajenler (bazal membran kolajeni tip IV, VIII, X, XV ve XVIII), üçlü helikslerinde kesintiler bulunan fibril ilişkili kolajenler ya da FACIT'ler (tip IX, XII, XIV, XVI, XIX ve XXII) ve diğerleri (tip VI, XIII, XVII, XXIII, XXV ve XXVI) olarak sıralanabilir [11].

HDM yapısındaki kolajen miktarı ve tipleri; büyüme, gelişme, yara iyileşmesi ya da kanser oluşumu gibi patolojik süreçlerde değişime uğrar. Örneğin, kolajen birikimi ve çapraz bağlanmasının artması HDM'nin sertleşmesine ve doku morfogenezinin bozulmasına yol açarak malign ilerlemeye katkıda bulunabilir [10]. Kolajen ağı, hücre haberleşmesinde rol alarak hücre sel göç, yapışma, anjiyogenez, doku gelişimi ve onarım gibi çeşitli hücre sel işlevleri etkiler.

### **2.1.1.3 Elastin**

Elastin, tropoelastin öncül molekülünün polimeridir ve doku elastikiyetinin anahtar molekülüdür [15]. Elastinler, çapraz bağ oluşturduğu mikrofibrillerden oluşan bir kabuk ile elastik lifleri meydana getirir. Yoğun çapraz bağ ve sıkı paketlenme sonucunda elastik lifler sağlıklı koşullarda ömür boyu metabolik olarak stabil kalır [9]. Büyük kan damarları, akciğerler, kalp, elastik bağlar, deri, mesane ve kıkırdak gibi tekrarlayan germe kuvvetlerine maruz kalan dokularda bu lifler esneklik sağlar [10].

#### **2.1.1.4 Fibronektin**

Fibronektin, HDM yapısında kolajenler, heparin, tenascin-C ve integrinler gibi çeşitli moleküllerle etkileşim halinde olan bir glikoproteindir. Hücre adezyonu, göç, büyüme ve farklılaşma gibi birçok işlevin yerine getirilmesinde görevlidir [15]. Örneğin, bağırsak mukozasının bariyer fonksiyonunun devamlılığında önemli bir rol oynar [16]. Fibronektin, hücre yüzey reseptörleri ve kolajen gibi diğer HDM proteinlerine bağlandığında hücrelerin aktin filamentlerinde değişikliğe yol açarak hücrelerin göç etmesini sağlayabilir [17].

#### **2.1.1.5 Laminin**

Lamininler,  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  olmak üzere üç farklı zincirden oluşan glikoproteinlerdir. Bazal membranın temel bileşenidir. Embriyoda HDM yapısındaki ilk proteinlerden biridir, embriyonik gelişim ve organogenez için önemlidir. Lamininleri kodlayan genlerdeki bir hata embriyoda ölümcül sonuçlara veya birden fazla organı etkileyen ciddi durumlara yol açabilir [18].

Lamininler, tip IV kolajen gibi matriks proteinleri ile de etkileşim halindedir. Çeşitli HDM molekülleri arasında aracı gibi görev alırlar. Ayrıca integrinlere bağlanarak hücre ile HDM arasında bir bağlantı oluştururlar. Farklılaşma, göç ve adezyon gibi önemli hücresel süreçlerde rol alırlar. Her bir izoformu farklı bir fonksiyonu yerine getirebilir. Örneğin; bağırsak epitelyal hücrelerinin bazolateral yüzeyinde laminin  $\alpha1\beta1\gamma1$  farklılaşmayı indüklerken, laminin  $\alpha5\beta1\gamma1$  ve laminin  $\alpha3\beta2\gamma2$  epitelyal hücrelerin adezyonunu ve proliferasyonunu indükler [16].

#### **2.1.2 HDM'nin yeniden şekillenmesi**

HDM yapısı ve bileşimi bulunduğu dokuya özgüdür. Biyokimyasal ve mekanik sinyallere göre sürekli yeniden yapılanmaya tabi olan dinamik bir doku bileşenidir. Hücreleri sabitleyen matriks bir yandan da fiziksel olarak bir sınır oluşturur. Organların büyüdükçe düzgün bir şekilde fonksiyonlarına devam edebilmeleri için matrikste yapısal değişiklikler gereksinim haline gelir. Bu nedenle, embriyonik gelişim, doku gelişimi, anjiyogenez ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçler sırasında, HDM'nin bileşenlerinin parçalanması ve yenilerinin sentezi gerçekleşir. HDM'nin devamlı sentezlenmesi, parçalanması ve kompozisyonunun değiştirilmesi

süreçlerindeki denge, doku homeostazını ve doku fonksiyonlarının yerine getirilebilmesi için gerekli olan yapılanmayı sağlar [19].

Yeniden şekillenme sürecinde HDM bileşenlerinin parçalanması matriks metalloproteinaz (MMP), bir disintegrin ve metalloproteinaz (ADAM), trombospondin motifleri olan ADAM (ADAMTS) ve ayrıca katepsin G ve elastaz gibi proteazlar aracılığıyla gerçekleşir [11,20]. Proteazlar, HDM bileşenlerini doğrudan ya da başka proteazların aktive edilmesini sağlayarak dolaylı olarak parçalayabilirler.

MMP'ler inaktif öncül formda (zimojen) sentezlenir ve aktifleştiklerinde seçici olarak matriks proteinlerini parçalarlar. Kolajenazlar, jelatinazlar, stromelizinler, matrilizinler, membran tipi MMP'ler (MT-MMP'ler) ve diğer MMP'ler olarak altı gruba ayrılırlar. MMP'ler neredeyse tüm HDM moleküllerinin katabolizmasından sorumludur [10]. Aktiviteleri, MMP'lerin doku inhibitörleri (TIMP'ler) ve diğer inhibitörler tarafından dengede tutulur. Bu dengenin bozulması patolojik durumlar ile ilişkilendirilmektedir. HDM'nin sentezden daha fazla parçalanması hücrelerin kontrolsüz bir biçimde göç etmesine, matriks proteinlerine bağlı halde bulunan büyüme faktörleri ve sitokinlerin serbest kalmasıyla sinyal yollarının kontrolsüz aktivasyonuna neden olabilir [17]. MMP'lerin ayrıca bir dizi perisellüler ve hücre içi substratları da vardır. Örneğin; epitel tabakada, MMP'ler hücreler arası bağlantı moleküllerini (kadherinler, okludinler ve kloaudinler) ve hücre içi yapısal proteinleri (aktinler) parçalayabilir, bu da hücre şeklinin ve bariyer fonksiyonunun değişmesine yol açabilir [16].

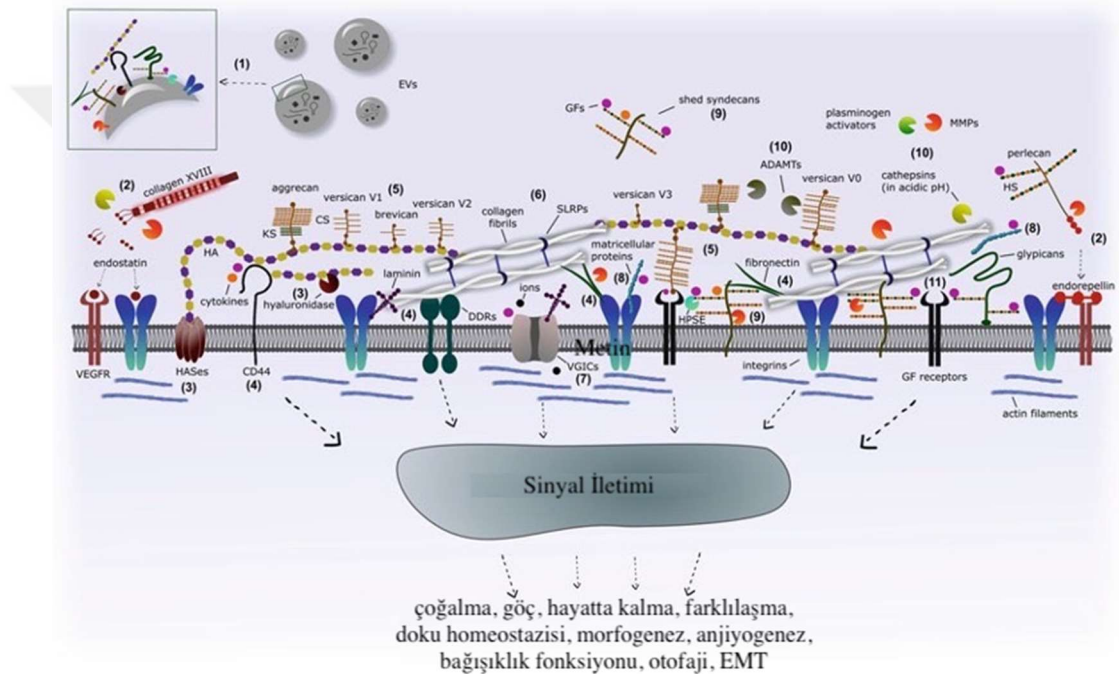
ADAM membrana bağlı proteazlardır. Gelişimde, hücre kaderinin belirlenmesinde, hücre göçünde, yapışmalarında, iltihaplanmada ve bağışıklıkta kritik rolleri vardır. ADAMTS'ler ise salgılanan proteazlardır. Kolajenin olgunlaşması, aggrecan, versican ve brevican gibi PG'lerin parçalanması, kan pıhtılaşmasının homeostazı ve anjiyogenezin inhibisyonunda görev alır [13].

Bir başka yeniden şekillenme süreci ise HDM bileşenlerinin sentez miktarı ve düzeninin değişmesi ile gerçekleştirilir. Örneğin; interstisyel kolajenler arasında kovalent ve kovalent olmayan çapraz bağlar bulunur. Lizil oksidaz (LOX) ve lizil hidroksilazlar, kollajenler ve elastin arasındaki moleküler çapraz bağlanmanın derecesini belirler. Fazla LOX aktivitesine bağlı olarak çapraz bağlanmanın artışı,

doku gerilim direncini ve matris sertliğini artırır ve bu durum hücre davranışlarını etkiler [21].

### 2.1.3 HDM'nin görevleri

HDM, yapısal destek sağlama, hücre davranışını düzenleme ve biyolojik olarak aktif molekülleri depolama gibi işlevleri yerine getirir. Gelişim, anjiyogenez, otofaji, hücre göçü, adezyonu, farklılaşması gibi pek çok hücrel süreçte katkı sağlar (Şekil 2.1). Hücrelerin çevreleriyle etkileşimine doğrudan veya dolaylı olarak dahil olan HDM, farklı sinyal yollarını aracılığıyla işlev görür.



Embriyogenez sırasında hücrelerin fenotipi, polaritesi ve davranışı, göç etme ve çoğalma kapasitesi HDM yapısındaki değişimler ile yakından ilişkilidir. Hücrelerin HDM ile etkileşimleri bu süreçler için gerekli olan bilgi akışını başlatır. HDM'nin bazı bileşenleri, spesifik olarak integrinler gibi çeşitli hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak ya da yapılarında biriken sinyal molekülleri aracılığıyla hücre davranışını ve gen aktivitesini düzenleyebilir. Örneğin; hücre göçü sırasında hareketin yönünü ve derecesini belirlemede HDM hücrelere bağlanma bölgeleri sunarak rehberlik eder. Ektoderm, mezoderm ve endoderm olmak üzere üç germ tabakasının oluşumunun teşvik edilmesi ekstrasellüler matris birikimi ile ilişkilidir [23].

Embriyonik ve yetişkin dönemde kök hücre davranışının düzenlenmesinde etkin bir rol alan HDM, kök hücrelerin kaderini belirler. Gelişim sürecinde pluripotent kök hücreler zamanla dokuya özgün, somatik kök hücrelere dönüşür ve bu hücreler niş olarak isimlendirilen özel mikroçevrelerde bulunur. Yetişkinlerde genellikle sessiz durumda olan kök hücrelerin büyüme, yaralanma gibi durumlarda kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşma potansiyellerini ortaya koymalarında nişin önemli bir etkisi vardır. Kök hücre nişi, bu hücrelere farklılaşmaları ya da kendini yenilemeleri için gerekli olan sinyallerin iletilmesine kadar geçen süreçte sessiz fazda kalabilmeleri için de gerekli ortamı sağlar [24].

HDM'nin sertlik ya da elastikiyet derecesi de hücre davranışını etkileyen unsurlardan birisidir. Mikroçevrenin mekanik özellikleri, hücre içindeki aktin hücre iskeleti ile HDM arasında bağlantıyı sağlayan integrinler tarafından algılanır. Matriksin sertliğinin artması hücre yüzeyinde integrin kümeleşmelerini, sağlam fokal adezyonu ve Rho ve MAP kinaz aktivasyonunu indükler [11]. Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) için, artan sertlik osteojenik farklılaşmayı artırırken, yumuşak matriks kıkırdak ve yağ dokusu oluşumunu teşvik eder [25].

Büyüme faktörleri ve sitokinlerin HDM tarafından depolanması, bu moleküllerin hücrelere sunulmasını ve kullanılabilirliğini kontrol eder. Proteoglikanlar, heparan sülfatlar gibi matriks bileşenleri sahip oldukları çok sayıdaki bağlanma bölgeleri sayesinde sinyal moleküllerini bağlayabilirler. Örneğin; fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesi heparan sülfat zincirlerine güçlü bir şekilde bağlanabilir [11]. Bu durum da hücrelerin hızlı bir şekilde ulaşabileceği bir sinyal rezervuarı oluşmasını sağlar. HDM ile bağlanan büyüme faktörlerinin bağlantılı olmayanlara kıyasla biyoaktiviteleri artabilir [25]. HDM ayrıca sınırlı proteoliz sonucu salınan biyolojik olarak aktif parçaları depoladığı gibi inaktif sinyal moleküllerini de bağlar. Latent formda salgılanan ve HDM'de depolanan TGF- $\beta$ , MMP bağımlı proteoliz tarafından aktive edilene kadar inaktif kalır.

## **2.2 Doku Mühendisliği ve HDM**

Doku mühendisliği, mühendislik ve yaşam bilimleri prensiplerini kullanarak biyolojik yedeklerin geliştirilmesine yönelik disiplinler arası bir alandır. Bu yedekler, dokunun fonksiyonunu geri kazandırmak, korumak veya iyileştirmek amacıyla kullanılır [1].

Hücre biyolojisi, malzeme bilimi, kimya, moleküler biyoloji, mühendislik ve tıp gibi çeşitli bilim dallarının birleşimidir.

Doku mühendisliği, mühendislik yöntemlerini, biyomalzemeleri, biyokimyasal faktörleri uygun kombinasyonlarda kullanarak biyolojik fonksiyonları yerine koymayı, geliştirmeyi ya da değiştirmeyi hedefler. Hücre, yapı iskelesi ve büyüme faktörleri kullanılan temel unsurlardır.

Yapı iskeleleri ve bu iskelelerin üretiminde kullanılan biyomalzemeler, doku mühendisliği araştırmalarında kritik bir öneme sahiptir. Yapı iskeleleri, doğal dokuda süregelen HDM'nin yeniden yapılanma sürecinde ve yeni doku oluşumunda aktif olarak rol oynar. Bu nedenle HDM üretimini destekleyen malzeme seçimi, üretilen yapı iskelesinin başarısını etkileyebilir. Kullanılan biyomalzemelerin biyouyumlu ve doğal HDM'nin yerine destek görevi görebilecek uygun özelliklere sahip olması gerekir. Uygun besin kaynağının sağlanması ve atık taşınımı için yeterince gözenekli bir yapı oluşturulması gerekir. Oksijen ve besinleri yapıdaki hücrelere taşınabilmesi için uygun uyarılar ve koşullar sağlanarak neovaskülarizasyon desteklenmelidir. Hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında önemli rolleri olan büyüme faktörleri iskele yapısına eklenerek yeni doku oluşumu indüklenebilmektedir [26].

Benzersiz yapısı ve hücre fonksiyonları üzerindeki kritik rolleri HDM'yi, doku mühendisliği çalışmalarında biyolojik aktivitelerin kontrolü ve hücreler için uygun ortam oluşturulması amacıyla kullanılabilir önemli bir seçenek haline getirmiştir. Ancak, yapılarındaki bileşenlerin çokluğu, dokuya özgün ve devamlı yeniden yapılanma sürecinde olması HDM'nin sentetik olarak üretilmesini güçleştirmektedir. Üç boyutlu insan meme epitel hücre kültüründe sıçan meme bezlerinden elde edilen HDM, Matrigel ile karşılaştırıldığında glandüler morfogenezini daha iyi desteklediği görülmektedir [27]. Hücre davranışındaki bu değişimler, HDM'nin taklit edilmesi sırasında meydana gelebilecek değişimlerin doku yapısında önemli farklılıklar yaratabileceğini göstermektedir. Kolajen, laminin, fibrin veya hyaluronan gibi biyolojik materyallerden oluşturulan yapay malzeme ve matrikslerin HDM'nin moleküler karmaşıklığına ve organizasyonuna ulaşamadığı göz önünde bulundurulduğunda doğal HDM'nin biyomalzeme olarak kullanılması ilgi çekici bir konu haline gelmiştir [28]. Doğal HDM, doku rejenerasyonu için gereken hücre fonksiyonlarını indüklemek için yeterli biyoaktif molekülleri ve yapısal bilgileri içerir.

## 2.3 Hücresizleştirme (Deselülarizasyon)

Hücresizleştirme teknikleri; hücrelerin tutunmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını ve migrasyonunu destekleyecek mikroçevrenin *in vivo* ortamdakine en benzer şekilde oluşturulması amacıyla doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır. Hücresizleştirme işleminde, yapıda bulunan tüm hücreler ortamdan uzaklaştırılırken hücreler tarafından sentezlenmiş olan HDM'nin mümkün olduğunca korunması amaçlanır. Böylece doğal çevrenin en iyi şekilde taklit edilmesi hedeflenmektedir. Hücresizleştirilmiş (deselülerize) HDM (dHDM), içerdiği biyoaktif moleküller ile dokuların desteklenmesi ve işlevinin geri kazanımı için kullanılan diğer biyomalzemelere kıyasla daha uygundur. dHDM, doku ve organlardan elde edilebildiği gibi hücre kültüründe çoğaltılan hücrelerden de elde edilebilmektedir.

### 2.3.1 Doku ve organlarda hücresizleştirme

dHDM genellikle hayvan doku/organların hücresizleştirilmesi ile ksenojenik ya da allojenik olarak elde edilmektedir. Günümüzde kıkırdak, tendon, miyokard, damar, akciğer gibi birçok doku ve organdan hücresizleştirme işlemi gerçekleştirilmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [29].

Doku ve organların deselülarizasyonu hücrelerin genellikle kimyasal ajanlar yardımıyla parçalanarak ortamdan uzaklaştırılması ile gerçekleştirilir. Mesane, sindirim organları gibi basit, ince dokulu organlarda tüm organın kimyasal banyolar aracılığıyla hücresizleştirilmesi mümkün olabilmektedir. Ancak, daha katı organlar için uygulanan protokoller, organın kesilmesini ve ardından kimyasal ajanlara maruz bırakılmasını içerebilmektedir. Bu durumda, organın mimarisi bozulur ve dHDM'nin bütün bir yapı olarak elde edilmesi mümkün olmaz. Uygulanan bir diğer alternatif ise organların sahip olduğu damar, hava yolları gibi anatomik yapıları hücresizleştirme işleminde kullanılan kimyasallar ile perfüze etmektir [30]. Böylece dokunun her yerinde hücrelerin parçalanması, aynı zamanda üç boyutlu yapının korunması sağlanır.

Birçok uygulama alanı için, hücresizleştirilmiş doku ve organlardan üretilen ticari yapı iskeleleri mevcuttur. Cilt onarımı için kullanılan AlloDerm® (BioHorizons), Oasis® (Smith & Nephew); ortopedik uygulamalarda tercih edilen GraftJacket® (Wright Medical) ve Allopatch HD™ (MTF Sports Medicine) HDM yapı iskelelerine örneklerdir. Hem insan hem de hayvan dokularından elde edilen ürünler doku rejenerasyon sürecini desteklemek için kullanılmaktadır. Dokuya özgü yapısal ve

işlevsel moleküllerin *in vivo* ile aynı miktarlarda olması ve üç boyutlu yapının doğala eş olacak şekilde sağlanabiliyor olması bu biyomalzemelerin en önemli avantajlarıdır [31]. Bunun yanı sıra dermis, ince bağırsak ve idrar kesesi gibi organların deselülarizasyonu sonrasında elde edilen tabaka formundaki HDM'lerin mekanik özellikleri uygulama amacına göre yetersiz olursa, yapı iskeleleri çeşitli şekillerde işlenebilmektedir. Örneğin, HDM iskelelerindeki tabaka sayısının değiştirilmesi ya da sterilizasyon işlemlerinde kullanılan yöntemler mekanik özellikler üzerinde etkilidir [32]. Tabakalara özel şekil vermek amacıyla katmanlar halinde kalıplara sarıldıktan sonra kurutulması ile boru ya da huni benzeri şekillerde yapı iskeleleri üretilmektedir [33]. Özofagus gibi organların onarımında bu yapıların kullanılabilmesi gösterilmiştir.

Deselülarize dermal matriksler, yanık tedavisini [34], meme cerrahisi [35], ağız ve çene cerrahisini [36], tendon onarımı [37] gibi alanlarda kullanılmaktadır. Üç boyutlu kültür sistemlerinde kalp kaynaklı dHDM, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin (iPSC) kardiyomiyositlere farklılaşmasını indüklemektedir [38]. Mirmalek ve ark. pankreastan aselüler bir iskele oluşturarak üzerine pankreas adacıklarını eklemeyi başarmışlardır. Reselülarize edilen organın insülin salgıladığı belirlenmiştir [39].

Doku ve organ kaynaklı HDM iskelelerin klinikte yaygın olarak kullanılmamalarının en önemli nedeni uygun doku/organların eldesindeki kısıtlamalardır. Allojenik ya da zenojenik organ/doku kullanımında istenmeyen bağışıklık yanıtının oluşması ya da matriksle birlikte patojen nakli gibi önemli riskler bulunmaktadır.

### **2.3.2 Hücre kültüründe hücresizleştirme**

Hücre kültüründe hücresizleştirme günümüzde organ/doku kaynaklı HDM üretimi araştırmalarına göre nispeten daha yeni bir yaklaşımdır. Hücreden HDM üretimi için genellikle uzun süreli kültür yapılarak hücrelerin matriks sentezlemesi sağlanmaktadır. Kültür sırasında askorbik asit gibi protein sentezini artıracak besiyeri katkıları kullanılarak HDM üretimi teşvik edilmektedir [40]. Ardından çeşitli fiziksel, kimyasal ya da biyolojik yöntemler ile hücreler ortamdan uzaklaştırılmakta ve HDM mümkün olduğunca korunarak elde edilmektedir. Hücresizleştirme tekniği ve HDM içerikli yapı iskelesi üretim metotları, kullanılan hücrelere ve uygulama yapılması planlanan doku tipine göre seçilmektedir.

Hücre kaynaklı HDM üretimi, kültür kabı yüzeyinde iki boyutlu ya da iskele üzerinde üç boyutlu olarak gerçekleştirilebilmektedir. Doğal ya da sentetik malzemelerden üretilen yapı iskelesi üzerinde hücre kültürü yapılarak HDM sentezinin ve ardından deselülarizasyonun gerçekleştirilmesi sonucu HDM ile kaplı yapı iskeleleri elde edilmektedir [41–43]. Blum ve ark., polikaprolakton (PCL) iskelelerin rejeneratif kapasitelerinin artırılması amacıyla iskele üzerine ekilen adipoz kök hücreler ile osteojenik ve kondrojenik farklılaşma çalışması yapmıştır. Hücresizleştirme işlemi gerçekleştirilerek HDM ile kaplı PCL yapı iskeleleri üretilmiş ve bu iskelelerin kök hücre farklılaşması üzerindeki olumlu etkileri rapor edilmiştir [44]. Hücre kültüründen izole edildikten sonra liyofilize edilen HDM'ler çözünür hale getirilerek direkt ya da farklı biyomalzemeler ile kompozit yapı iskeleleri üretiminde de kullanılabilir [45,46]. Antich ve ark., kırık doku mühendisliği çalışmalarında belirli kültür koşulları altında mezenkimal kök hücrelerden elde ettikleri HDM'yi liyofilize ettikten sonra pepsin ile çözündürerek hidrojel elde etmişlerdir. Bu HDM hidrojinin ısıya duyarlı biçimde jelleştiği ve MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasını desteklediği raporlanmıştır [47].

HDM kompozisyonu ve etkinliği elde edildikleri hücre tipine, kültür koşullarına ve kullanılan hücresizleştirme tekniklerine göre değişkenlik göstermektedir. Fetal ve yetişkin kök hücreler karşılaştırıldığında fetal hücre kaynaklı HDM, hücre çoğalması ve farklılaşma potansiyelini daha çok desteklemektedir [48]. Fibroblast kültüründe hipoksiye yanıt olarak HDM'nin içerik, fiziksel ve mekanik özelliklerinin yeniden düzenlendiği belirlenmiştir [49]. Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen HDM, pepsin ile çözüldüğünde hücre çoğalmasını desteklerken üre ile muamele edildiğinde osteogenezi artırmaktadır [50]. Bu nedenle her bir hücre tipi için HDM üretiminde kullanılan yöntemlerin ve ideal çevresel koşulların detaylı bir şekilde araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Hücresizleştirme tekniği doku ve hücrenin kökenine göre özelleştirilmelidir, tek bir yöntem tüm HDM'ler için uygun olmayabilir [51]. Deselülarizasyon sonrasında HDM'nin biyokimyasal, biyofiziksel ve biyolojik özelliklerinin en üst düzeyde korunabilmesi için fiziksel, kimyasal ve enzimatik farklı yöntemler ve bu yöntemlerin kombinasyonları kullanılmaktadır. Fiziksel yöntemler, HDM içeriğindeki kolajen gibi proteinlerin yapı ve mekanik özelliklerinin değişmesine neden olabilmektedir. Organ hücresizleştirmesinde kullanılan yüksek hidrostatik basınç uygulamasının 320 MPa

üzerine çıkıldığında matriks yapısındaki kolajenin zarar gördüğü rapor edilmiştir [52]. Kimyasal yöntemler proteinleri denatüre edebilir ve büyüme faktörlerinin parçalayabilir. Örneğin SDS, fibronektin gibi proteinleri denatüre etme eğilimindedir [53]. Enzimatik yöntemler ise genellikle hücrelerin uzaklaştırılmasında yeterince etkin bulunmamaktadır. Bu nedenle çoğu zaman kimyasal yöntemler ile uygulanmaktadır. Hücresizleştirme teknikleri hücre tipleri, hücre yoğunluğu ve HDM'nin uygulama alanına göre optimize edilmelidir.

### **2.3.3 HDM eldesinde doku/organ ya da kültürlenmiş hücrelerin kullanımı**

Hücre kültüründen ya da doku/organdan HDM elde edilmesinde her iki yöntemin de avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Organ kaynaklı HDM'lerde en önemli sorun doku kaynağıdır. Hayvan ya da insan dokusunun yeterli miktarda elde edilmesi güçtür. Bunun dışında dinamik HDM yapısının hücreleri nasıl etkileyeceğine dair pek çok *in vitro* analiz yapılması gerekir. Kök hücrelerin farklılaşma sürecinde her basamakta nişi oluşturan HDM bileşimi değişerek rejenerasyonu yönlendirebilir. Doku kaynağında bu farklı HDM bölgelerini bulmak oldukça zordur. Organ/dokulardan elde edilen HDM'lerin hücreler üzerindeki etkilerinin her seferinde kapsamlı bir şekilde analiz edilmesi gerekir ve bu analizler için yeterli miktarda örnek eldesi güçtür [54]. Buna karşılık hücre kaynaklı HDM'lerin etkinliklerinin detaylıca araştırılması için büyük ölçekli üretimler yapılabilmektedir. Hücre kültüründe üretilen HDM'lerin hücreler üzerindeki etkilerinin çeşitli modifikasyonlar ile yönlendirilmesi de mümkündür. Yapılan bir çalışmada, enkapsüle edilen mezenkimal kök hücrelerin osteojenik koşullarda kültürü sonrasında elde edilen HDM'nin, MKH çoğalmasını desteklerken hematopoetik kök hücrelerini (HKH) baskıladığı belirlenmiştir. Aynı koşullarda BMP2 nötralize edildiğinde ise HKH sayısında artış olduğu saptanmıştır [55].

Hücre kaynaklı HDM'lerin en önemli dezavantajı ise kültür ortamında doğal HDM'ye tamamen özdeş içeriğe, mikro yapıya ve mekanik özelliklere sahip bir yapı üretmenin zorluğudur. Hücre kültürü sırasında oluşabilecek her türlü farklılık, kullanılan hücre tipleri ve uygulanan hücresizleştirme teknikleri HDM'nin yapısını etkilemektedir. Örneğin, *in vitro* farklılaşma çalışmalarının her aşamasında HDM kompozisyonu doğal dokuda olduğu gibi değişmektedir [56]. Bu nedenle farklı zamanlarda ya da laboratuvarlarda aynı bileşime sahip HDM üretimi güçtür. Ancak bu durum bir yandan hücre kültür koşullarını değiştirerek HDM'lerin biyoaktif içeriği ve miktarını

düzenleyebilme esnekliğini de sunar. Kültür ortamında hücre ve matriks üretimi için küçük bir biyopsinin çoğu zaman yeterli olabilmesi, otolog HDM üretimini de mümkün kılmaktadır. Bu sayede hücre kaynaklı HDM'ler allojenik ya da ksenojenik nakillerin neden olduğu komplikasyonların aşılması amacıyla kullanılabilir. Ayrıca, organ donörlerinden alıcıya nakil sırasında patojen geçişi riski bu teknikle önlenir. Hücre kültürü koşullarında, basit tekniklerle patojen varlığı tespit edilebilmektedir. Hücre kültürü kaynaklı HDM, immunojenik bileşenlerden yoksun ve büyük ölçekli üretim için uygun bir seçenek olarak öne çıkmaktadır [57].

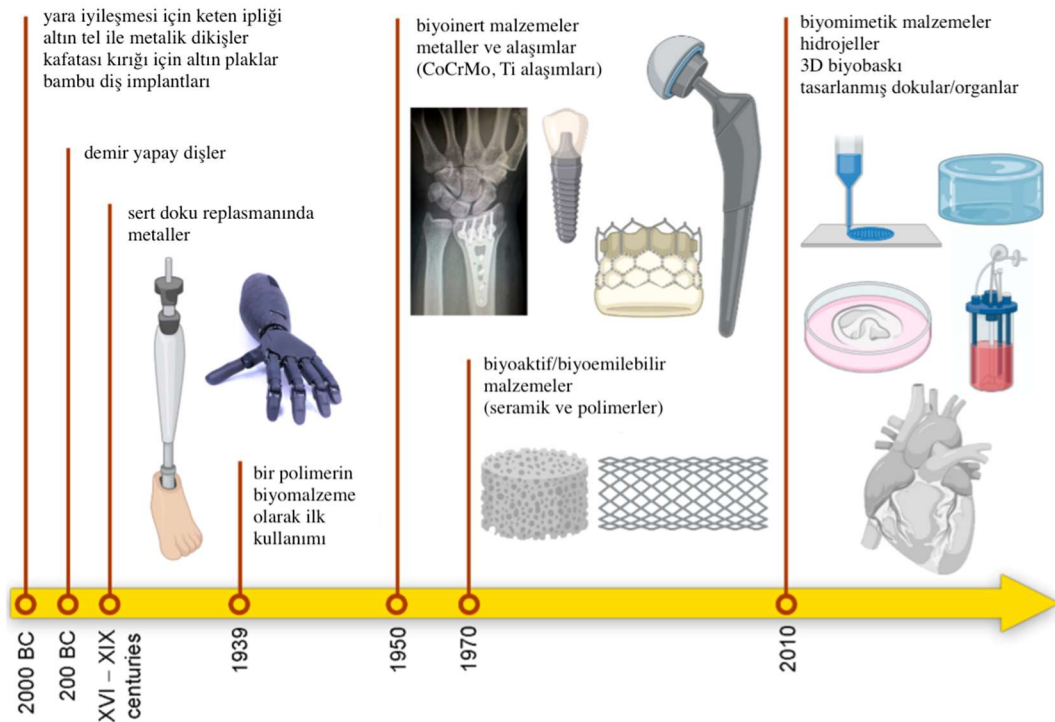
## 2.4 Biyomalzemeler

Biyomalzeme teriminin yaygın olarak kabul gören ilk tanımı 1974 yılında Güney Carolina'da (ABD) düzenlenen altıncı "Annual International Biomaterial Symposium" sırasında yapılmıştır. Buna göre biyomalzeme, canlı bir sistemin içine yerleştirilmek veya canlı bir sistemle birleştirilmek üzere tasarlanmış, sistematik ve farmakolojik olarak inert (vücutta yapısını koruyan ve herhangi bir immünolojik reaksiyona neden olmayan) bir maddedir [58]. Biyomalzemeye vücut tarafından olumsuz yanıt verilmemesinin öncelikli olduğu bu yıllarda yapılan çalışmalar mikrobiyolojide ve sterilizasyon tekniklerine kaydedilen gelişmeler ile yön değiştirmiştir. Genomik ve proteomik bilimlerdeki ilerlemeler sonucu biyoaktif bileşenler malzemelere dahil edilmeye başlanmıştır [59]. 1982 yılında Bethesda, Maryland'de (ABD) düzenlenen "Biyomalzemelerin Klinik Uygulamalarına İlişkin Ulusal Sağlık Enstitüleri Konsensüs Geliştirme Konferansı Bildirisi" sırasında yapılan ve biyoaktif maddeleri de kapsayan ilk tanıma göre biyomalzemeler, vücudun herhangi bir dokusunu, organını veya işlevini tedavi eden, artıran ya da değiştiren bir bütün olarak veya sistemin bir parçası olarak herhangi bir süre için kullanılabilen sentetik veya doğal kaynaklı bir maddeler (ilaç dışında) veya madde kombinasyonlarıdır.

Biyomalzemelerin kullanımı çok eski çağlara dayanmaktadır (Şekil 2.2). Maya kültüründe diş dahil olmak üzere vücudun farklı bölgelerinde metaller kullanılmıştır. Mısır'da 4000 yıl önce yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla keten iplikler kullanıldığı bilinmektedir [60]. Günümüzde biyomalzemeler ilaç salınımı, doku mühendisliği, terapötik cihazlar gibi pek çok alanda hücre çoğalması ve doku yenilenmesi gibi işlevleri yerine getirmek için kullanılmaktadır.

Biyolojik sistemlerle etkileşim halinde olan biyomalzemelerin kimyasal, mekanik, fiziksel ve biyolojik özelliklerinin dokuya uygun ve güvenilir olması gerekir. Biyomalzemenin vücutta olumsuz bir tepkimeye neden olmaması ve amaçlanan işlevi doğru bir şekilde yerine getirebilmesi biyoyumluluk olarak tanımlanabilir [61]. Buna göre biyomalzemeler, alıcısında sitotoksisite, genotoksisite, mutajenik, karsinojenik ve immünojenik etki gibi istenmeyen durumları tetiklememeli, hedeflenen fonksiyonu yerine getirmeli ve en uygun hücrel ve doku yanıtını oluşturmalıdır.

Biyomalzemeler farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Hastalıklı veya hasarlı parçaların değiştirilmesi (örneğin yapay kalça eklemi, böbrek diyaliz makinesi), iyileşmeye yardımcı olmak (örneğin dikişler, kemik plakaları ve vidalar), işlevin iyileştirmesi (örneğin kalp pili, göz içi lens), işlevsel anormalliğin düzeltilmesi (örneğin kalp pili) ve kozmetik sorunu düzeltmek (örneğin çene büyütme) gibi uygulamanın hangi alanda çözüm sunduğuna göre sınıflandırma yapılabilir.



Şekil 2.2 Biyomalzemelerin tarihçesi [60].

Bir diğer yaklaşımda ise biyomalzemenin hangi doku ya da organ için kullanıldığına göre bir sınıflandırma yapılmaktadır. Örneğin, kalp için kalp pili kullanılması, göz için kontakt lens kullanımı gibi. Son olarak da malzeme türlerine (polimerler, metaller, seramikler ve kompozitler) göre sınıflandırma yapılmaktadır [62].

### 2.4.1 Biyopolimerler

Polimerler, temel moleküler zincir üzerinde küçük moleküllerin kovalent bağlarla birleştirilmesi ile oluşur. İşlenebilmeleri, düşük toksisiteleri ve birçok formda üretilibilmeleri biyomedikal uygulamalar için uygun malzemeler olmalarını sağlar. Yaygın olarak kullanılan polimerler arasında polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), polihidroksil bütirat (PHB) ve poli  $\epsilon$ -kaprolakton (PCL) bulunur [63]. Polimerlerin mevcut uygulamaları arasında kalp kapakları, yapay kalpler, vasküler greftler, meme protezleri, diş malzemeleri, kontakt ve göz içi lensler, ekstrakorporeal oksijenatör cihazları, diyaliz ve plazmaferez sistemleri, tıbbi ürünler için kaplama malzemeleri, cerrahi malzemeler, doku yapıştırıcıları vb. yer almaktadır [64].

Polimerler, sentetik ve doğal olmak üzere iki kategoride sınıflandırılabilir. Akrilik, poliamid, polyesterler, polietilen, polisiloksan, poliüretan vb sentetik polimer grubunda yer alır. Kolay işlenebilir olmaları sentetik polimerleri öne çıkarsa da genel olarak düşük biyouyumluluk göstermeleri önemli bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Sentetik polimerler protez, diş malzemeleri, tek kullanımlık tıbbi malzemeler ve tıbbi implantlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [65]. Kitosan, jelatin, kolajen ve aljinat doğal polimerler arasındadır. Sentetik polimerlere göre çok daha uzun süredir biyomedikal alanda kullanılmaktadır [66].

#### 2.4.1.1 Polivinil alkol (PVA)

PVA, yara örtüleri, ilaç taşıyıcı sistemler gibi biyoteknolojik ürünlerde kullanılan hidrofilik, yarı kristal ve sentetik bir polimerdir. Vinil asetatın serbest radikal polimerizasyonu ile poli vinil asetat (PVAc) elde edilir. Ardından PVAc zincirleri boyunca asetat gruplarının hidrolizi ile PVA elde edilir. Hidroliz reaksiyonunun gerçekleşme miktarına göre elde edilen PVA farklı hidroliz derecelerine sahip olabilmektedir. Yapıda kalan asetat grupları PVA'nın kimyasal özelliklerini, çözünürlüğünü ve kristallik derecelerini etkilemektedir [67].

PVA'nın biyobozunurluğu çevresel koşullara göre değişiklik göstermektedir. Sulu ortamda ve aerobik koşullarda biyobozunur olduğu bilinmektedir [68]. Suda çözünebilen ve toksik olmayan PVA, ilaç ve biyomedikal endüstrisinde farklı uygulamalara sahip hidrojellerin üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. PVA, yüksek sayıdaki alkolik grupları nedeniyle hidrojel oluşturabilen en polar ve hidrofilik sentetik polimerlerden biridir [67]. Çapraz bağlı PVA hidrojel, yüksek şişme derecesi, düşük

toksisitesi, iyi biyoyumluluğu ve fiziksel özellikleri nedeniyle dikkat çekmektedir. Ağırılıkça %80-90 su içeriğine sahip PVA jelleri, subkutan veya intramüsküler olarak implante edildiğinde tavşanlarda yan etki göstermemiştir [69]. Ancak bazı özellikleri PVA hidrojjelerin kullanımını kısıtlamaktadır. Örneğin, yetersiz elastikiyetleri, sert yapıları ve sınırlı hidrofilik özellikleri nedeniyle PVA hidrojjelerinin yara örtüsü olarak kullanımı sınırlıdır [70]. Diğer polimerler ile kullanımı, PVA malzemelere yeni özellikler kazandırılmasını sağlayarak bu kısıtlamaların önüne geçilebilmektedir [71]. PVA/jelatin/hidroksiapatit kompozit iskele ile yapılan *in vivo* bir çalışma sonuçlarında 12 hafta boyunca deri altında bulunan yapının biyoyumluluğu olduğu ve kırıkda iskelesi olarak kullanılabilceği belirtilmiştir [72]. PVA hidrojel implantlar, diz kırıkda hasarı olan orta yaşta 18 hastada 5-8 yıl boyunca takip edilmiştir. Bu sürede PVA hidrojjelerin ciddi ağrı azalmasını sağladığı ve işlevsel olduğu gösterilmiştir [73].

#### **2.4.1.2 Kitosan**

Dünyada en bol bulunan ikinci organik bileşik olan kitin, amin grupları tamamen asetillenmiş  $\beta$ -(1-4)-2-asetamido-2- deoksi-d-glukopiranoz monomerlerin tekrarından oluşmaktadır. Kitin yapısındaki N-asetilglukozamin kalıntılarının N-glukozamin kalıntısına dönüşmek üzere tamamen deasetillenmesiyle kitosan oluşur. Kitosan, biyopolimer zinciri boyunca rastgele veya blok halinde dağılmış N-asetilglukozamin ve N-glukozamin birimlerinin bir kopolimeridir. N-glukozamin birimlerinin yüzdesi aynı zamanda kitinin deasetilasyon derecesi olarak tanımlanır [74]. Deasetilasyon derecesi kitosanın kimyasal ve fiziksel özelliklerini, biyobozunurluğunu ve immünolojik aktivitesini etkiler [75].

Kitosan biyoyumlu, biyobozunur ve toksik olmayan bir biyomalzemedir. Bu nedenle çeşitli tıbbi alanlarda kullanımı araştırılmıştır. Asidik ortamda pozitif yüke sahip olması nedeniyle müsin yapısındaki negatif kalıntılara bağlanabilir, böylece mukoadhezif özellik gösterebilmektedir [76]. Deri rejenerasyonu için dondurularak kurutulan kitosan çözeltileri uygun gözenek boyutları ve miktarı ile deri dokusunun tabakalı dokusunu taklit etmek için kullanılmaktadır [77].

Kitosan sahip olduğu antimikrobiyal özelliği ile yara ve yanıklarda enfeksiyonları önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Kitosan, doğal kan pıhtılaşmasına yardımcı olur ve sinir uçları için bir bariyer görevi görerek ağrıyı azaltır. Açık yaralarda yatıştırıcı bir etki gösterir [78].

### 2.4.1.3 Jelatin

Jelatin, moleküler bir türevi olduğu kolajene benzerlik gösteren doğal bir polimerdir. Kolajenin izole edildikten sonra ısı ve enzimatik denatürasyon gibi işlemlere hidrolize edilmesi ile üretilir. Yapısındaki RGD motifi hücre yapışması, çoğalması ve farklılaşmasını destekler [79]. Kolajene çok benzer bir moleküler yapıya sahip olduğu için gıda, kozmetik ve farmasötik gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır.

Uygun maliyetli ve kolay elde edilebilir bir polimer olması nedeniyle kemik rejenerasyonu, kemoterapötik ajanların hedeflenmesi, yara örtüsü, hidrojel üretimi gibi pek çok farklı sistemde kullanılmıştır [80–82]. Biyouyumlu ve biyobozunur olması, düşük toksisitesi, immünojenik bir tepkiye neden olmaması önemli avantajlarıdır [79].

### 2.4.2 Metaller

Termal ve elektriksel iletkenlik, korozyon direnci ve mekanik özellikleri nedeniyle metaller ve metal alaşımları yaygın olarak biyomalzeme olarak kullanılmaktadır. Sterilizasyon ve üretim kolaylıkları, şekil hafıza kabiliyetleri diğer avantajlarıdır. Paslanmaz çelik (316L), titanyum ve alaşımları (Cp-Ti, Ti6Al4V), kobalt-krom alaşımları (CoCr) tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılan malzemelerdir [65]. Diş implantları, kraniyofasiyal plaklar ve vidalar; yapay kalp parçaları, kalp pilleri, klipsler, valfler, balon kateterler, tıbbi cihazlar ve ekipmanlar, kemik sabitleme cihazları, diş malzemeleri, tıbbi radyasyon koruyucu ürünler, protez ve ortodontik cihazlar kullanım alanları arasında yer almaktadır [83].

### 2.4.3 Seramikler

Seramikler ve kompozitleri, kalça protezleri, kemik greftleri, yapay tendonlar, diş ve ortopedik implantlar, kalp kapakçıkları gibi tıbbi ürünlerde kullanılmaktadır. Metal ve polimerlere göre daha az tercih edilse de seramikler inertlik olmaları, çeşitli şekil ve gözeneklilikte üretilebilmeleri, yüksek basınç dayanımları ve mükemmel aşınma özellikleri ile ön plana çıkmaktadır. Fosfatların biyoseramikleri, yüksek biyouyumlulukları, kemik dokuya entegrasyonları ve kemiklerin mineral bileşenine en çok benzeyen malzemeler olmaları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır [84].

Biyoseramikler, emilemeyen (nispeten inert), biyoaktif veya yüzey reaktif (yarı inert) ve biyolojik olarak parçalanabilen veya emilebilen (inert olmayan) seramikler olmak üzere üç gruba ayrılır [83]. Alümina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), zirkonya (ZrO<sub>2</sub>) ve titanya (TiO<sub>2</sub>) tıpta

en çok kullanılan biyo inert seramikler arasındadır [85]. Amorf kalsiyum fosfatlar, kalsiyum sülfat, hidroksiapatit (HAp) ve  $\alpha$ -/ $\beta$ -trikalsiyum fosfatlar ise emilebilen seramiklerdir. Çoğunlukla kemik ve diş gibi sert dokuların onarımı ve yenilenmesi için kullanılmaktadır [86]. Bazı cam seramikler ve yoğun hidroksiapatitler biyoaktif seramikler grubunda yer alır. Kemikle ve ortamdaki yumuşak dokularla doğrudan kimyasal bağ oluşturlar.

#### **2.4.4 Kompozitler**

Kompozit malzemeler, birden fazla malzemenin karışımından oluşur ve bu malzemeler birbirlerinin özelliklerini tamamlar nitelikte olur. Bu nedenle kompozitlerin avantajı, bileşenlerinin niteliklerini göstermeleri ve çoğunlukla tek bileşenlerin sahip olmadığı bazı özellikleri sergilemeleridir [87].

Matris malzemesi olarak kullanılan malzemenin üzerinde genellikle matristen daha üstün mekanik ya da termal özelliklere sahip bir başka malzeme bulunur. Bu matris ve takviye fazları arasında yer alan üçüncü bir faz olan ara yüzey de bulunmaktadır [88]. Kompozit biyomalzemeler, farklı sınıflardaki malzemelerin avantajlarını birleştirmeye izin verir ve bileşenlerin fiziksel özelliklerinden farklı özelliklere sahiptir.

Fiber takviyeli kompozit malzemelerle kafatası rekonstrüksiyonu, kemik kırık onarımı, total diz, ayak bileği, diş, kalça ve diğer eklem yerine koyma uygulamaları gibi sert doku uygulamaları mümkündür [89].

#### **2.5 Yara Örtüsü**

Yara iyileşmesi, farklı tipte hücreler, HDM ve çeşitli molekülleri içeren karmaşık bir süreçtir. Nötrofil, makrofaj, lenfosit, keratinosit, fibroblast ve endotel hücreler görev alır. İyileşme aşamaları, hemostaz, enflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme olarak sıralanabilir. Yaralanma sonrasında ilk 72 saat içinde, trombosit agregasyonu aktive olur, pıhtı oluşumunu sağlayan kemokinler ve büyüme faktörleri salınır. Ardından nötrofiller ve makrofajlar ortamdaki ilk bakteriyel yükü temizler ve hasarlı dokunun fagositozunu kolaylaştırır. Böylece hemostaz ve enflamatuvar fazları tamamlanır. Proliferasyon aşamasında fibroblastlar, keratinositler ve endotel hücreleri birikir. Oluşan pıhtının yerini almak üzere HDM bileşenleri bir granülasyon dokusu oluşturur. Ayrıca büyüme ve anjiyogenez faktörleri ve interlökin ailesi görev alır.

Yeniden şekillenme ise mevcut hücrelerin apoptozisi ve yeni hücrelerin üretimi arasında hassas bir dengenin sağlanması ile gerçekleşir. Aynı zamanda HDM yapısı da yeniden şekillenir. Olgunlaşmamış tip III kolajen kademeli olarak yıkıma uğrar, tip I kolajen üretimi gerçekleştirilir [90].

Bir yara hava ile temas ettiğinde seröz sıvı, kan ürünleri ve yara eksüdasının kurumasıyla sert bir kabuk oluşur. İyileşme sürecinde hücreler kabuk bölgesi boyunca epidermisi yeniden inşa edemez, dokunun nemli olduğu daha derin bölgelere göç etmeleri gerekir. Bu durum iyileşme sürecinin uzamasına, enfeksiyon ya da ağrı gibi komplikasyon risklerinin artmasına neden olur [91]. İlk olarak bir domuz modelinde nemli bir ortamın yara oluşumu sonrası epitalizasyonun iki kat daha hızlı olmasını sağladığı gösterilmiştir [6]. Daha sonra nemli ortamın dehidrasyonu önleyerek otolitik debrimanı artırdığı, anjiyogenez ve yara iyileşmesini kolaylaştırdığı kanıtlanmıştır. Ayrıca, kuru tedaviler ile karşılaştırıldığında nemin, enfeksiyon riskini artırmadığı gösterilmiştir [92].

Yara örtüleri, yeterli neme izin verirken fazla eksüdayı gidererek ve bakteriyel kontaminasyonu engelleyerek yaralar için ideal bir iyileşme ortamı yaratmayı amaçlar [93]. Nemi tutan yara örtüleri, epitelizasyonu hızlandırır ve kolajen sentezine yardımcı olur. Yara yatağında hipoksi oluşturarak anjiyogenezini teşvik eder ve pH'ı düşürerek bakteri üremesine engel olur. Gazlı beze göre hastalar için kullanımı daha kolaydır ve yara izinin azalmasını sağlar [94].

Günümüzde, yaranın dehidrasyonunu önlemeye ve iyileşmeyi desteklemeye odaklanan modern yara örtülerinin pek çok çeşidi bulunmaktadır. En uygun yara örtüsünün seçilmesi için detaylı bir yara değerlendirmesi yapılmaktadır. Yaranın çeşidi, derinliği, hastanın durumu gibi faktörler göz önünde bulundurulur.

İdeal bir yara örtüsünün sahip olması gereken özellikler şunlardır:

- Yara çevresindeki nemi kontrol etmeli,
- Gazların büyük ölçüde iletimini sağlamalı,
- Fazla eksüdayı ortadan kaldırmalı,
- Yarayı enfeksiyonlardan ve mikroorganizmalardan korumalı,
- Yaranın yüzey nekrozunu azaltmalı,
- Mekanik korumaya sahip olmalı,

- Kolayca değiştirilmeli ve çıkarılabilmeli,
- Biyoyumlu, biyobozunur ve elastik olmalı, toksik olmamalı,
- Yara ağrısını hafifletmeli,
- Maliyeti kabul edilebilir olmalıdır [95].

Yara örtüleri genel olarak inert/pasif ve interaktif/biyoaktif yara örtüleri olarak iki gruba ayrılabilir. Uzun yıllardır kullanımda olan gazlı bez, tül gibi pansumanlar yarayı örtmek amacıyla kullanılan inert/pasif yara örtüleridir. Genellikle minimal, düşük eksüdalı yaralarda ya da ikincil örtü olarak kullanılırlar [96]. İnteraktif/biyoaktif yara örtüleri biyobozunur, tıkayıcı özellikte, film, köpük, hidrojel ve hidrokolloid formda bulunur. Kolajen, elastin, hyaluronik asit ve kitosan gibi insan dokusu ile uyumlu biyomalzemeler sıklıkla kullanılmaktadır [97].

### **2.5.1 Hidrojel yara örtüleri**

Hidrojeller, hidrofilik, şişme özelliği gösteren, %70-90 oranında su içeren ve çözünmeyen polimerik ağlardan oluşmaktadır. Yüksek su içeriği, yara örtülerinde nemli bir ortam sağlanması, ölü dokuların ya da yabancı maddelerin ortamdaki uzaklaştırılması için avantaj sağlamaktadır [95]. Şeffaf olmaları da yara yüzeyinin gözlemlenmesini kolaylaştırıcı bir özellik sağlar.

Hidrojeller ilk olarak 1960 yılında üretilmiştir [98]. Günümüze kadar da hidrojellerin kompozisyonu, stabiliteilerinin artırılması ya da etkili ilaç taşıma mekanizmalarının geliştirilmesi amacıyla çalışmalar yapılmıştır. PVA, kitosan, aljinat gibi polimerler hidrojel üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır [8,99]. Hidrojellerin iki ana formu bulunmaktadır. Yaprak formdaki hidrojeller, hidrofilik polimerlerin kısmen çapraz bağlanmasıyla oluşturulur ve %96 oranına kadar su tutabilir. Amorf jeller ise üç boyutlu bir yapıya sahip değildir. Akışkan yapıları nedeniyle derin boşlukların doldurulmasında sıklıkla kullanılmaktadır [96].

Hidrojel yara örtüleri, yüksek su içeriği, biyoyumluluk ve esneklik gibi özellikleri nedeniyle yara tedavisinde önemli bir yer tutar. Yanık, cerrahi yara, cilt yırtılmaları ve basınç ülserleri gibi çeşitli yaraların tedavisinde kullanılırlar [95]. Özellikle kuru yaraların tedavisinde, nemli bir ortam oluşturarak nekrotik dokunun otolitik debridmanı için ideal yara örtüleridir. Aynı zamanda soğutucu ve rahatlatıcı etkilerinin olması ağrılı yaraların tedavisinde önemli bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır

[91]. Hidrojellerin yaralardaki su kaybı kontrol edebilmesi ortamın nemli kalmasını sağlar ve gaz değişimini kolaylaştırır. Yaraya yapışmadıkları için yara örtüsünün çıkarılması sırasında doku bütünlüğüne zarar vermez [97].

Düşük mekanik stabilite ise hidrojeller için kısıtlayıcı bir özelliktir. Bu durumu aşmak için çift ağ hidrojeller geliştirilmiştir. İki farklı polimer ağı bir araya getirilerek stabilite, çekme mukavemeti ve biyouyumluluk gibi özellikler artırılabilir [100]. Yüksek su içerikleri nedeniyle büyük miktarda eksüdalı emme özelliği gösteremezler. Bu nedenle hidrojel yara örtüleri, yoğun eksüdalı yaralarda kullanılmazlar.

Hidrojel yara örtüleri, çeşitli klinik çalışmalarda kullanılmıştır. Örneğin, diyabetik ayak ülserlerinde, hidrojel ile tedavi edilen grupta geleneksel yara örtüleri ile karşılaştırıldığında daha fazla ülserin iyileştiği ve tedavi süresinin kısaldığı gösterilmiştir [7]. İkinci derece yanık yara iyileşmesinin takip edildiği bir başka çalışmada ise granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (rhGM-CSF) hidrojelin yara iyileşmesini önemli ölçüde hızlandırabildiği ve güvenli olduğu belirlenmiştir [101]. Endoskopik sinus cerrahisi sonrası zayıf olan yara iyileşme süreci, emilebilir hyaluronan hidrojel ile desteklenmiş, ödem ve kabuklanmanın azalması sağlanmıştır [102]

Hidrojeller, ilaç ya da biyolojik moleküllerin yara bölgesinde kontrollü salınımı için kullanılabilir. Özellikle kronik yaraların tedavisinde etkinliğin artırılması sağlanmaktadır. Antibiyotik yüklü nanokompozit hidrojel tasarımları ile şişme, erozyon ve antimikrobiyal aktivite gibi gelişmiş özellikler sunulabilmektedir [103]. Antibakteriyel ve pH duyarlı özelliklere sahip kurkumin yüklü hidrojellerin *in vivo* yara iyileşmesini önemli ölçüde hızlandırdığı gösterilmiştir [104]

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1 L929 Hücre Kültürü, Çoğaltılması ve Depolanması**

HDM üretimi, toksisite çalışmaları ve yara iyileşmesi deneyinde L929 fare adipoz doku kaynaklı fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü tarafından Bursa Teknik Üniversitesi Biyomühendislik bölümündeki çalışmalar için kültür koleksiyonlarından hediye olarak verilmiştir.

L929 hücreleri, %10 FBS (Fetal Sığır Serum) (Biowest), L-Glutamin (Sigma) ve Penisilin-Streptomisin (Sigma) içeren DMEM-High Glucose (Biowest) besiyeri ile %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37 °C'deki inkübatörde (Panasonic) kültüre edilmiştir. Hücreler %70-80 yoğunluğa geldiğinde %0,25 Tripsin/EDTA (Gibco) kullanılarak pasajlanmıştır. Tripan mavi (Sigma) boyasıyla hücre sayımı ve canlılık analizi gerçekleştirilmiştir. Çoğaltılan hücreler %10 DMSO (Merck) içeren besi yerine alınarak -80 °C derin dondurucuda (Arctico) saklanmıştır.

#### **3.2 HDM Sentezi İçin Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmaları**

L929 hücreleri 2500 hücre/cm<sup>2</sup> yoğunlukta standart besi yerinde (%10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM-High Glucose) T75 flasklara (Nest) ekilerek kültür başlatılmıştır. Kültür yoğunluğu %90'a ulaştığında standart besi yerine 50 µg/ml askorbik asit (Sigma) eklenmiştir. Üç günde bir besi yeri değişimi yapılan kültürler 1, 3 ve 6 hafta boyunca devam ettirilmiştir. Sonlandırılan kültürler PBS (Sigma) ile yıkama gerçekleştirildikten sonra hücre kazıyıcı ile toplanarak steril tüplere aktarılmıştır.

#### **3.3 Hücresizleştirme Teknikleri İle HDM'nin Elde Edilmesi**

Hücresizleştirme işleminde her bir kültür grubu için (1, 3 ve 6 haftalık kültürler) üç farklı yöntem kullanılmıştır.

### **3.3.1 Triton X-100/amonyum hidroksit uygulaması**

Tüplere toplanmış olan hücre/matriks karışımı %0,5 Triton X-100 (Millipore) ve 20 mM NH<sub>4</sub>OH (Sigma) içeren PBS ile 37 °C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra PBS ile yıkama işlemleri gerçekleştirilmiştir [48,105] Hücrelerin parçalanması sonucu matriks üzerinde kalmış olabileceği düşünülen nükleik asit parçalarının uzaklaştırılması için HDM üzerine 100 U/ml olacak şekilde DNase (Thermo) eklenerek, 37 °C'de 1 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

### **3.3.2 Termal şok uygulaması**

Dondurma çözme işlemi art arda üç tekrarlı olacak şekilde -80 °C dondurucuda (Arctiko/ULUF 450) 30 dakika bekletme, 37 °C su banyosunda (Nuve, VWR) çözme şeklinde uygulanmıştır [106]. PBS ile yıkama gerçekleştirildikten sonra HDM üzerine 100 U/ml olacak şekilde DNase eklenerek, 37 °C'de 1 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

### **3.3.3 EDTA uygulaması**

Hücre/matriks karışımı 24 saat boyunca 1 mM EDTA-PBS (Sigma) içinde 4 °C'de bekletilmiştir [107]. Bu uygulamada hücrelerin parçalanmadan uzaklaştırılması hedeflendiği için DNase uygulaması yapılmamıştır. Ancak, diğer hücresizleştirme teknikleri ile karşılaştırma yapmak amacıyla 3 haftalık kültür grubunda bir flaska DNase uygulaması yapılarak karşılaştırma yapılmıştır.

Elde edilen HDM'ler PBS ile yıkama gerçekleştirildikten sonra -80 °C dondurucuda saklanmıştır. Hücresizleştirme işlemi gerçekleştirilmeyen HDM/hücre içeren örnekler kontrol grubu olarak saklanmıştır.

## **3.4 Hücresizleştirme İşleminin Gösterilmesi**

HDM'den hücrelerin uzaklaştırıldığını belirlemek amacıyla genomik DNA izolasyon kiti (Wizard) ile total DNA izolasyonu ve ölçümü gerçekleştirilmiştir. Her bir grup için birer flasktan elde edilen HDM 1 ml PBS ile sulandırılarak içinden 100 µl örnek alınmıştır. Üzerine “nuclei lysis” ve RNase solüsyonu eklenerek 37 °C'de 30 dk bekletilmiştir. Oda ısısına getirilen örneklere “protein precipitation” solüsyonu eklenerek buz üzerinde 5 dk tutulmuştur. Santrifüj sonrası supernatant alınarak sırasıyla izopropanol ve etanol muamelesi yapılarak DNA elde edilmiştir. “DNA

rehydration solution” ile sulandırılan örneklerden 2 µl alınarak Epoch Mikroplaka Spektrofotometre’de dsDNA ölçüm programında, Take 3 plakası kullanılarak ölçüm yapılmıştır. HDM’nin immünojenik tepkiye neden olmaması için toplam DNA miktarının %90’ının uzaklaştırılmış olması gerekmektedir [108]. Bu nedenle kontrol grubunda ölçülen DNA miktarı %100 kabul edilerek hücresizleştirme gruplarında kalan DNA miktarı yüzdeleri buna göre hesaplanmıştır.

Bir haftalık kültürden elde edilen HDM’lerden her grup için 500 µl örnek petriye alınarak 37 °C’de kurutulmuştur. Hazırlanan HDM’lerden taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri alınarak HDM yapıları ve kalan hücreler incelenmiştir. HDM yüzeyi işlem öncesinde Au/Pd ile kaplanmıştır. Carl Zeiss/Gemini 300 cihazında, 7-10 mm örnek dedektör mesafesi ve 5 kV hızlandırıcı voltaj ile inceleme yapılmıştır.

### **3.5 HDM İçeriğinin Belirlenmesi**

#### **3.5.1 BCA analizi**

HDM içeriğindeki toplam protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla BCA protein analizi (Bio Basic Inc.) gerçekleştirilmiştir. BSA standart örnekleri 100-1000 µg/ml aralığında seri dilüsyonlar şeklinde hazırlanarak 562 nm’de ölçüm gerçekleştirilmiş ve standart eğri oluşturulmuştur.

1:5 (bir hafta kültür HDM’leri) ve 1:10 (üç ve altı hafta kültür HDM’leri) oranında sulandırılan HDM örneklerinden 25 µl alınarak 96 kuyucuklu plakalara aktarılmıştır. BCA kit içeriğinde yer alan solüsyon A ve solüsyon B, 50:1 oranında karıştırılarak örnek sayısına göre çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Örnek ve referans kuyuların üzerine 200 µl çalışma solüsyonu eklenerek 37 °C’de 30 dk. inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda 562 nm’de absorbans ölçümü alınmıştır. Örneklerdeki toplam protein miktarı oluşturulan standart eğriye göre hesaplanmıştır.

#### **3.5.2 Sirius red boyaması**

HDM içeriğindeki kolajen ve kolajen olmayan proteinlerin miktarı ve yüzeydeki dağılımlarının belirlenmesi amacıyla sirius red boyaması yapılmıştır [45,47,109]. Boyama için HDM, solüsyon halinde lamların üzerine konarak oda ısısında yarım saat bekletilerek kurutulmuş ve PBS ile yıkama yapılmıştır. Kaplanan lamların yüzeyi

kaplanacak şekilde boya solüsyonu (Abcam) örneklere eklenerek 30 dakika oda ısısında inkübasyon yapılmıştır. Süre sonunda boya aspire edilerek distile su ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Preparatlar oda ısısında kurutulduktan sonra faz kontrast inverted mikroskopta (Olympus) görüntü alınmıştır. Kolajen miktarlarının nicel olarak karşılaştırılabilmesi için preparatlar 0,1 N NaOH (Merck) içinde 30 dakika boyunca çalkalanarak boyanın çözünmesi sağlanmıştır. Her grup için 200µl örnek 96 kuyucuklu plakalara (Nest) aktarılarak spektrofotometrede 550 nm dalgaboyunda ölçüm gerçekleştirilmiştir. 0,1 N NaOH blank olarak kullanılmıştır [110].

### **3.6 HDM'lerin Sitotoksik/Genotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi**

Toksisite analizleri için 6 ve 96 kuyucuklu plakalar HDM ile kaplandıktan sonra üzerine hücre ekimi gerçekleştirilerek 24 saat inkübe edilmiştir. Yüzey kaplama protokolü için kolajen kaplı yüzeylerde fibroblast hücre kültürü yapılan bir çalışma referans alınmıştır [111]. Buna göre 96 kuyucuklu kapların her bir kuyucuğuna 50 µl HDM solüsyonu eklendikten sonra 4 °C'de gece boyu bekletilmiştir. Ardından steril kabin içerisinde kurumaya bırakılıp sonrasında PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir.

Kullanılacak olan HDM miktarı kültür yüzeyinin boyutuna göre hesaplanmıştır. Literatürde HDM'nin hücreler üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalarda genellikle hücresizleştirme işlemi kültür yapılan kabın yüzeyinde gerçekleştirilmektedir [48,105,112]. Ardından bu kaplı yüzeye direkt hücre ekimi yapılmaktadır. Çalışmamızda HDM'yi biyomalzeme içinde bir katkı olarak kullandığımız için hücresizleştirme işlemlerini hücre/matriks yapısını kültür yüzeyinden kazıyarak gerçekleştirilmekteyiz. Bu nedenle kullanılacak HDM miktarını belirlemek amacıyla kültür kabı yüzeylerinin oranları dikkate alınmıştır. Örneğin; 1 T25'ten (25 cm<sup>2</sup> alandan) elde edilen HDM ile 96 kuyucuklu kültür kaplarını kaplamak için 25 cm<sup>2</sup> alan bir kuyucuğun yüzey alanına (0,33 cm<sup>2</sup>) oranlanarak dağıtılmıştır. Kontrol grubu olarak yüzey kaplama yapılmadan standart kültür kabı yüzeyine ekilen hücreler kullanılmıştır.

#### **3.6.1 Sitotoksisitenin değerlendirilmesi**

3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi için plakalara ekilen hücrelerin 24 saat inkübasyonun sonunda besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 µl besiyeri ve hazırlanan MTT çözeltisinden (Sigma) 10 µl

eklenmiştir. Hücreler, 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren inkübatör içerisinde 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda MTT çözeltisi uzaklaştırılmış ve oluşması beklenen formazan kristalleri 100 µl/kuyucuk olacak şekilde DMSO ile çözülmüştür. Kültür kabı 10 dakika yatay çalkalayıcıya konduktan sonra oluşan renk değişimi spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Deneyler 3 tekrarlı ve 2 kez yapılarak elde edilen tüm verilerin ortalamaları alınmış, yaşayan hücrelerin ortalama absorbans değerleri ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca kontrol grubundaki hücre canlılığı %100 kabul edilerek tüm örnekler için kontrole kıyasla yaşayan hücre yüzdeleri belirlenmiştir.

### **3.6.2 Genotoksisitenin değerlendirilmesi**

HDM'lerin hücreler üzerindeki genotoksik etkileri incelenmiştir. Hücrelerde oluşan DNA hasarının tespiti için alkali comet protokolü takip edilmiştir. HDM kaplı yüzeyde 24 saat tutulan hücreler tripsin-EDTA ile toplanmıştır. Hücre peleti %0,65 düşük erime ısılı agar (Acros) ile süspande edilmiştir. %1 normal erime ısılı agar (Sigma) ile kaplanmış lam (Marienfeld) üzerine hücre süspansiyonları yayılarak lamel ile kapatılmıştır. Lamlar, %1 Triton X-100 ve % 10 DMSO eklenmiş 2.5M NaCl (Merck), 100mM EDTA, 100mM Tris (Acros), %1 sodyum sarkosinat (Sigma) (pH: 10) içeren lizis çözeltisinde 90 dakika buzdolabında bekletilmiştir. Ardından lamlar soğuk elektroforez tamponuna alınarak 20 dk bekletilmiş ve 20 dakika elektroforez (24V, 300mA) uygulanmıştır. Elektroforez işlemi bittiğinde 15 dakika süreyle nötralizasyon tampon çözeltisinde (0.4M Tris-HCL, pH: 7.5) bekletilen lamlar alkol serisinden geçirilmiştir. Kurutulan lamlar etidium bromür (Sigma) ile boyanıp lamel kapatıldıktan sonra Perceptive Comet assay IV programı olan floresan mikroskopta (Carl Zeiss/Axio Scope A1) incelenmiştir. Örnekler ikişer tekrarlı olarak çalışılmış ve her preparatta 100 hücre, toplamda 200 hücre sayılarak DNA hasar derecesi kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu olarak belirlenmiştir. Sonuçlar IBM SPSS 22.0 programında Oneway ANOVA testi ile kıyaslanmıştır.

### **3.7 Antibiyotik Yüklü Jelatin Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu**

Jelatin nanopartiküllerin (GelNP) üretiminde sıklıkla tercih edilen yöntemlerinden biri olan nanopresipitasyon, diğer ismiyle solvent yer değiştirme, yöntemi kullanılmıştır. Jelatin (Biomatik) (%1) distile su içerisinde 50 °C'de çözülmüştür. Etanol (Isolab)

içerisinde %2'lik poloxamer (Sigma) hazırlanmıştır. Poloxamer ve jelatin çözeltileri 20:1 oranında karıştırılmıştır. Jelatin-poloxamer çözeltisine %2'lik glutaraldehit (Sigma) yavaşça eklendikten sonra gece boyu +4 °C'de karışmaya bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj uygulanarak nanopartiküllerin çökmesi sağlanmıştır. Pelet -80 °C dondurucuda 24 saat dondurulduktan sonra liyofilize edilmiştir.

### **3.7.1 SEM analizi**

Nanopartiküllerin SEM görüntülerinin alınması için öncelikle yüzeyleri Au/Pd ile kaplanmıştır. Analiz Bursa Teknik Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında yer alan Carl Zeiss/Gemini 300 cihazında, 8,5 mm örnek dedektör mesafesi ve 5 kV hızlandırıcı voltaj ile inceleme yapılmıştır. Partikül boyut ölçümleri Image J yazılımı (Version 1.54) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.7.2 Jelatin nanopartiküllere antibiyotik yüklenmesi**

Jelatin nanopartiküllere antibiyotik yüklenmesi aşamasında gentamisin kullanılmıştır. Yükleme veriminin ölçülebilmesi için öncelikle 0,1-5 mg/ml aralığında gentamisin dilüsyonları hazırlanarak spektrofotometrede spektrum ölçümü yapılmıştır. Tüm konsantrasyonlarda en yüksek absorbansın 285 nm dalgaboyunda alındığı belirlenmiştir. Bu dalgaboyundaki absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Yükleme işlemi için gentamisin: jelatin oranı ağırlıkça 1:1 olacak şekilde hesaplanarak gentamisin solüsyonu hazırlanmış ve 285 nm'de ölçüm alınmıştır. Nanopartiküller antibiyotik solüsyonunda 24 saat oda ısısında karıştırılarak bekletilmiştir. Ayrıca PBS içerisine nanopartikül eklenerek aynı şartlarda karışmaya bırakılmıştır. Sürenin sonunda nanopartiküller santrifüjleme işlemi ile çöktürülmüştür. Supernatanttan 285 nm'de spektrofotometrik ölçüm alınmış ve enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır.

### **3.8 HDM Katkılı PVA-Gel-Cs-GelNP Hidrojellerin Hazırlanması**

HDM katkılı PVA-Gel-Cs-GelNP hidrojeller, üç farklı yöntem ile elde edilen HDM'ler kullanılarak hazırlanmıştır. Kontrol grubu olarak dHDM içermeyen PVA-Gel-Cs-GelNP hidrojel ve ayrıca dHDM ve jelatin nanopartikülleri içermeyen PVA-

Gel-Cs hidrojel de kullanılmıştır. Deney grupları Çizelge 3.1’de gösterilen şekilde adlandırılmıştır.

**Çizelge 3.1** Hibrit hidrojel gruplarının adlandırılması.

		<b>HDM elde edilme yöntemi</b>
<b>Hidrojel 1</b>	PVA-Gel-CS-GelNP	Triton X100/ Amonyum hidroksit
<b>Hidrojel 2</b>	PVA-Gel-CS-GelNP	Dondurma/Çözme
<b>Hidrojel 3</b>	PVA-Gel-CS-GelNP	EDTA
<b>Kontrol</b>	PVA-Gel-CS-GelNP	-
<b>Katkısız</b>	PVA-Gel-CS	-

HDM katkılı PVA-Gel-Cs-GelNP (polivinil alkol-jelatin-kitosan-jelatin nanopartikül) hibrit hidrojellerin hazırlanması için öncelikle PVA (Sigma), jelatin (Biomatik) ve kitosan (AFG Bioscience) çözeltileri hazırlanmıştır. PVA çözeltisi (%5) hazırlamak için PVA (Mw 85,000-124,000) distile suda 2 saat süresince 90 °C’de manyetik karıştırma altında çözülmüştür. Jelatin-tip B (%5) 50 °C’de 2 saat boyunca karıştırılarak çözülmüştür. Kitosan (orta moleküler ağırlık) (%2) 0,5 M asetik asit (Isolab) çözeltisinde 40 °C’de 12 saat süresince karıştırılarak çözülmüştür. Hazırlanan polimer çözeltileri eşit hacimde birleştirilerek 3 saat boyunca oda ısısında karıştırılmıştır. Ardından karışıma 0,3 mg/ml olacak şekilde GelNP eklenerek yarım saat oda ısısında karışması sağlanmıştır. GelNP eklenen karışım 12 kuyucuklu plakalarda kuyucuk başına 1 ml olarak dökülerek -80 °C’de 24 saat dondurulmuştur. Ardından liyofilizatörde kurutulmuştur. Hazırlanan hidrojeller tepkimeye girmeyen reaktanların uzaklaştırılması için su ile yıkanmış ve ardından kurutulmuştur [99].

HDM katkılı PVA-Gel-CS-GelNP hidrojellerin hazırlanması için GelNP ile birlikte karışıma 5 mg/ml olacak şekilde HDM eklenerek karışmaya bırakılmıştır. Ardından 12 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 1,5 ml dökülerek -80 °C’de 24 saat dondurulmuş ve liyofilizatöre alınmıştır. Hazırlanan HDM katkılı hidrojeller tepkimeye girmeyen reaktanların uzaklaştırılması için su ile yıkanmış ve liyofilizatöre alınarak kurutulmuştur.

### 3.9 Hidrojellerin Karakterizasyonu

#### 3.9.1 FTIR analizi

Hazırlanan hidrojellerin kimyasal yapısı NICOLET-IS50 marka FTIR cihazı ile incelenmiştir. ATR aparatı kullanılarak 400-4000 cm<sup>-1</sup> frekans aralığında spektrumlar hazırlanmıştır. Polimerik yapının oluşumu ve HDM'nin yapıya katılması FTIR analizi ile takip edilmiştir.

#### 3.9.2 SEM analizi

Hidrojellerin morfolojik özellikleri SEM analizleri ile belirlenmiştir. Bu sayede HDM katkısının morfolojik değişime yol açıp açmadığı incelenmiştir. SEM analizleri Bursa Teknik Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında Carl Zeiss / Gemini 300 marka cihaz ile yapılmıştır. Gözenek çaplarının ölçümleri çekilen SEM fotoğraflarında ImageJ® yazılımı (Version 1.54) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### 3.9.3 Çekme-basma testi

Hidrojellerin mekanik dayanıklılık ve karakterizasyonu için oda sıcaklığında çekme ve basma testleri uygulanmıştır [113]. Çekme-kopma-basma testleri Bursa Teknik Üniversitesi Makine Mühendisliği bölümünde Shimadzu-AG-XPLUS 250KN AGS-X1KN EHF-EV100KN marka cihaz ile yapılmıştır.

#### 3.9.4 Şişme testleri

Doğal HDM'yi taklit etmek için, hidrojel lifli yapı iskelesi su geçirgenliği ve soğurma parametreleri gibi önemli özellikleri olacak şekilde üretilmelidir. Yapı iskelesinin yüksek geçirgenliği, hücrelerin büyümesi ve yara iyileşmesi için gerekli olan besinlerin ve atıkların daha iyi taşınması anlamına gelir. Hidrojeller, yara yatağının nem ortamını korumak için yararlı olan suyu tutabilir. Bundan dolayı hazırlanan hidrojellerin şişme kapasiteleri araştırılmıştır.

Elde edilen hidrojellerin denge şişme kapasitelerini belirlemek için kuru hidrojel örnek pH 7,4'deki çözültide bekletilerek belirli aralıklarla tartım gerçekleştirilmiştir. Zamana bağlı şişme oranı şu şekilde hesaplanmıştır:

$$\text{Şişme Oranı} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (3.1)$$

$W_s$ , şişen hidrojinin ağırlığıdır.

$W_d$ , kuru hidrojinin ağırlığıdır.

### 3.9.5 Termal Gravimetrik Analiz

Hidrojinlerin termal karakterizasyon çalışmaları TA / SDT650 marka cihaz ile yapılmıştır. 10 mg örnekler üzerinde yapılan analizde 10°C /dk ısıtma hızıyla sıcaklık oda sıcaklığından 300°C'ye kadar artırılmıştır.

### 3.9.6 Hidrolitik Degredasyon Testleri

Hidrojinler ( $W_0$ ) 50 mL pH 7,4 tamponda daldırılarak 25 °C'de belirli zaman aralıklarında tutulmuştur. Birinci, üçüncü ve yedinci günlerde hidrojin tampondan çıkarılarak yıkanmıştır. Daha sonra nihai sabit ağırlık bulunana kadar kurutulmuştur.

Hidrolitik degredasyon (%) şu şekilde hesaplanmıştır:

$$\text{Hidrolitik degredasyon(\%)} = [(W_0 - W_f)/W_0] \times 100 \quad (3.2)$$

$W_0$ , hidrojinlerin kuru ağırlığıdır.

$W_f$ , hidrojinlerin işlem sonundaki kuru ağırlığıdır.

### 3.9.7 Su Buharı Geçirgenlik Testleri

Hazırlanan örneklerin su buharı geçirgenlik testleri ASTM E96 (Uluslararası Amerikan Test ve Materyalleri Topluluğu)'da belirtilen yöntemle yapılmıştır. Bu amaçla daire şeklindeki örnekler tartılmıştır. Ardından çapı hidrojin ile uyumlu içinde 10 mL deiyonize su bulunan deney kabının üzerine konmuştur. Kapların ağzı sıkıca parafilm ile kapatılmış ve bağıl nemlilik oranı %75 olan etüvde 37 °C'de bekletilmiştir.

24 saat sonunda örnekler tartılmış ve ölçümler 3 kez tekrar edilmiştir. Örneklerin su buharı geçirgenlik değerleri ( $\text{g/m}^2/\text{gün}$ ) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$WVTR = \frac{(\Delta m/\Delta t)}{A} \quad (3.3)$$

$\Delta m/\Delta t$ , nem kaybı miktarı ( $\text{g/gün}$ ).

A, membranın alanıdır.

### 3.10 Hidrojellerin *in vitro* Biyouyumluluklarının Belirlenmesi

Hazırlanan HDM katkılı hibrit hidrojellerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için ekstraksiyon çözeltileri hazırlanmıştır. Hidrojeller, tüm yüzeylerine etki edecek şekilde UV ışık altında bekletilerek steril edilmiştir. Ardından steril tüpler içerisine alınarak üzerine besiyeri eklenmiştir. 37 °C etüv içerisinde 24 saat süreyle bekletildikten sonra sitotoksisite testlerine geçilmiştir. Ekstrakt sıvı hacimleri ISO 10993-12 protokolü detaylarında belirtildiği gibi belirlenmiştir. Buna göre 0,5-1 mm kalınlığındaki malzemeler için önerilen konsantrasyon olan 3 cm<sup>2</sup>/ml kullanılmıştır.

Sitotoksisite çalışmalarında da ISO 10993-5 standardı protokollerinde de önerilen ve referans hücre hattı olarak kabul edilen L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plakalara 200 µl 1x10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin kuyucuklar içinde tutunarak çoğaldıkları bu sürenin sonunda steril şartlarda besiyeri uzaklaştırılmış ve hazırlanan malzeme ekstraktlarını içeren besiyeri ortamları (%100, %75, %50, %25 oranlarında), negatif kontrol grubu olarak normal besiyeri ortamı ve pozitif kontrol olarak %0,1 triton X-100 içeren besiyeri 200 µl/kuyucuk olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiş ve 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır.

Ekstraktlar ile inkübasyon süresinin sonunda MTT yöntemi “3.6.1 Sitotoksisitenin değerlendirilmesi” bölümünde açıklandığı gibi uygulanmıştır.

Hidrojellerin sitotoksisite değerlendirmesinde ayrıca nötral kırmızı alım (NKA) yöntemi uygulanmıştır. Bunun için 24 saat ekstraktlar ile muamele edilen hücrelerin besiyerleri uzaklaştırmıştır. Ardından her bir kuyucuğa 200 µl nötral kırmızı çözeltisi (Sigma) eklenerek 37 °C’de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda plaklardaki boya ortamdan uzaklaştırılmış ve kuyucuklar üç kez PBS ile yıkanmıştır. Kuyucuklara 200 µl %50 metil alkol, %1 glasiyel asetik asit ve %49 distile su karışımından oluşan sabitleyici çözelti eklenmiş ve plakalar çalkalayıcı üzerine yerleştirilerek 20 dakika süre ile bekletilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik yoğunlukları plaka okuyucuda 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

MTT testinde tüm deneyler en az 3 tekrarlı ve 2 kez yapılmış, elde edilen tüm verilerin ortalamaları alınarak yaşayan hücrelerin ortalama absorbans değerleri ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca kontrol grubundaki hücre canlılığı %100 kabul edilerek tüm örnekler için kontrole kıyasla yaşayan hücre yüzdeleri belirlenmiştir.

### 3.11 Hidrojellerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi

*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* yaralarda en sık karşılaşılan enfeksiyon nedeni bakteriler arasında yer almaktadır [114]. Hazırlanan HDM katkılı/katkısız PVA-Gel-CS-GelNP hibrit hidrojellerin antibakteriyel etkinliklerinin değerlendirilebilmesi amacıyla *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *E. coli* kullanılmıştır. *P. aeruginosa* ve *E.coli* Gram (-), *S.aureus* ise Gram (+) bakteriler oldukları için hazırlanan HDM katkılı/katkısız PVA-Gel-CS hidrojellerinin Gram (-) ve Gram (+) bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkinliği değerlendirilmiştir. Bakterilerden süspanse kültür üretmek amacıyla Nutrient Agar (Biolife) besi ortamına ekim yapılmış ve bakteriler 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanan kültürler seri sulandırma yapılmış ve sulandırılan kültürler McFarland densitometre aracılığı ile  $10^6$  CFU/mL bakteri konsantrasyonuna ayarlanarak zon testi için kullanılmıştır. Zon inhibisyon testinde, bakteriler 100 µL bakteri süspansiyonu nutrient agar üzerine eklenmiş ve bakteri süspansiyonu agar plate üzerine yayılmıştır. UV ışık yardımıyla steril edilmiş HDM katkılı/katkısız PVA-Gel-CS-GelNP hidrojeller agar plate üzerine yerleştirilmiş ve 18-24 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda zon çapları ölçülmüştür.

### 3.12 Hidrojellerin Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri

*In vitro* çizik testi (*in vitro* scratch assay), *in vitro* hücre çoğalmasını (proliferasyon) ve göçünü (migrasyon) ölçmek için kolay, düşük maliyetli ve iyi geliştirilmiş bir yöntemdir. Temel adımlar, bir hücre tek katmanında bir "çizik" oluşturmayı, çizici kapatmak için hücre göçü sırasında başlangıçta ve düzenli aralıklarla görüntüleri yakalamayı ve hücrelerin göç oranını ölçmek için görüntüleri karşılaştırmayı içerir. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimlerinin hücre göçü üzerindeki etkileri, *in vivo* yara iyileşmesi sırasında hücre göçünü taklit eden çalışmalar için özellikle uygundur ve göç sırasında canlı hücrelerin görüntülenmesini sağlar. Homojen hücre popülasyonlarının göçünü izlemenin yanı sıra, bu yöntem aynı zamanda çizimin ön ucundaki tek tek hücrelerin göçünü ölçmek için de benimsenmiştir. Bu yöntem genellikle birkaç saatten bir geceye kadar sürer [115].

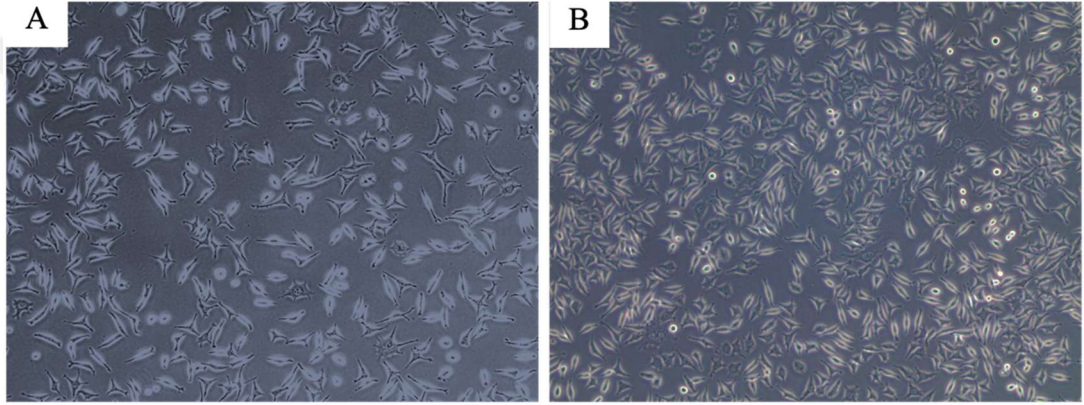
L929 hücre kültürlerinde yapılan bu testte altı kuyucuklu plakalara  $2 \times 10^4/\text{cm}^2$  yoğunluğunda ekilen hücreler tüm yüzeyi kaplayana kadar beklenmiştir. Ardından yapay bir çizik oluşturmak için pipet ucu kullanılarak merkezden düz bir çizgi halinde kazıma işlemi gerçekleştirilmiştir [116]. Daha sonra besi yeri hidrojel ekstraktları ile değiştirilmiştir. Hidrojel ekstraktlarının 1:1 oranında besi yeri ile sulandırılmış olan %50 konsantrasyonları da deney gruplarına eklenmiştir. Kontrol olarak DMEM-High glucose kullanılmıştır. Hücreler standart kültür şartlarında inkübatörde tutularak belirli aralıklarla gözlenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.



## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1 L929 Hücre Kültürü

L929 hücrelerinin standart kültür koşullarında çoğaltılması ve depolanması sağlanmıştır. Hücrelerin karakteristik fibroblast morfolojisi gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.1).



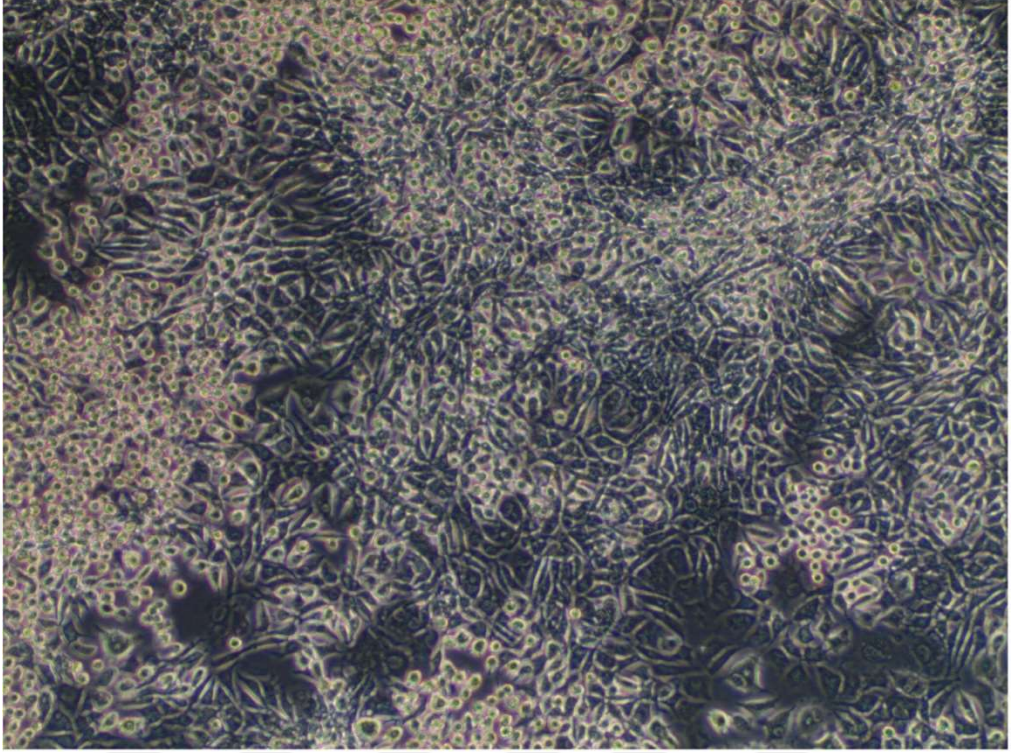
**Şekil 4.1** L929 hücrelerinin kültürün birinci (A) ve üçüncü (B) günlerdeki inverted mikroskopta alınan görüntüleri (10X).

### 4.2 HDM Sentezi

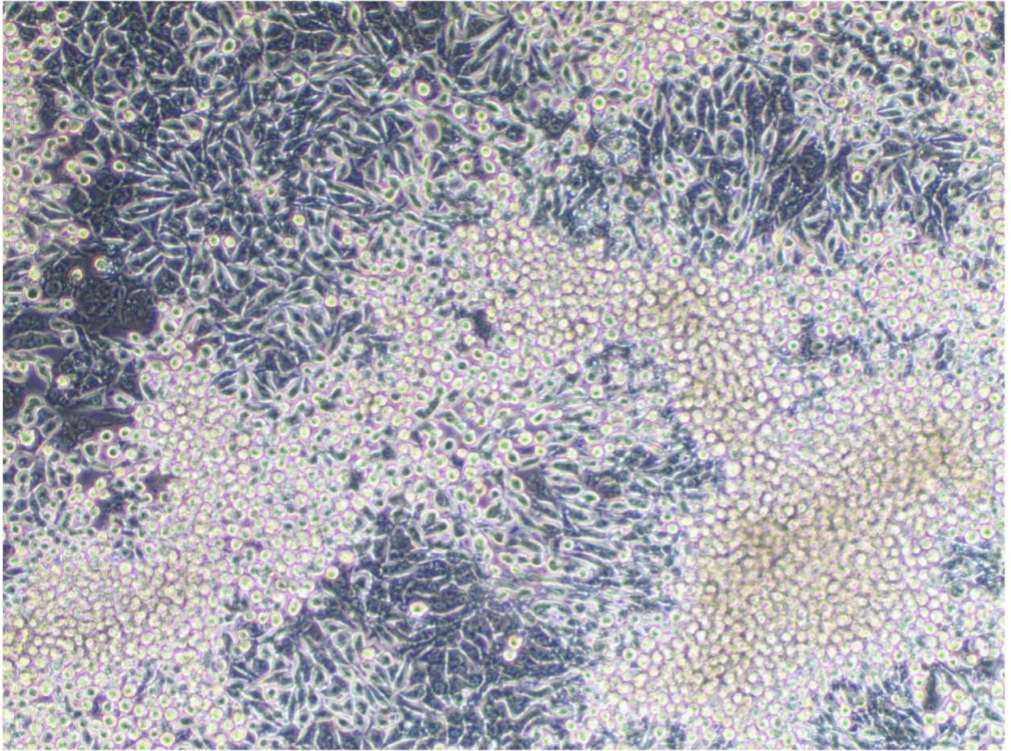
Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden HDM elde edilen bir çalışmada kültür süresi uzun tutularak 3 hafta sonunda hücrelerin bir kenardan kalkmaya başladığı belirtilmiştir. Kültür bu şekilde üç hafta daha devam ettirilerek yaklaşık 5 mm boyutunda doku benzeri bir yapı (microtissue-like structures) elde edilmiş ve hücresizleştirme işlemi bu doku benzeri yapıların solüsyon içerisine konması ve santrifüjleme işlemleri ile gerçekleştirilmiştir [117]. Çalışmamızda da benzer bir protokol izlenmiştir. HDM sentezi için en etkin kültür süresinin bulunabilmesi amacıyla 1, 3 ve 6 hafta süren kültür grupları oluşturulmuştur.

Fibroblast kültüründe bir hafta sonunda hücreler kültür kabı yüzeyini tamamen kaplamıştır (Şekil 4.2). Üç ve altı hafta gruplarında hücrelerin oldukça yoğun olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3). Altı hafta boyunca hücrelerin kültür yüzeyine tutunmuş bir

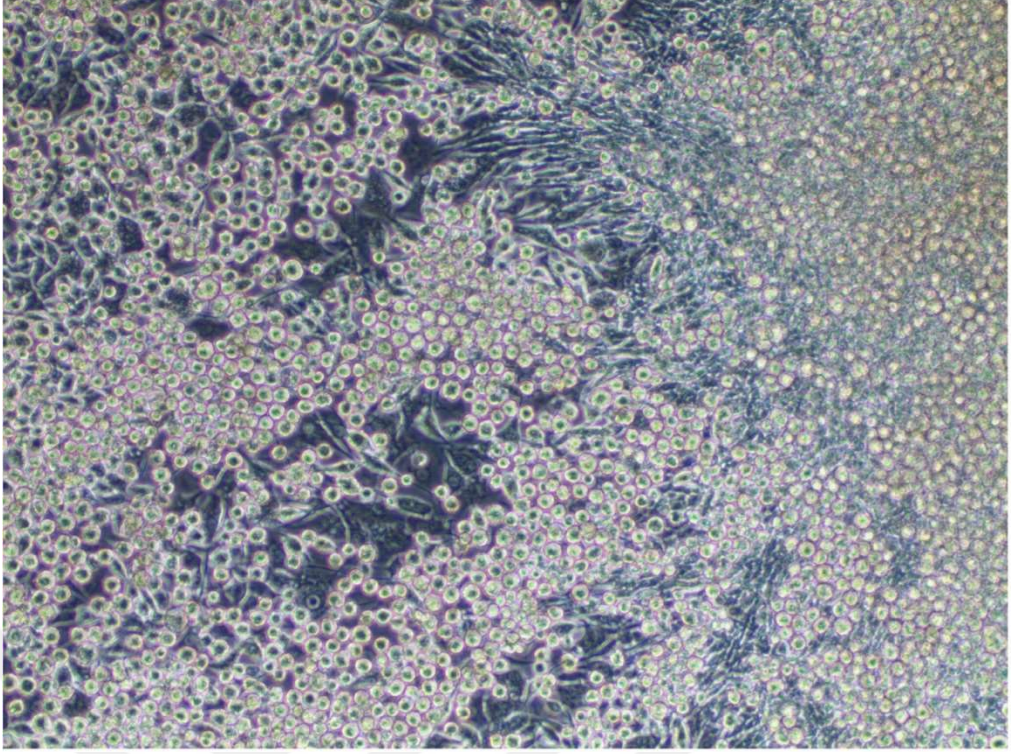
şekilde kaldığı ve çok katmanlı hücre öbeklerinin oldukça yoğunlaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.2** L929 hücre kültürünün 1 hafta sonunda inverted mikroskopta alınan görüntüsü (10X).



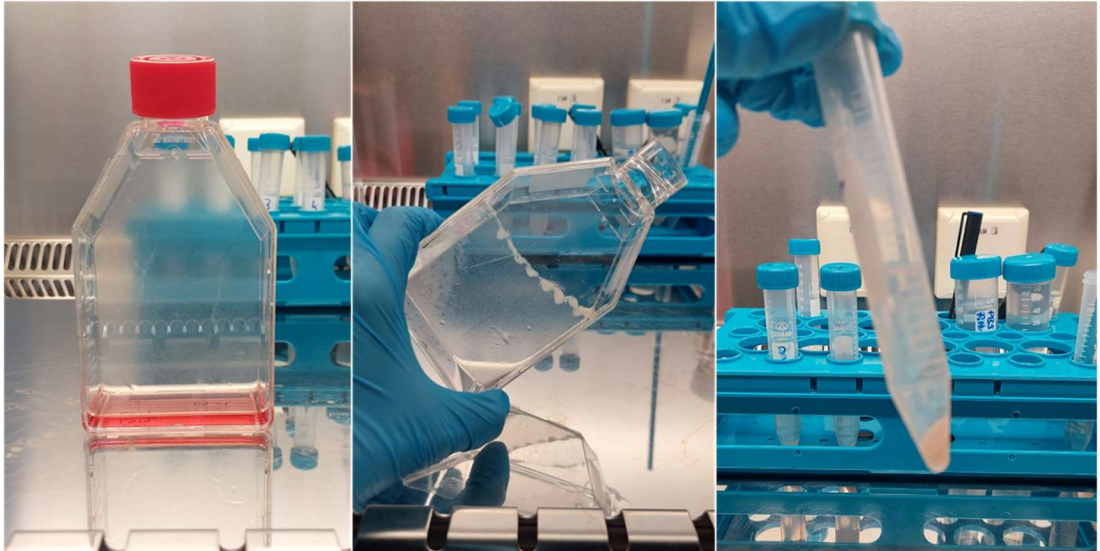
**Şekil 4.3** L929 hücre kültürünün 3 hafta sonunda inverted mikroskopta alınan görüntüsü (10X).



**Şekil 4.4** L929 hücre kültürünün 6 hafta sonunda inverted mikroskofta alınan görüntüsü (10X).

### 4.3 Hücresizleştirme İşlemleri

Kültür süresi sona erdiğinde hücre/matriks yapıları kültür kabı yüzeyinden hassas bir şekilde kazınarak toplanmıştır (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5** Hücre ve matriksin kültür kabından kazınarak toplanması.

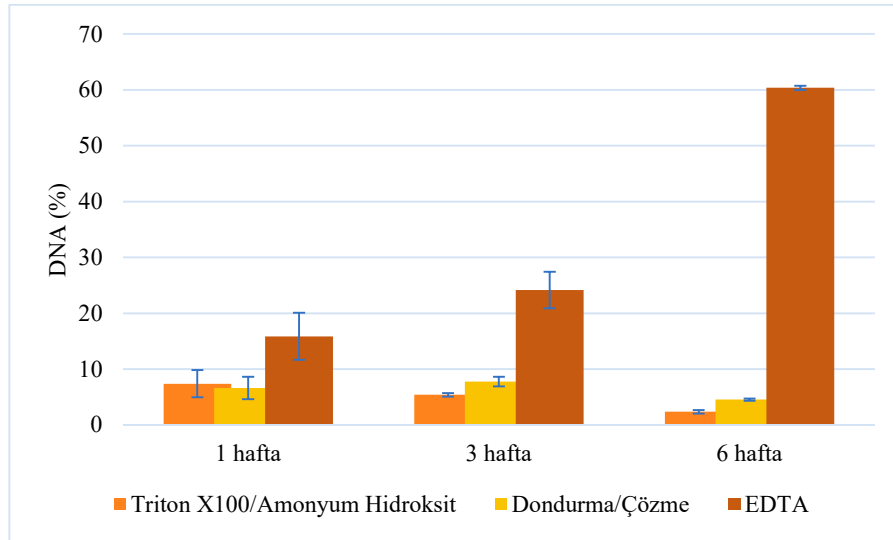
Tüplere alınan hücre/matriks yapıları eş zamanlı olarak üç farklı yöntem ile hücresizleştirilmiştir. Triton X100/amonyum hidroksit ve dondurma çözme

yöntemleri uygulanan gruplarda DNase uygulaması yapılmıştır. EDTA uygulanan grup ve kontrol grubuna ise DNase uygulaması yapılmamıştır. Ancak, yöntemlerin karşılaştırılmasında bir fark oluşturmaması amacıyla üç haftalık EDTA grubunda toplanan HDM'nin bir kısmına DNase eklenerek aynı protokolle inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca, üç hafta triton X100/amonyum hidroksit grubunda DNase uygulaması yapılmadan bir örnek ayrılarak DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

#### 4.4 Hücresizleştirme İşleminin Gösterilmesi

Hücresizleştirme işlemlerinde amaç hücrelerin etkin bir şekilde uzaklaştırılması ve HDM'nin mümkün olduğunca korunarak elde edilmesidir. Karşılaştırdığımız üç yöntemde hücrelerin uzaklaştırılma etkinliğini ölçmek için DNA izolasyonu ve miktar ölçümü gerçekleştirilerek ortamda kalan hücre miktarları belirlenmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu yüzde yüz kabul edilerek deney gruplarında HDM yapısında kalan hücrelerin yüzdeleri hesaplanmıştır.

Bir, üç ve altı hafta kültürden elde edilen HDM'lerdeki DNA miktarları karşılaştırıldığında tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6** Uygulanan farklı hücresizleştirme yöntemleri sonrasında ortamda kalan DNA miktarları.

Gruplar birbiri arasında karşılaştırıldığında ise triton X100/amonyum hidroksit ve dondurma/çözme uygulamalarında tüm kültür süresi gruplarında, EDTA grubuna göre DNA miktarı anlamlı derecede azalmıştır. Bir haftalık kültürden elde edilen

HDM'lerde triton X100/amonyum hidroksit ve dondurma/çözme uygulamaları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.1). Üç haftalık kültürden elde edilen HDM'lerdeki DNA miktarları karşılaştırıldığında triton X100/amonyum hidroksit uygulaması sonrası gözlenen düşüş dondurma/çözme grubuna göre anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.1** Bir hafta kültür sonrası DNA ölçümlerinin p değerleri.

	Dondurma/ Çözme	Triton X100/ Amonyum hidroksit	EDTA
Triton X100/ Amonyum hidroksit	0,646		
EDTA	0,008	0,043	
Kontrol	0,002	0,001	0,003

**Çizelge 4.2** Üç hafta kültür sonrası DNA ölçümlerinin p değerleri.

	Dondurma/ Çözme	Triton X100/ Amonyum hidroksit	EDTA
Triton X100/ Amonyum hidroksit	0,0173		
EDTA	0,0111	0,0117	
Kontrol	0,0001	0,01465	0,0194

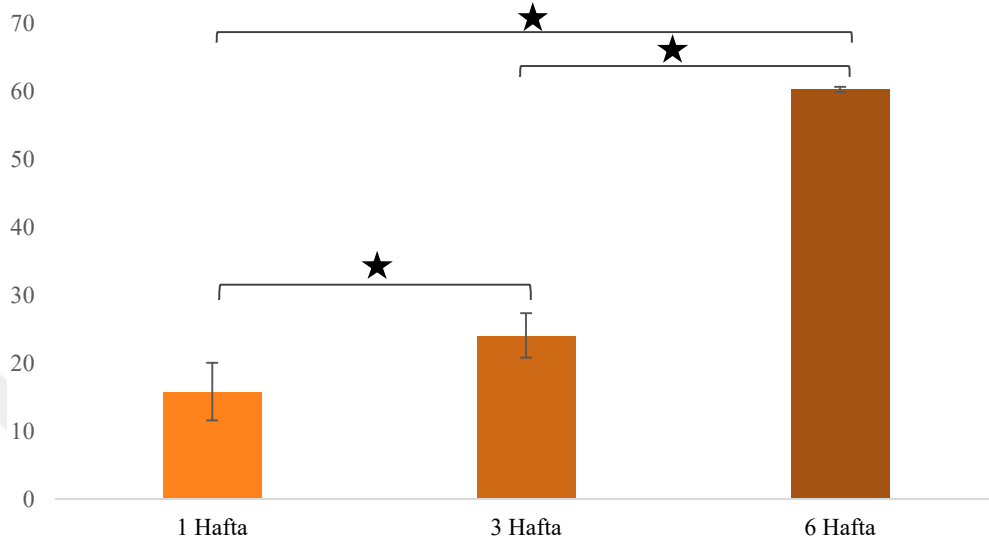
Altı haftalık kültür gruplarında triton X100/amonyum hidroksit ve dondurma çözme grupları arasında anlamlı bir fark bulunmazken, EDTA grubu her iki gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3** Altı hafta kültür sonrası DNA ölçümlerinin p değerleri.

	Dondurma/ Çözme	Triton X100/ Amonyum hidroksit	EDTA
Triton X100/ Amonyum hidroksit	0,0165		
EDTA	0,00001	0,00002	
Kontrol	0,0003	0,0004	0,0023

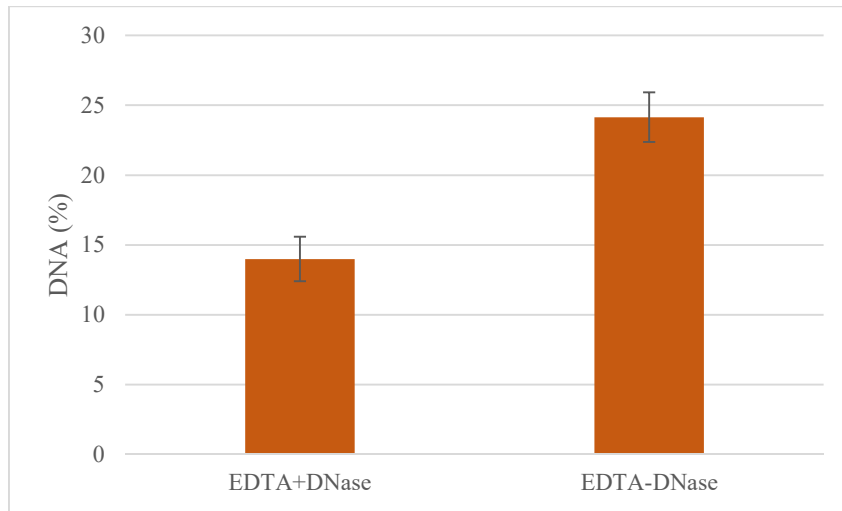
EDTA ile hücreleştirme tekniğinin referans alındığı makalede hücreler kısa süreli kültür edildikten sonra işleme alınmıştır [107]. Bu nedenle kültür süresinin EDTA ile hücreleştirme etkinliği üzerindeki etkisi incelenmiştir. Kültür süresinin uzaması EDTA uygulamasının etkinliğini anlamlı derecede düşürmüştür (Şekil 4.7). Bu

nedenle EDTA ile hücresizleştirme işlemlerinde kısa süreli kültür yapılması uygun bulunmuştur. Ancak, bir haftalık kültür grubunda ortamda kalan DNA miktarının %10'un üzerinde olması, yöntemin tek başına uygulanmasının yeterince etkili olmadığını göstermektedir.



**Şekil 4.7** EDTA uygulaması ile hücresizleştirmede sonrası kalan yüzde DNA miktarlarının kültür süresine göre değişimi.

Diğer iki grupta uygulanan DNase inkübasyonunun EDTA yöntemindeki etkisine bakıldığında hücresizleştirme yapıldıktan sonra DNase uygulandığında ortamda kalan hücre miktarında düşüş olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8). Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. HDM yapısındaki DNA miktarı enzim uygulandığında da %10'un üzerinde kalmıştır.



**Şekil 4.8** EDTA ile hücresizleştirme sonrası DNase uygulanan ve uygulanmayan örneklerde kalan DNA miktarları (p=0,09).

Triton X100/amonyum hidroksit ve dondurma/çözme ile hücesizleştirme sonrası parçalanen hücrelerden ortama yayılan ve HDM üzerine tutunan DNA parçalarının DNase inkübasyonu ile uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu uygulamanın etkisini görmek amacıyla DNase uygulanmayan HDM’de DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.9). DNase inkübasyonu yapılan örnekte kalan DNA miktarı anlamlı derecede az bulunmuştur.

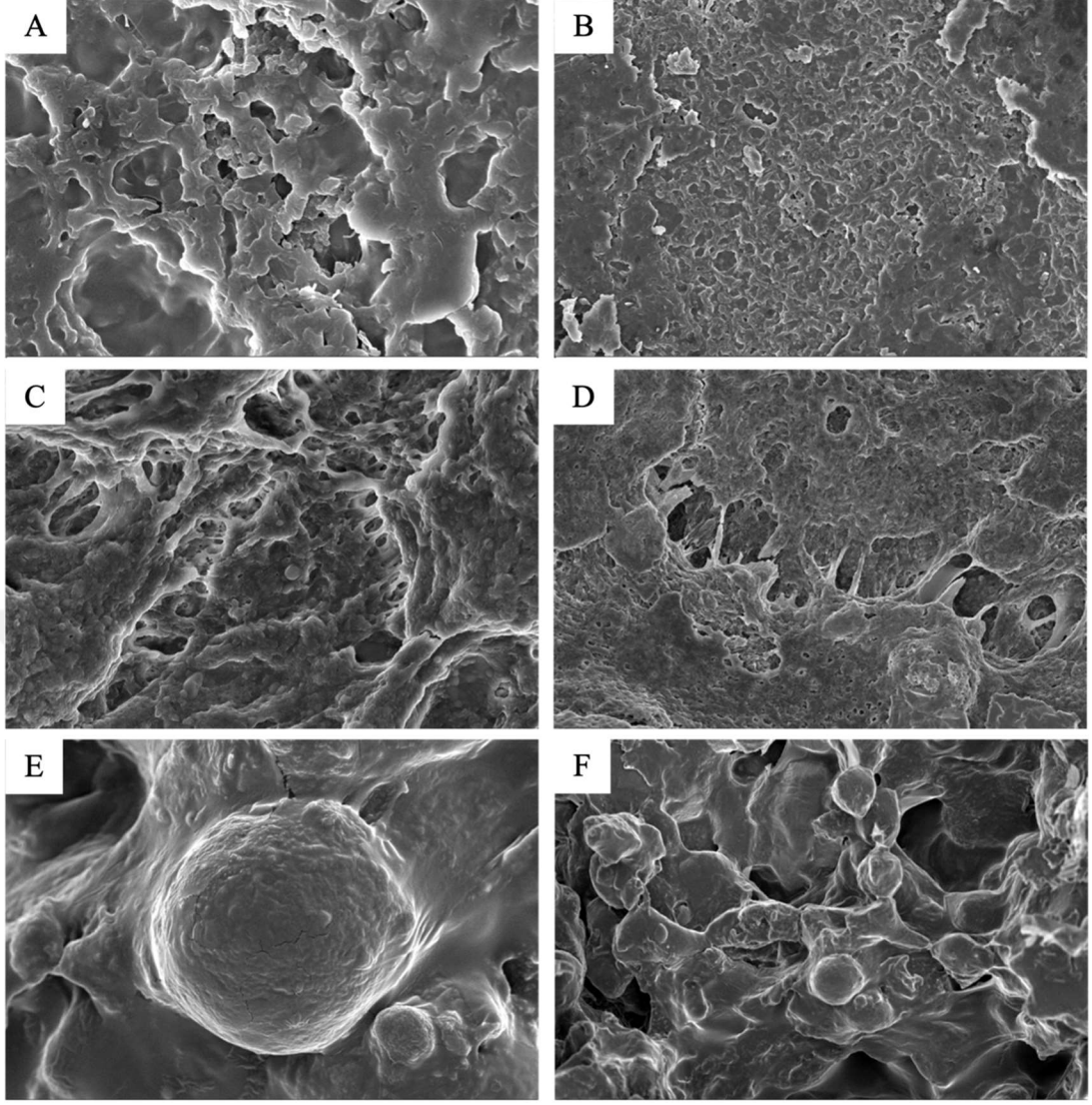


**Şekil 4.9** Triton X100/amonyum hidroksit ile hücesizleştirme sonrasında DNase uygulamasının DNA miktarı üzerindeki etkisi ( $p<0,05$ ).

HDM'nin immün reddini önlemek için DNA'nın en az %90'ının uzaklaştırılması sağlanmalıdır [108]. Fibroblast hücre kültüründe uyguladığımız fiziksel, kimyasal ve biyolojik hücesizleştirme yöntemlerinde kontrol grubuna göre DNA miktarı, triton X100/amonyum hidroksit ve dondurma/çözme tekniklerinde %10'un altına inmiştir. EDTA yönteminin etkinliği kültür süresi kısaldığında artış gösterse de yeterli olmamıştır.

#### 4.4.1 SEM analizi

HDM'lerin mikromorfolojileri SEM görüntüleri ile incelenmiştir. Fibriler bir yapı göstermeyen dHDM'lerin düzensiz yüzeye sahip ve gözenekli olduğu gözlenmiştir. Elde edilen görüntüler literatürde farklı hücrelerden elde edilen dHDM'lerin morfolojileri ile uyumludur [45,108,118,119]. Fibriler yapının olmamasının yüksek yoğunlukta protein ve karbonhidrat içeren dHDM'nin bileşenlerinin iç içe geçtiği örneklerin karmaşık yapısından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir [108].



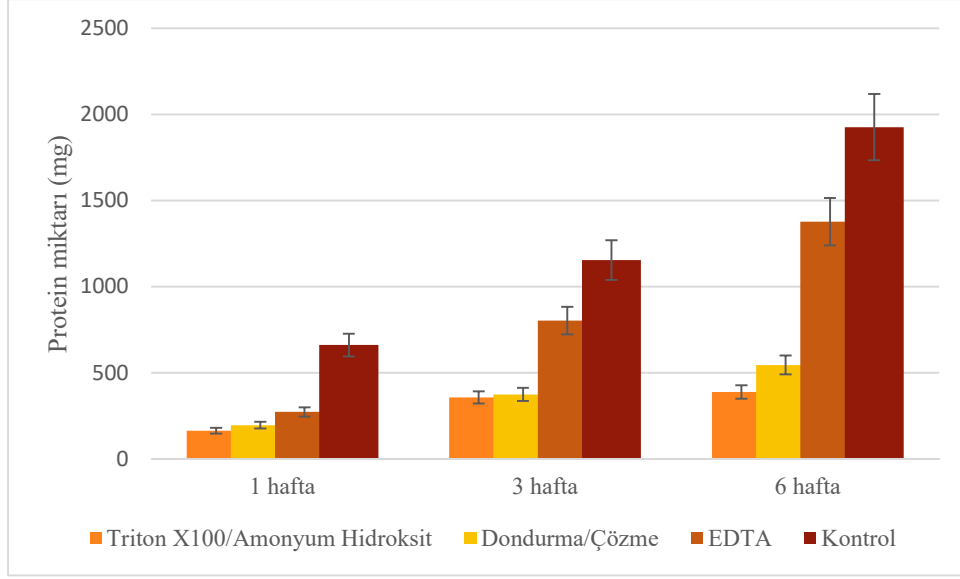
**Şekil 4.10** HDM gruplarının (A,B: Triton X100/amonyum hidroksit; C,D: dondurma/çözme; E,F: EDTA) SEM görüntüleri.

SEM görüntülerinde EDTA uygulaması sonrası ortamda kalan hücreler görüntülenmiştir (Şekil 4.10). Triton X-100/amonyum hidroksit uygulaması ve dondurma/çözme dHDM'lerinde ise görüntülerde hücrelere rastlanmamıştır. Elde edilen görüntülerinin DNA ölçüm sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

## 4.5 HDM İçeriğinin Belirlenmesi

### 4.5.1 BCA analizi

Hücreleştirme sonrasında elde edilen dHDM'lerin miktarının belirlenmesi amacıyla BCA analizi ile toplam protein miktarları belirlenmiştir. BSA standart grafiği referans alınarak, bir T75 flasktan elde edilen dHDM'lerin yapısındaki toplam protein miktarları hesaplanmıştır (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11** Bir T75 flasktan elde edilen dHDM'lerdeki toplam protein miktarları.

Bir, üç ve altı haftalık kültürlerde elde edilen dHDM'lerdeki protein miktarları EDTA ve kontrol gruplarında diğerlerine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Hüresizleştirme işlemi gerçekleştirilmeyen kontrol grubunda protein miktarının yüksek olması beklenen bir durumdur. EDTA gruplarında ise hücrelerin etkin bir şekilde uzaklaştırılmamış olması protein miktarının da yüksek çıkmasına neden olmuştur.

Triton X100/amonyum hidroksit ve dondurma/çözme gruplarına bakıldığında tüm kültür sürlerinde dondurma/çözme sonrası elde edilen dHDM'lerde protein miktarında artış görülmüştür. Ancak bu artış yalnızca altı haftalık kültürlerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,01$ ).

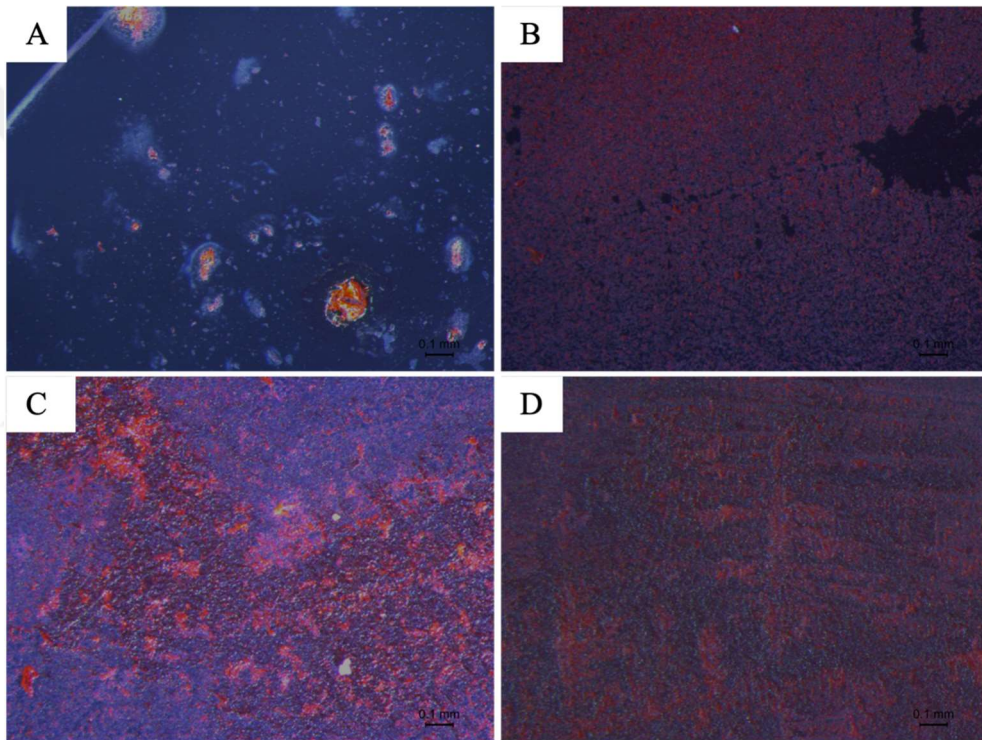
Kültür süreleri incelendiğinde tüm gruplarda üçüncü haftada bir haftalık kültüre göre protein miktarında anlamlı bir artış meydana gelmiştir. Üç ve altı haftalık gruplar karşılaştırıldığında ise meydana gelen artış yalnızca triton X100/amonyum hidroksit uygulamasında anlamlı değildir.

Dondurma/çözme uygulamasında kültür süresi iki katına çıkarıldığında elde edilen protein miktarı anlamlı derecede yükselmiştir ( $p < 0,01$ ). Ancak bu artış %45 oranında gerçekleşmiştir. Bu nedenle elde edilen dHDM miktarı göz önünde bulundurulduğunda üç haftalık kültür yapılmasının işlem süresinde meydana gelebilecek kontaminasyon vb komplikasyon risklerinin azaltılması için daha avantajlı olduğu düşünülmektedir.

#### 4.5.2 Sirius red boyaması

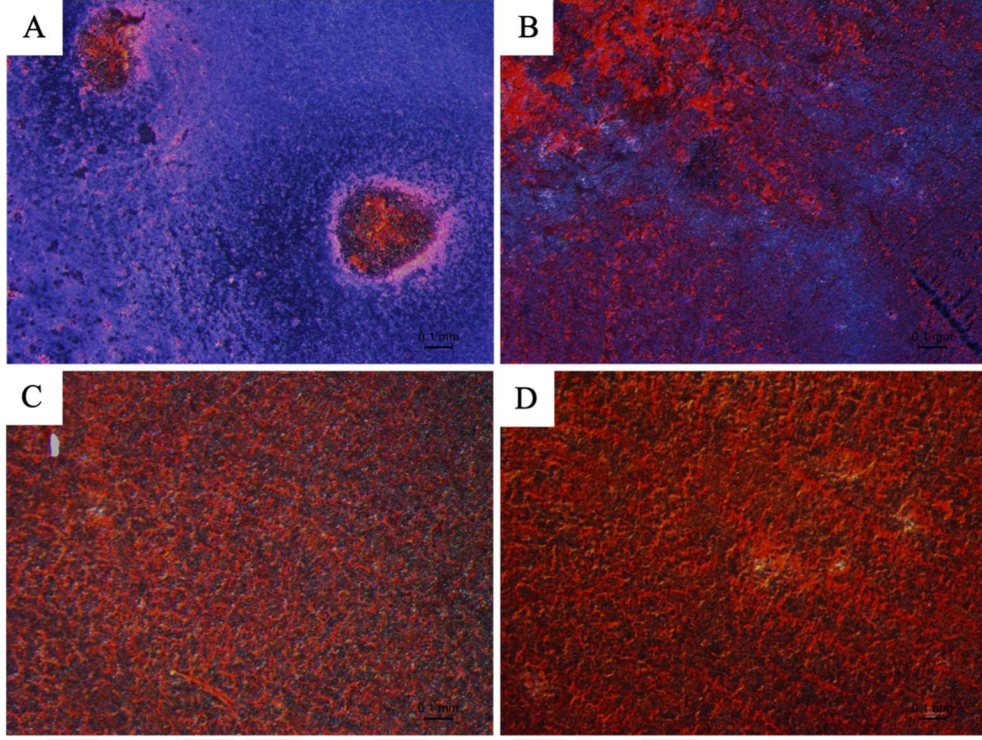
Farklı yöntemler ile elde edilen dHDM'lerin kolajen içerikleri sirius red ile boyanarak analiz edilmiştir. Boyama için kültürde eşit alandan toplanan dHDM'ler kullanılmıştır. Ardından boyama miktarları spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür.

Bir haftalık kültür gruplarında triton X100/amonyum hidroksit ile elde edilen HDM'de boyama miktarının diğerlerine göre oldukça az olduğu görülmüştür (Şekil 4.12). dHDM parçalanmış bir yapı göstermiştir. Dondurma/çözme ve EDTA gruplarında ise kontrol HDM'sine yakın bir görüntü elde edilmiştir. Boya dHDM'lerin yapısında daha homojen bir dağılım göstermiştir.



**Şekil 4.12** Bir hafta kültür sonrası elde edilen HDM'lerin sirius red boyama görüntüleri (A: Triton X100/amonyum hidroksit, B: Dondurma/çözme, C:EDTA, D:Kontrol).

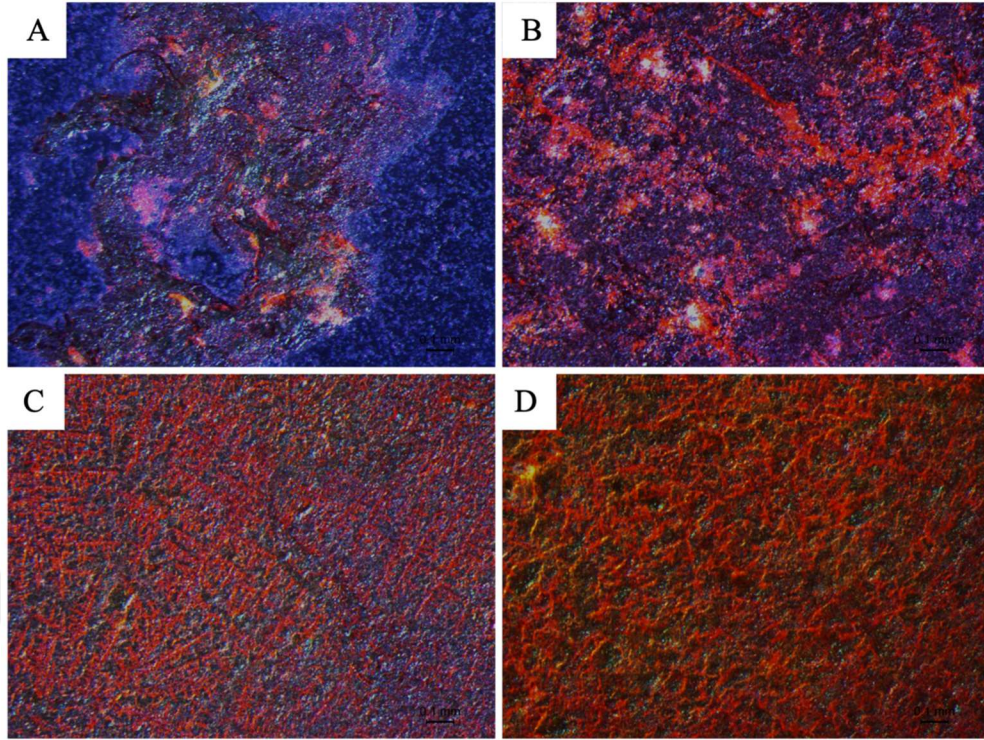
Üç hafta süren kültürden elde edilen HDM'lerde en az boyama triton X100/amonyum hidroksit grubunda görülürken, kontrol grubuna en yakın görüntü EDTA grubunda elde edilmiştir (Şekil 4.13). Ayrıca kontrol grubunda gözlenen ağ benzeri fibriler yapı en iyi EDTA grubunda korunmuştur. Dondurma/çözme grubunda kontrol grubuna benzer bir dağılım söz konusu olsa da bazı alanlarda kolajen olmadığı belirlenmiştir.



**Şekil 4.13** Üç hafta kültür sonrası elde edilen HDM'lerin sirius red boyama görüntüleri (A: Triton X100/amonyum hidroksit, B: Dondurma/ ozme, C:EDTA, D:Kontrol).

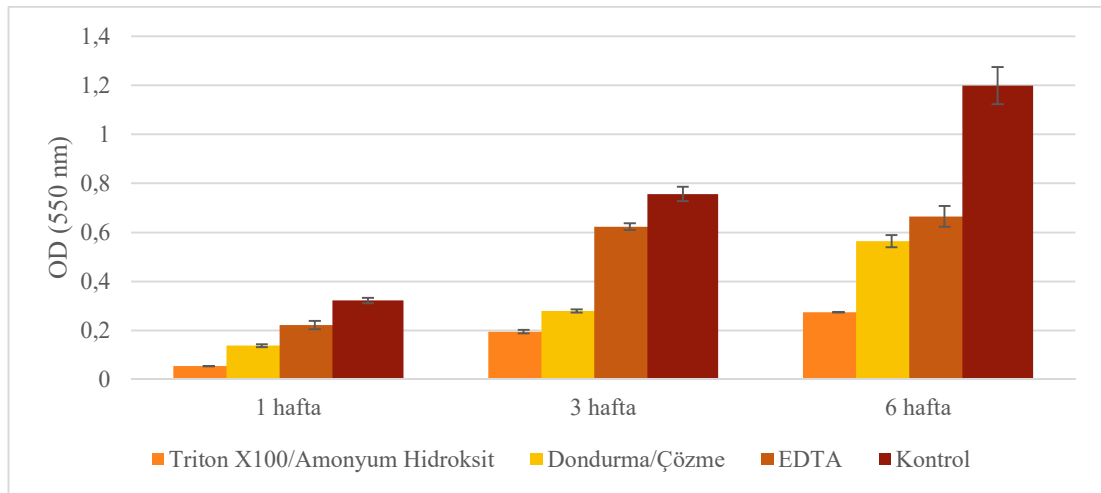
Altı haftalık gruplarda ise daha kısa süreli kültürlere göre daha yoğun boyama gözlenmiştir (Şekil 4.14). Triton X100/amonyum hidroksit grubu diğerlerine göre daha az boyanmıştır. Boya dağılımına bakıldığında kontrol grubuna en yakın yapı yine EDTA grubunda görülmüştür. Triton X100/amonyum hidroksit ve dondurma/ ozme gruplarında kolajen dağılımının daha çok belirli bölgelerde toplandığı belirlenmiştir.

Kültür süreleri birbiri ile karşılaştırıldığında ise bir haftalık gruplardaki boyamanın miktarı daha uzun süreli kültürlere göre daha az olduğu gözlenmiştir. Elde edilen protein miktarının bir haftalık kültürlerde anlamlı derecede az olduğu BCA analizi ile de belirlenmiştir. Aynı şekilde kolajen miktarının da az olduğu sirius red boyaması ile görsel olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.14** Altı hafta kültür sonrası elde edilen HDM'lerin sirius red boyama görüntüleri (A: Triton X100/amonyum hidrosit, B: Dondurma/çözme, C:EDTA, D:Kontrol).

Preparatlardaki boyalar çözdürülmüş ve 550 nm dalga boyunda ölçüm alınarak gruplar birbiri ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.15). Kültür süresi uzadıkça elde edilen kolajen miktarının arttığı gösterilmiştir. EDTA uygulamasının tüm haftalarda matriks yapısındaki kolajen miktarının korunmasında en hassas yöntem olduğu belirlenmiştir ( $p<0,01$ ).



**Şekil 4.15** Sirius red boyamalarının spektrofotometrik ölçümleri.

Triton X100/amonyum hidroksit ve dondurma/çözme arasındaki fark tüm hafta gruplarında anlamlı bulunmuştur ( $p<0,01$ ). Hücrelerin uzaklaştırılmasında yakın sonuçlar elde ettiğimiz bu iki grupta elde edilen dHDM yapısındaki kolajen miktarı dondurma/çözme yönteminde daha iyi korunmuştur.

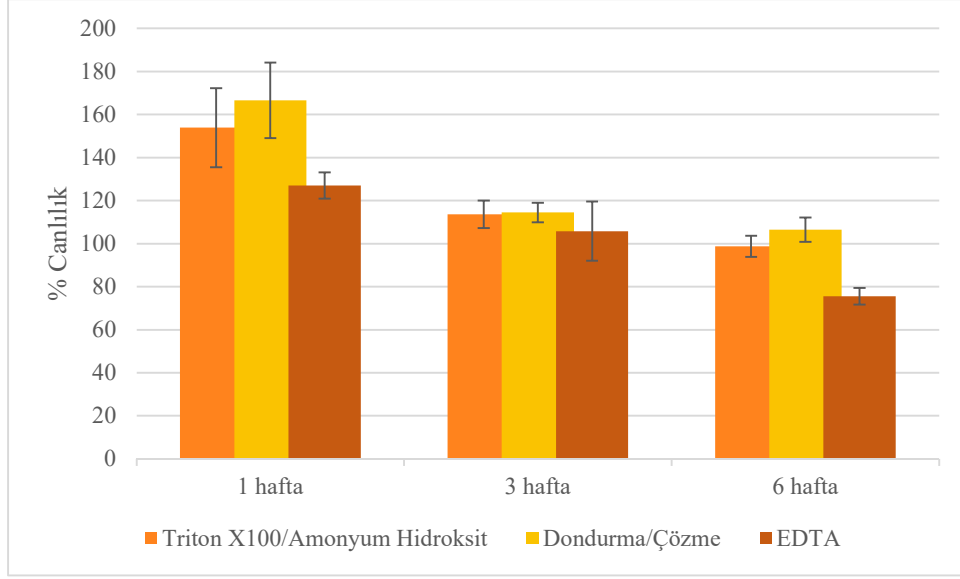
Kolajen gibi makromoleküller, büyük olmaları ve molekül içi çapraz bağa sahip olmaları nedeniyle hücresizleştirmeden sonra yapıda kalırlar. Ancak hücresizleştirme sırasında deterjan, enzimatik reaktifler ve sonikasyon vb tekniklerin kullanımı nedeniyle kolajen lifleri zarar görebilmektedir [120].

#### **4.6 HDM'lerin Sitotoksik/Genotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi**

##### **4.6.1 Sitotoksitenin değerlendirilmesi**

HDM kaplı yüzeylerde 24 saat süre ile kültürü yapılan hücrelerde MTT analizi gerçekleştirilmiş ve kontrol grubuna göre canlılık oranı hesaplanmıştır (Şekil 4.16). Triton X100/amonyum hidroksit uygulaması ile elde edilen dHDM'ler bir ve üç haftalık gruplarda hücre canlılığını anlamlı derece artırmıştır (1 hafta  $p$  değeri  $<0,001$ ; üç hafta  $p$  değeri  $<0,05$ ). Altı haftalık kültür dHDM'leri ise fibroblast canlılığı üzerinde anlamlı bir fark yaratmamıştır. Kontrol grubuna göre canlılık oranı %98 olarak hesaplanmıştır.

Dondurma/çözme sonrası elde edilen dHDM'ler tüm hafta gruplarında hücre canlılığını artırmıştır. Bu artış bir ( $p<0,001$ ) ve üç haftalık ( $p<0,01$ ) kültürlerde istatistiksel olarak anlamlı iken altı haftalık kültürde anlamlı bulunmamıştır. Altı haftalık kültür dHDM'sinde hesaplanan canlılık oranı ise %105 olmuştur.

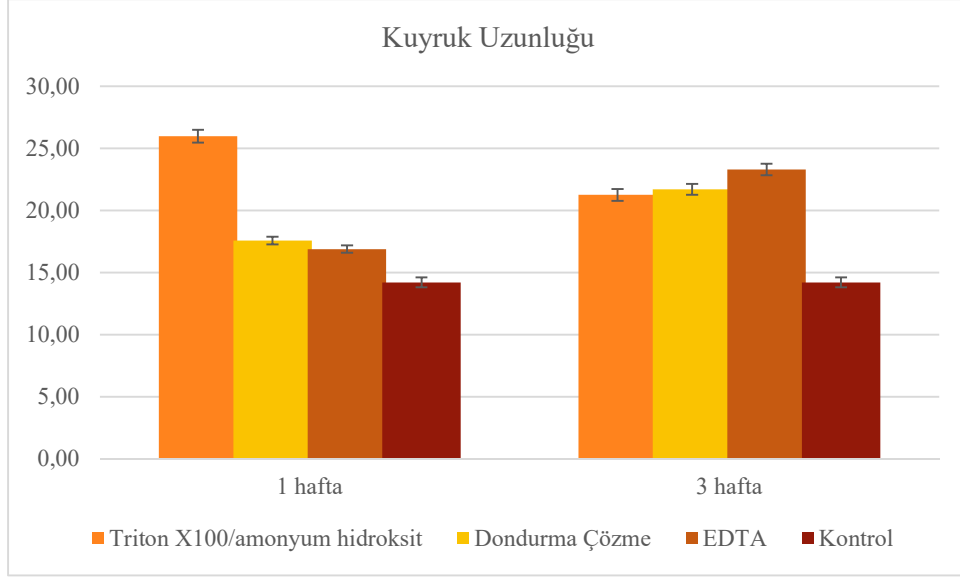


**Şekil 4.16** HDM kaplı yüzeylerde 24 saat kültür edilen hücrelerin MTT canlılık analizi sonuçları.

EDTA grubu bir haftalık dHDM'leri hücreleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede desteklemiştir ( $p < 0,01$ ). Aynı grupta üç haftalık kültür dHDM'lerinin hücreler üzerindeki etkisi anlamlı bulunmamıştır. Altı haftaya gelindiğinde ise hücre miktarında anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ( $p < 0,01$ ). Kontrol grubuna göre canlılık oranı %75 olarak hesaplanmıştır.

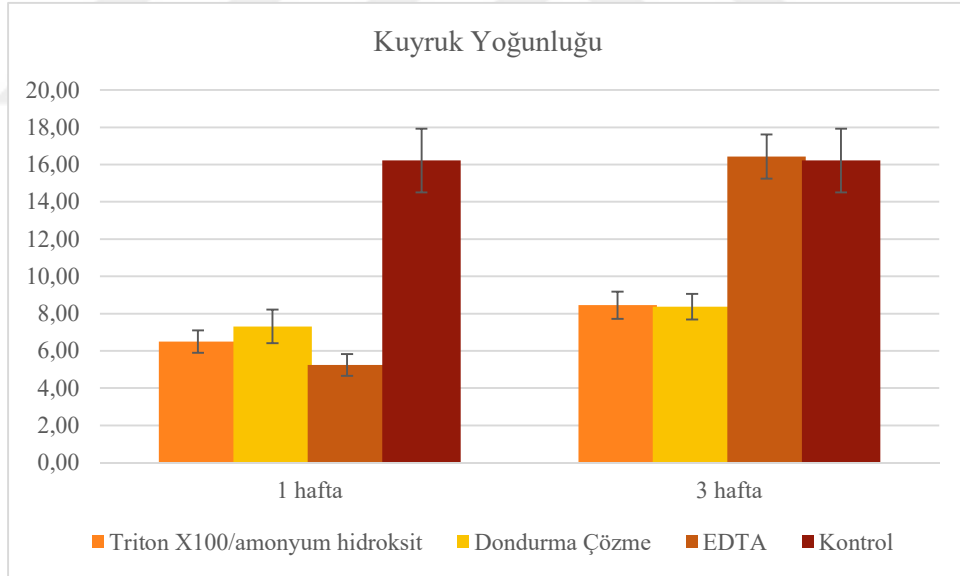
#### 4.6.2 Genotoksisitenin değerlendirilmesi

HDM'lerin fibroblastlar üzerindeki genotoksik etkileri tek ve çift zincir kırıklarının tespitinde kullanılan comet testi yapılarak analiz edilmiştir. Çalışmada bir ve üç haftalık kültürlerden elde edilen HDM'ler kullanılmıştır. Standart kültür kabı yüzeyinde kültür edilen hücreler ile karşılaştırıldığında HDM gruplarının kuyruk uzunluğu değerlerinde anlamlı derecede artış olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.17). DNA hasarının doğrudan ölçülmesini sağlayan comet testi kuyruk uzunluğu sonuçlarına bakıldığında hücresizleştirme sonrasında HDM yapısında kalmış olabileceği düşünülen kimyasal ya da DNA ve hücre kalıntılarının hücreler üzerinde toksik etki gösterebileceği düşünülmektedir.



**Şekil 4.17** HDM üzerinde bir gün kültür edilen hücrelerin comet analizi sonuçları.

Comet testi kuyruk yoğunluğu değerleri incelendiğinde bir haftalık kültürlerden elde edilen HDM gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşüş olduğu görülmektedir ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.18).



**Şekil 4.18** HDM üzerinde bir gün kültür edilen hücrelerin comet analizi sonuçları.

Üç hafta gruplarında HDM kaplı yüzeylerde kültür edilen hücrelerin kuyruk yoğunluğu karşılaştırıldığında EDTA ile hücresizleştirme işlemi gerçekleştirilen grupta anlamlı derecede artış meydana gelmiştir.

EDTA grubunun bir ve üç haftalık kültür sonuçlarında meydana gelen artışın kültür süresi uzadıkça hücresizleştirme etkinliğinin düşmesi ile ilişkili olabileceği

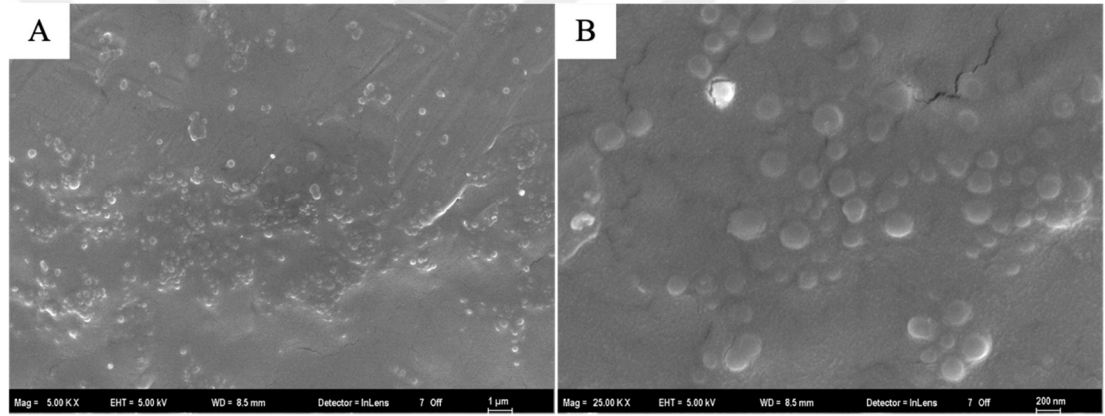
düşünülmektedir. EDTA ile hücresizleştirme tekniğinde kültür süresinin uzamasının hücrelerin uzaklaştırılma oranında düşüğe neden olduğu DNA izolasyonu ve ölçümü çalışmalarında gösterilmiştir.

#### 4.7 Antibiyotik Yüklü Jelatin Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Jelatin nanopartiküller nanopresipitasyon yöntemi ile üretilmiştir. Jelatin nanopartiküller liyofilize edildikten sonra gentamisin ile yüklenerek hazırlanmıştır.

##### 4.7.1 SEM analizi ve boyut ölçümü

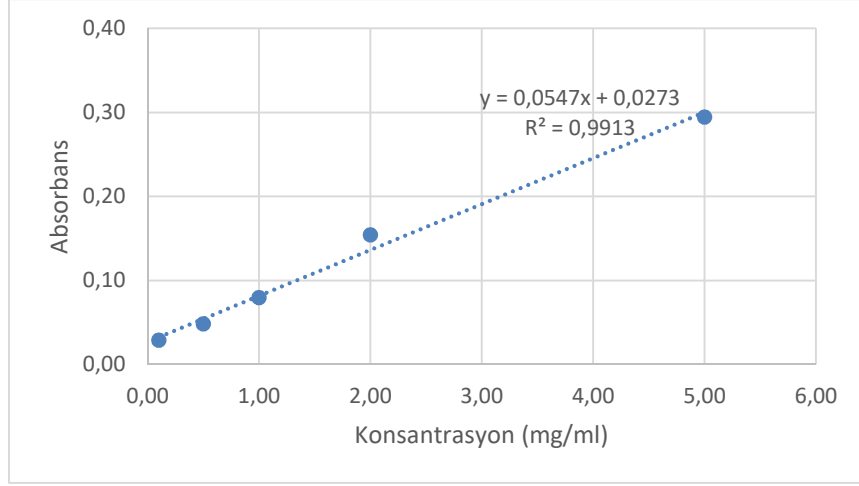
SEM görüntülerinde jelatin nanopartiküllerin küresel formda ve nano boyutta olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19). Partikül boyutları  $169 \pm 42$  nm olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.19 Jelatin nanopartiküllere ait SEM görüntüleri.

##### 4.7.2 Jelatin nanopartiküllere antibiyotik yüklenmesi

Gentamisin konsantrasyonlarının en yüksek absorbands değeri verdiği 285 nm'de yapılan ölçümler ile kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir (Şekil 4.20).



**Şekil 4.20** Gentamisine ait, 285 nm dalgaboyunda alınan ölçümler ile elde edilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi.

Nanopartilüllerin gentamisin yükleme yüzdesi, metot bölümünde verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır. Kalibrasyon doğrusu ve denklemi aracılığıyla enkapsülasyon verimi %11,2 olarak, yükleme kapasitesi 0.093 mg gentamisin/mg kuru partikül olarak belirlenmiştir.

#### 4.8 HDM Katkılı PVA-Gel-Cs-GelNP Hidrojellerin Hazırlanması

Enjekte edilebilir, *in vivo* jel oluşturabilen ya da üç boyutlu biyobaskı ile yapı iskelesi olarak kullanılabilen hidrojeller biyomedikal amaçlarla sıklıkla kullanılmaktadır. Hücresizleştirilmiş dokuların genellikle enzim kullanılarak çözünmesinin ardından fiziksel çapraz bağlanma ya da kolajen liflerinin birleşmesi ile hidrojel üretimi gerçekleştirilmektedir. Hücre kaynaklı HDM ile hidrojel üretimi geleneksel olarak uygulanan doku deselülarizasyonuna bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Hücresel dHDM'nin kültür koşullarına bağlı olarak protein bileşimi ya da sertlik gibi mekanik özellikleri değişkenlik gösterebilmektedir [121]. Çalışmamızda fibroblast kültüründen farklı teknikler ile elde edilen dHDM'ler hidrojel içinde katkı malzemesi olarak kullanılmıştır.

HDM katkılı ve katkısız kontrol grubu hidrojelleri hazırlanıp, liyofilize edilmiştir (Şekil 4.21). Hidrojel karakterizasyonu testlerinde kurutulmuş hidrojeller; biyoyumluluk, *in vitro* yara iyileşme testi ve antimikrobiyal aktivite analizlerinde hidrojellerin ekstrakt çözeltileri kullanılmıştır.



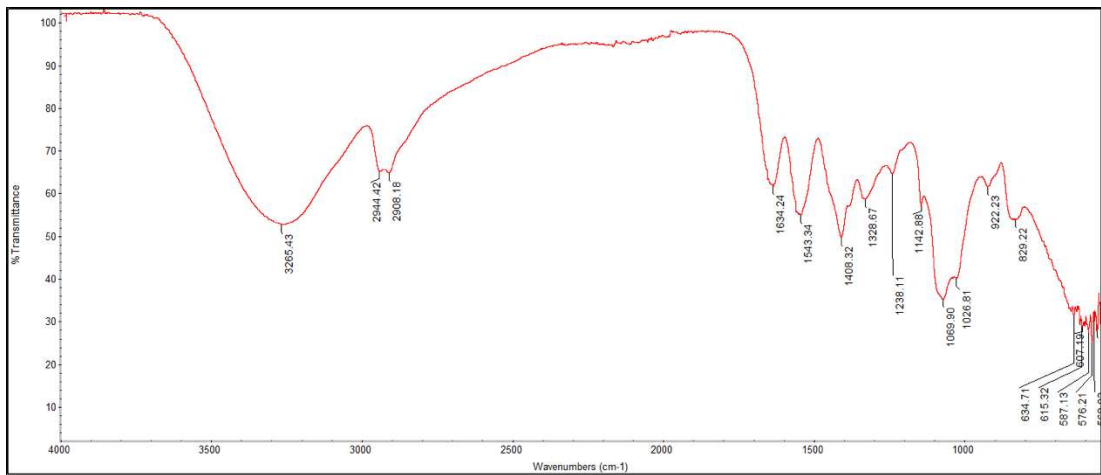
Şekil 4.21 HDM katkılı ve katkısız hidrojellerin kurutmadan sonraki görünüşleri.

## 4.9 Hidrojel Karakterizasyonu

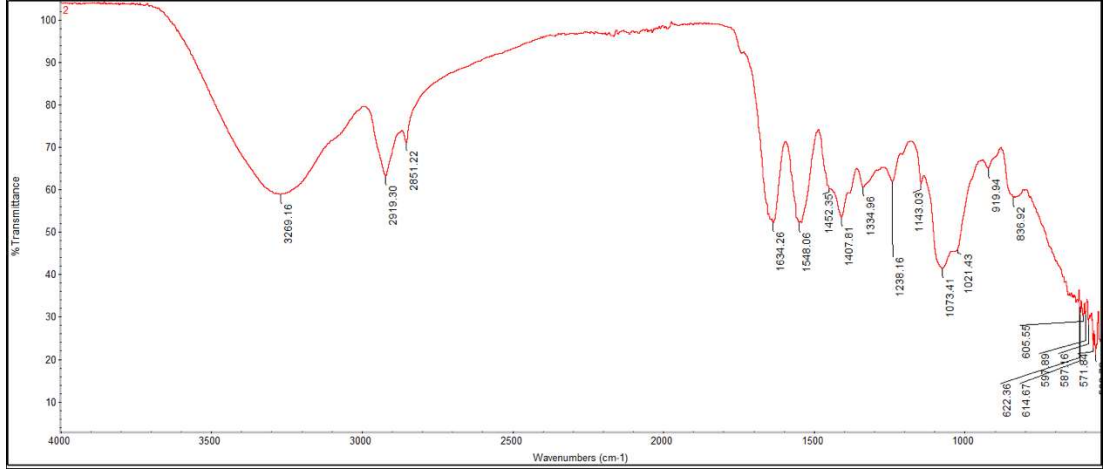
### 4.9.1 FTIR analizi

Hidrojellerin sahip oldukları karakteristik grupların moleküler yapıları FTIR analizi ile incelenmiştir (Şekil 4.22-4.26). FTIR spektrumları incelendiğinde tüm hidrojeller kolajen parmak izinin üç ana bandına yakın amid titreşimlerini ortaya çıkarmıştır. Bunlar; karbonil gerilmesinden kaynaklanan amid I ( $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ ), N-H düzlem içi bükülme ve C-N gerilme titreşimlerinin birleşiminden kaynaklanan amid II ( $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$ ) ve C-N gerilme titreşimleri ve N-H bükülmesinin birleşiminden kaynaklanan amid III ( $\sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ ) bantları ile gözlenmiştir [109,122].

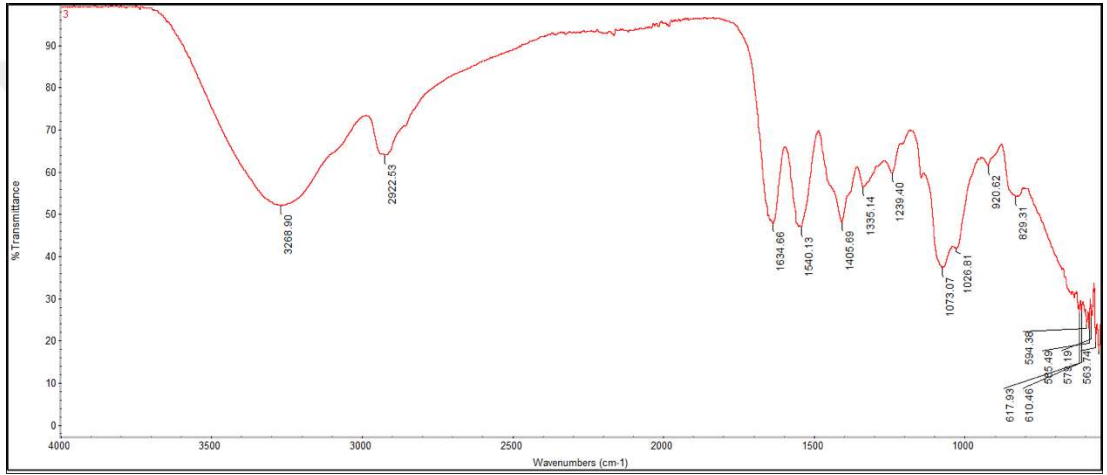
$1635 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen bant ayrıca, PVA'nın asetat grubunun C-O gerilmesine karşılık gelmektedir.  $2910 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bant, omurga alifatik C-H'nin gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır [99].



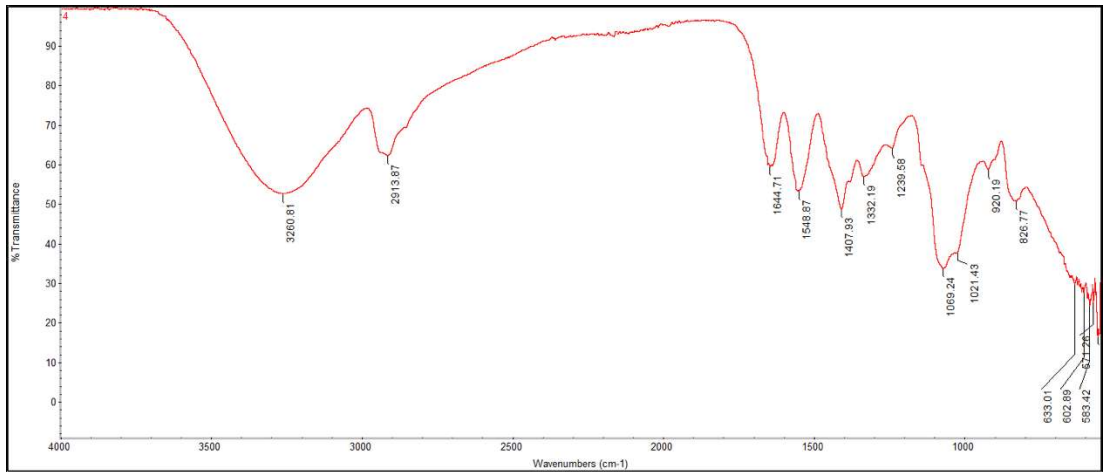
Şekil 4.22 Hidrojel 1'e ait FTIR spektrumu.



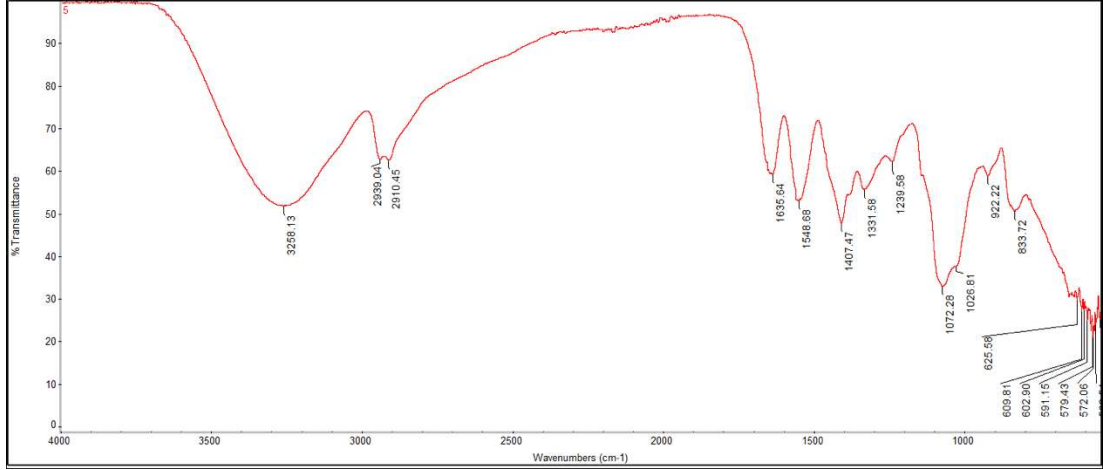
Şekil 4.23 Hidrojel 2'ye ait FTIR spektrumu.



Şekil 4.24 Hidrojel 3'e ait FTIR spektrumu.



Şekil 4.25 Hidrojel Kontrol'e ait FTIR spektrumu.

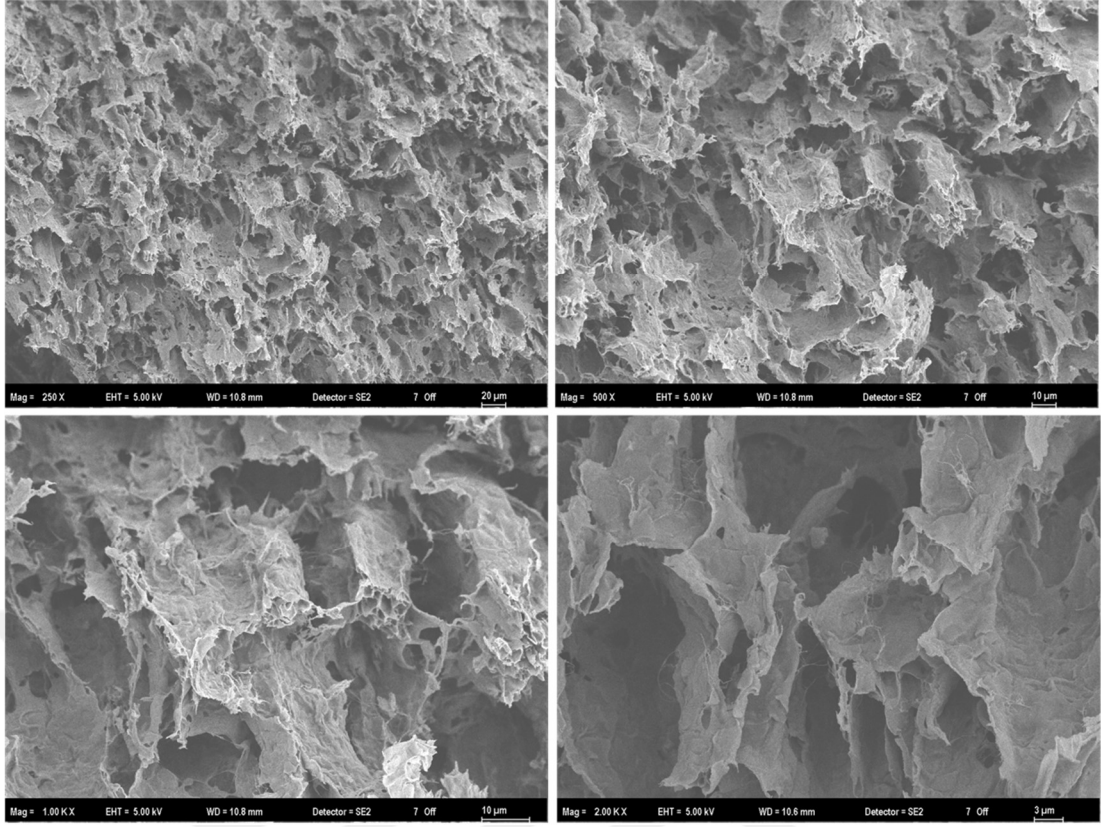


Şekil 4.26 Hidrojel Katkısız'a ait FTIR spektrumu.

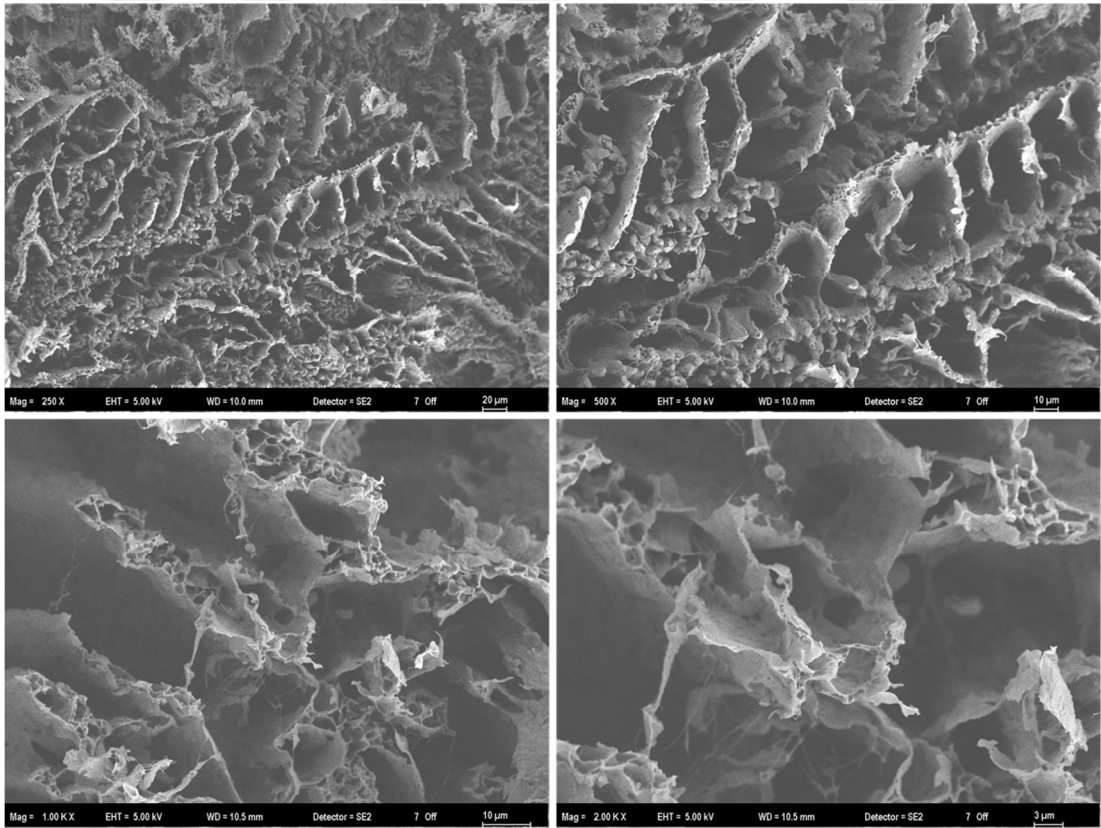
#### 4.9.2 SEM analizi

Hidrojellerin fiziksel özelliklerinin incelenmesi amacıyla SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.27-4.31). Hazırlanan hidrojel gruplarının her birinin gözenekli yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. SEM analizi hazırlık sürecinde hidrojellerin liyofilizatörde kurutulması aşamasında hidrojel yapısındaki proteinlerin bir miktar çökmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle SEM görüntüleri, üç boyutlu yapıyı tam olarak yansıtmayabilir.

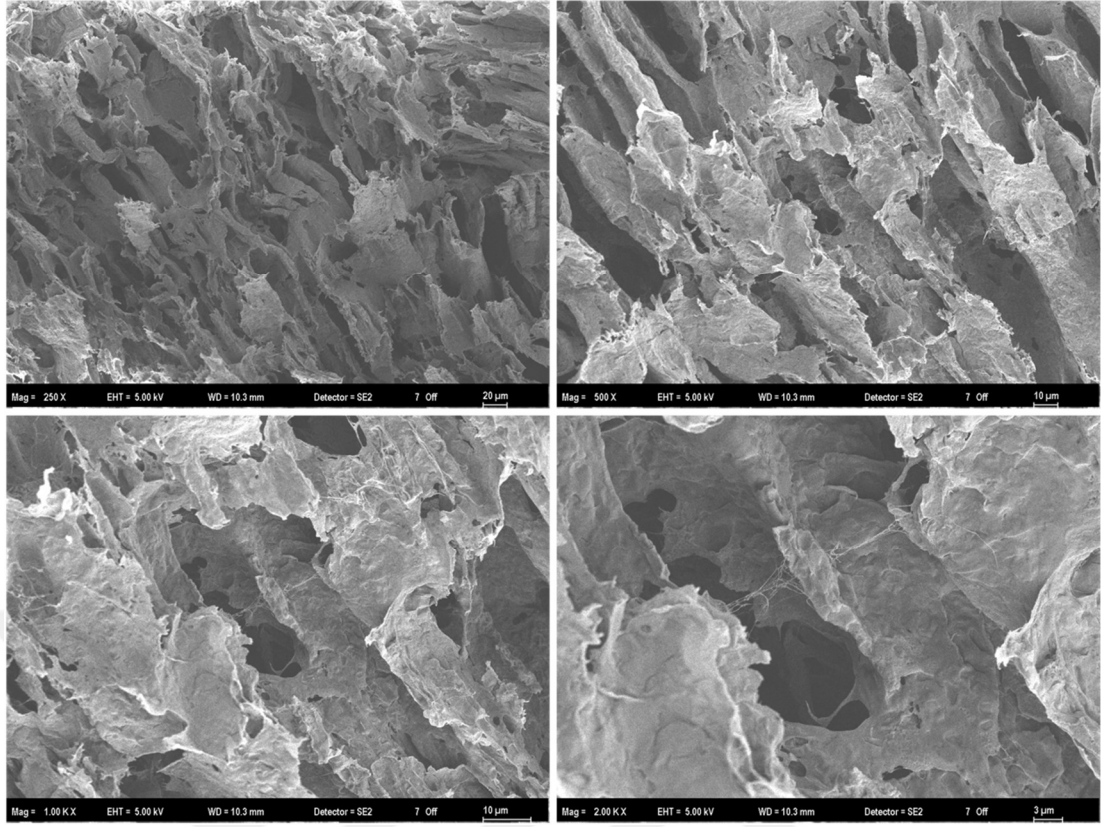
SEM görüntülerinde tüm hidrojeller, heterojen gözenek boyutuna sahip üç boyutlu bir ağ yapısına sahiptir. Ancak katkısız, nanopartikül katkılı ve hem nanopartikül hem dHDM katkılı olarak üretilen hidrojellerin gözeneklilik oranlarında farklılıklar oluşmuştur.



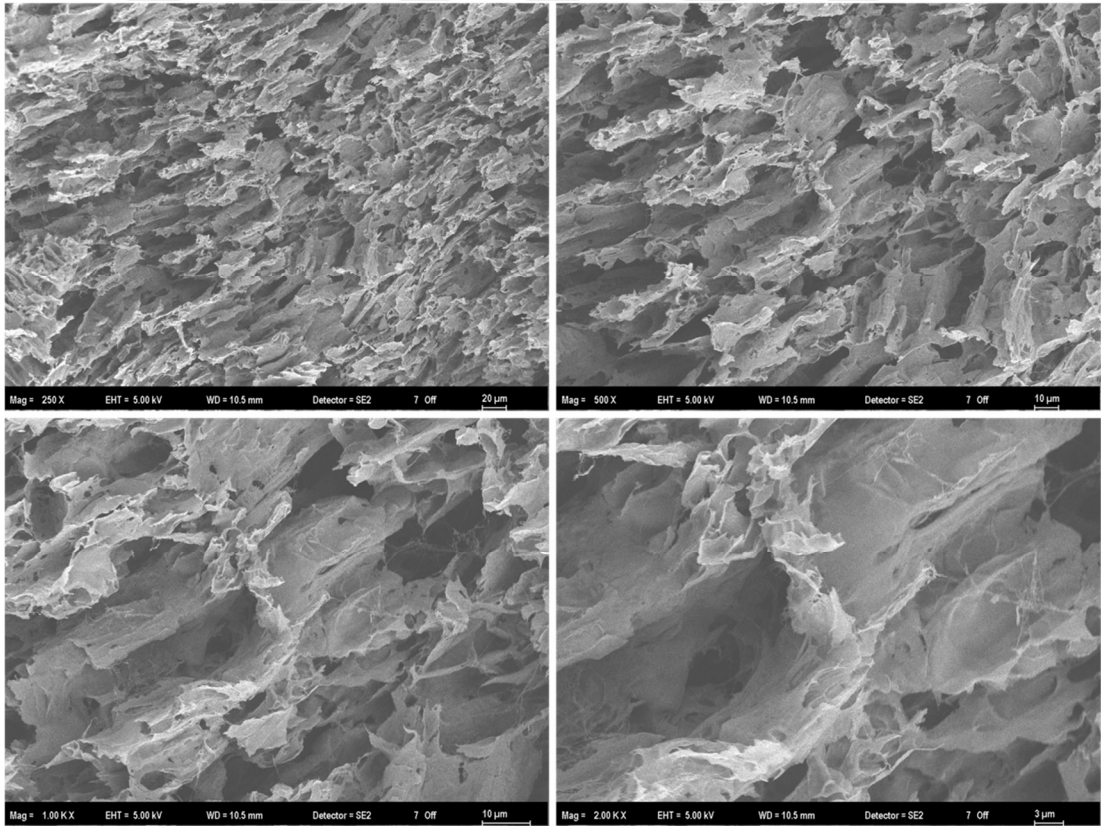
Şekil 4.27 Hidrojel-1'e ait SEM görüntüsü.



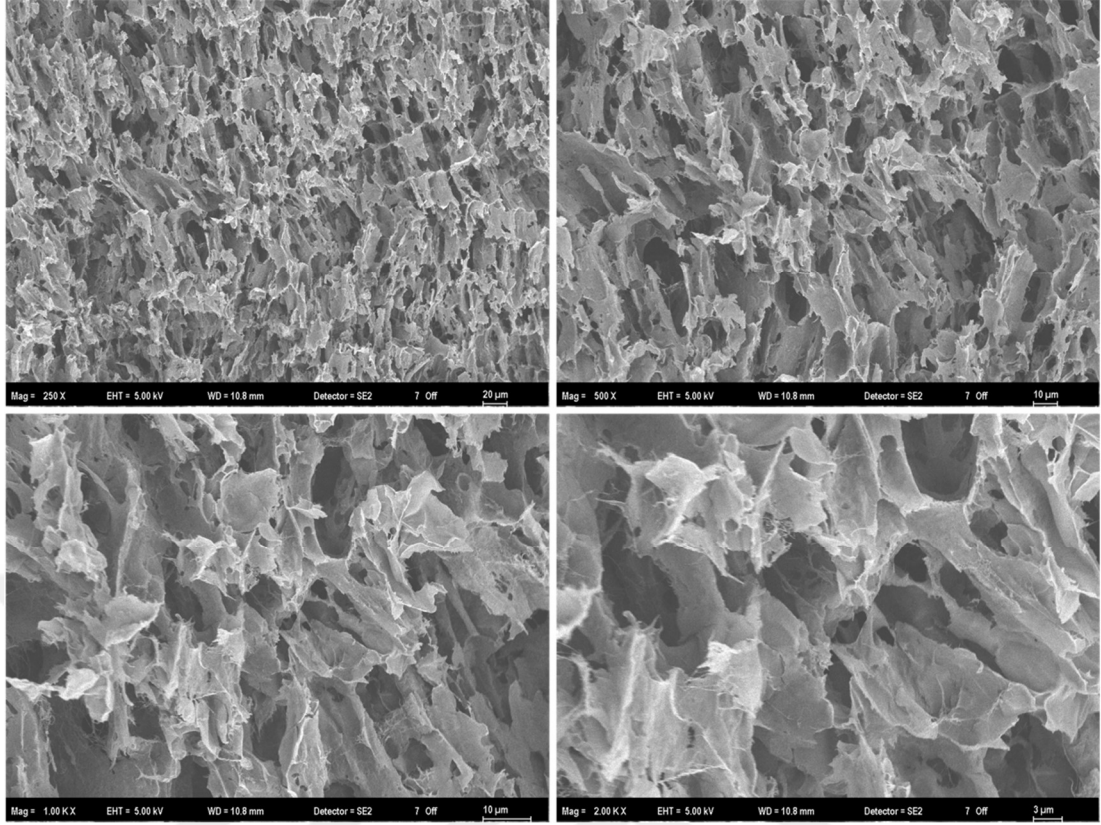
Şekil 4.28 Hidrojel-2'ye ait SEM görüntüsü.



Şekil 4.29 Hidrojel-3'e ait SEM görüntüsü.



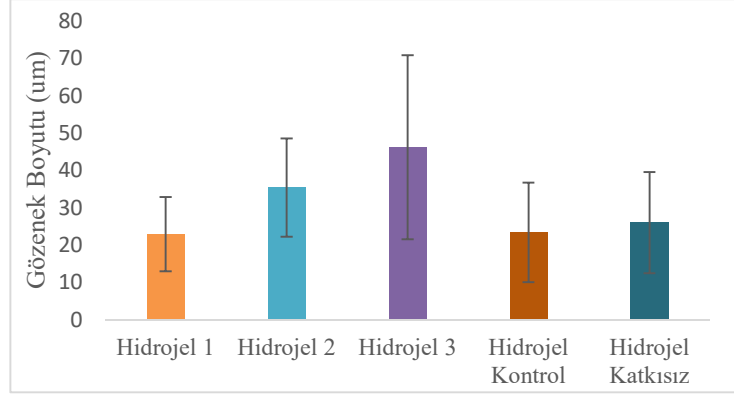
Şekil 4.30 Kontrol hidrojele ait SEM görüntüsü.



**Şekil 4.31** Katkısız hidrojele ait SEM görüntüleri.

Dondurma çözme yöntemi ile elde edilen dHDM içeren hidrojel 2'nin diğer örneklere göre yapısal farklılıklar göstermiştir. Petek görüntüsündeki gözenekli yapıların Sallehuddin ve ark. tarafından üretilen kolajen-jelatin-elastin yara örtülerine ait SEM görüntüleri ile benzerlik gösterdiği düşünülmektedir [123]. Hidrojel üretiminde eşit miktarda jelatin kullanılmıştır. dHDM yapısında ölçülen kolajen miktarı dondurma-çözme yönteminde Triton X100/amonyum hidroksit grubu ile benzerlik göstermiştir. Kolajen miktarı EDTA ile hücreleştirilen matrikste diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle hidrojel 2 yapısında belirlenen bu farklılığın, HDM yapısında bulunan elastin miktarındaki farklılıktan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle dHDM içeriğinin ayrıntılı analizinin yapılması gelecek çalışmalar için kritik önem taşımaktadır.

Gözenek boyutlarına bakıldığında tüm hidrojellerde heterojen bir yapı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.32). Hidrojel 1, hidrojel kontrol ve hidrojel katkısız grupları yakın gözenek çapına sahiptir. En büyük gözenek boyutu ise hidrojel 2'de ölçülmüştür.



**Şekil 4.32** Hidrojellerin ortalama gözenek boyutları.

#### 4.9.3 Çekme-basma testi

Yara örtüsü olarak tasarlanan hidrojellerin mekanik özellikleri yara pansumanı için önemli gereksinimlerden biridir. Hidrojel örtü yara pansumanı yapılırken cilt yüzeyine kapanır, dolayısıyla uzatılıp gerildiğinde kolay yırtılmamalıdır. Bu nedenle hidrojellerin mekanik özellikleri çekme ve basma testleriyle analiz edilmiştir.

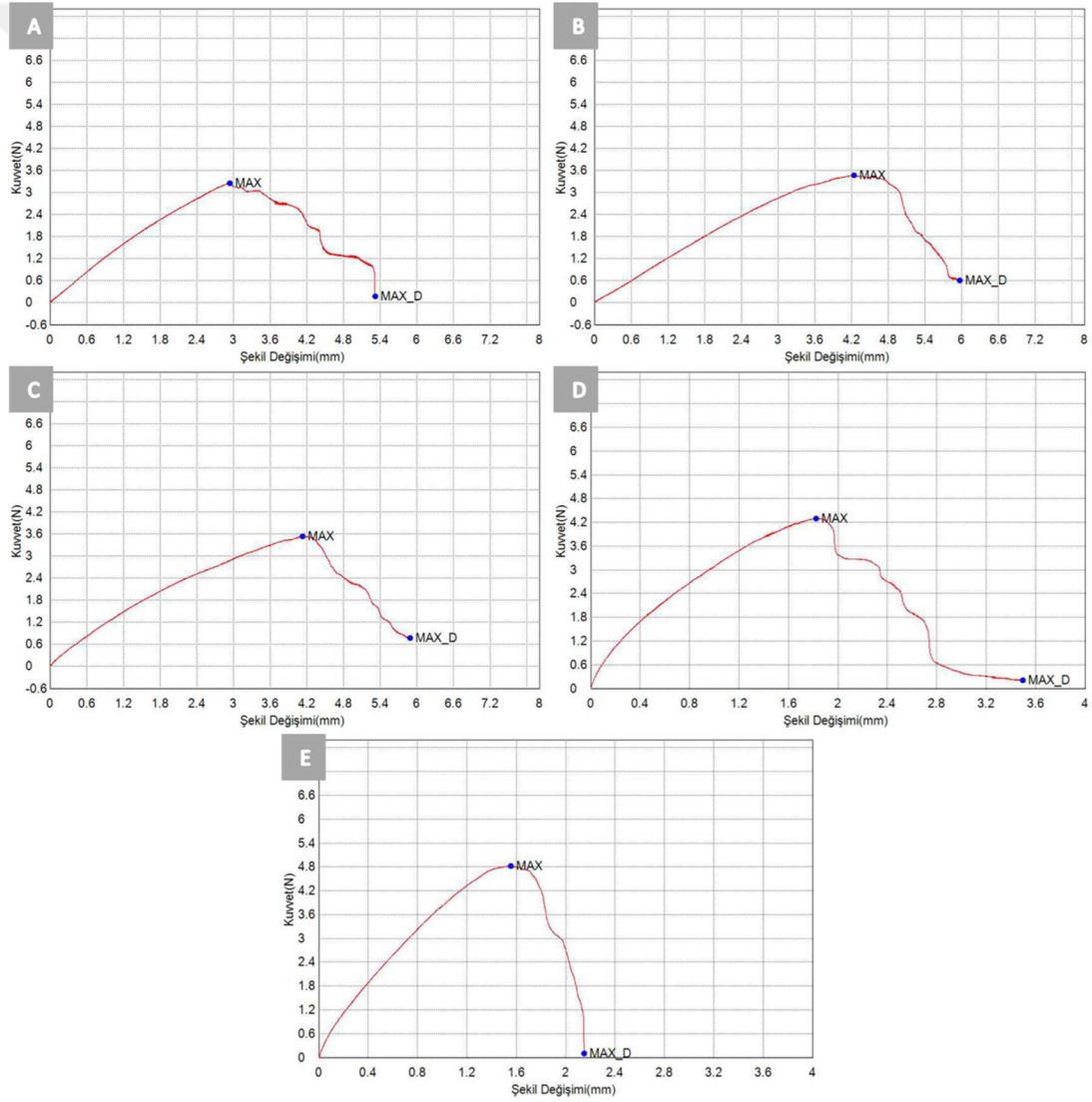
Fan ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan çalışmada bu tez çalışmasında olduğu gibi CS/Gel/PVA hidrojeller hazırlanmış ve PVA ile karıştırılan farklı CS/Gel oranlarındaki gerilme mukavemeti değerlendirilmiştir. Bu çalışmada çekme mukavemetinin CS/Gel oranı 1:3 olduğunda 2,2 MPa'da en yüksek değere ulaştığı bildirilmiştir. Gel/PVA hidrojel ile karşılaştırıldığında ise CS/Gel/PVA hidrojelin gerilme mukavemetinin arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, CS/Gel'in ağırlık oranının artmasıyla hidrojelin gerilme mukavemetinin ve uzamasının azaldığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar bunun nedenini kendi çalışmalarında hidrojel hazırlamaları sırasında kullanılan gama ışınlama sürecinde kitosan ilavesiyle polimer moleküllerinin çapraz bağ yoğunluğu artmasına ve bunun da hidrojelin mekanik özelliklerini etkili bir şekilde geliştirdiği şeklinde açıklamışlardır. Böylece çekme mukavemeti belli bir dereceye kadar artmıştır. CS/Gel ağırlık oranının artmasıyla hidrojelin sertliği artar, hidrojel kırılğan hale gelir ve bu da çekme mukavemetinin azalmasına neden olur [99].

Hidrojel yapısına nanopartikül ilave edildiğinde elastik modülün neredeyse yarıya düştüğü belirlenmiştir (Şekil 4.33). Jelatin nanopartiküllerin eklenmesi ile hidrojel daha az kırılğan hale gelmiştir.

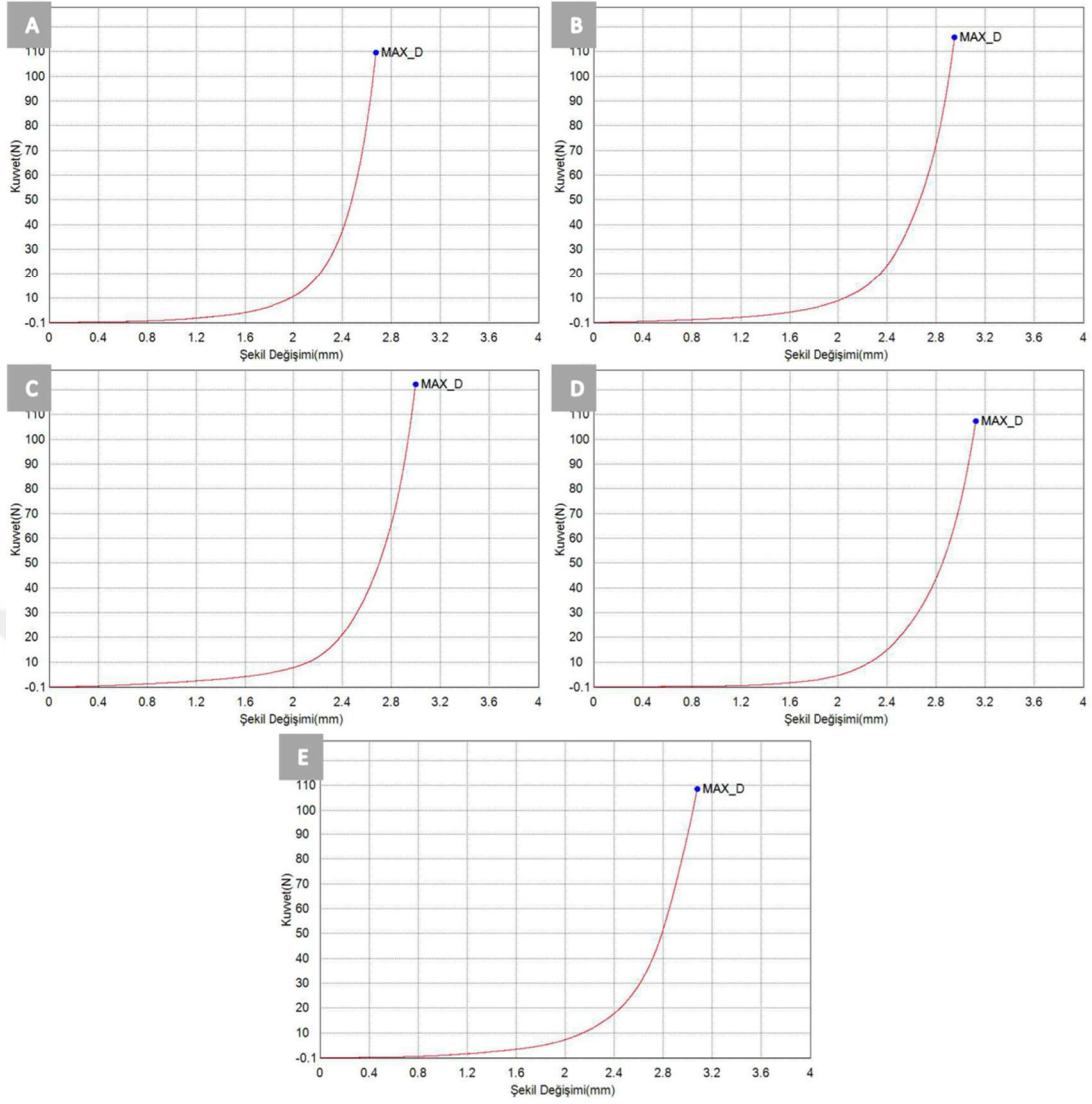
**Çizelge 4.4** Hidrojellerin elastisite modülü ve basma dayanımı ölçüm sonuçları.

	Elastisite Modülü (MPa)	Basma Dayanımı (MPa)
<b>Hidrojel 1</b>	0,022	0,11
<b>Hidrojel 2</b>	0,021	0,12
<b>Hidrojel 3</b>	0,022	0,13
<b>Hidrojel Kontrol</b>	0,045	0,11
<b>Hidrojel Katkısız</b>	0,082	0,11

dHDM ilavesi ise hidrojellerin elastikiyetini daha da artırmıştır. HDM katkılı gruplar arasında bir fark gözlenmemiştir (Çizelge 4.4). Basma dayanımları ise benzer sonuçlar vermiştir (Şekil 4.34). Katkısız hidrojelin elastik modül değerindeki belirgin artış mekanik dayanımın daha yüksek olduğunu göstermektedir.



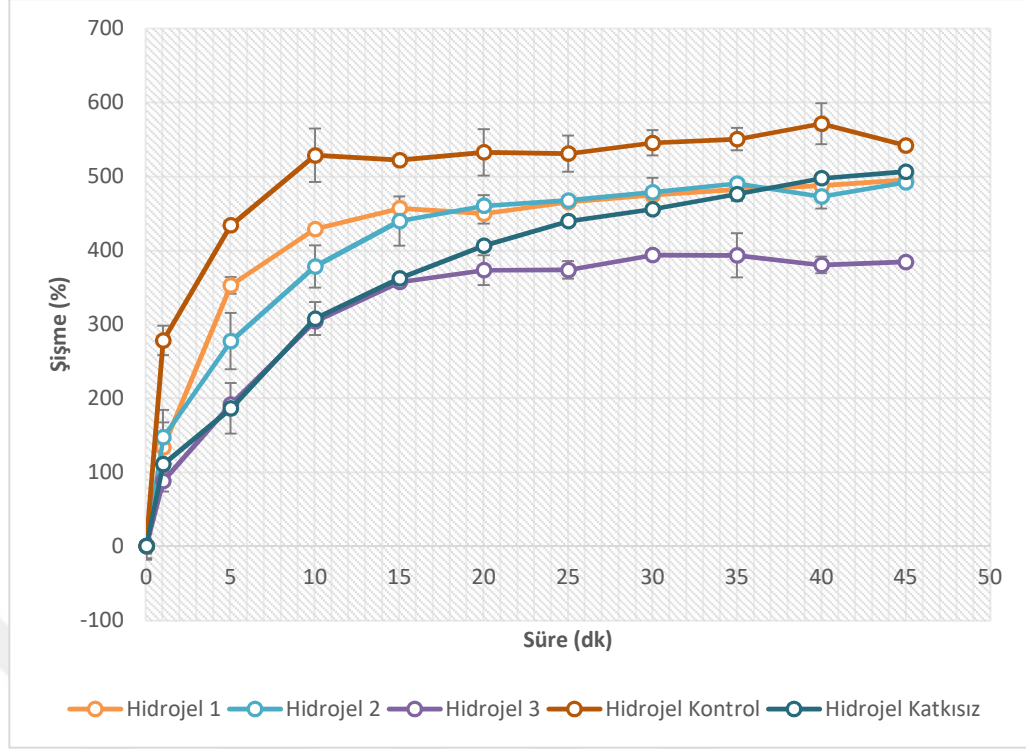
**Şekil 4.33** Hidrojellerin çekme testi, kuvvet-uzama grafikleri (A: Hidrojel 1, B: Hidrojel 2, C: Hidrojel 3, D: Hidrojel Kontrol, E: Hidrojel Katkısız).



**Şekil 4.34** Hidrojellerin basma testi, kuvvet-uzama grafikleri (A: Hidrojel 1, B: Hidrojel 2, C: Hidrojel 3, D: Hidrojel Kontrol, E: Hidrojel Katkısız).

#### 4.9.4 Şişme testleri

Şişme testleri, katkısız hidrojel, GelNP katkılı hidrojel ve ECM ile GelNP katkılı hidrojeller kullanılarak yapılmıştır (Şekil 4.35). Kullanılan katkıların hidrojellerin zamana bağlı şişme davranışını değiştirdiği belirlenmiştir. Hidrojel yapısına nanopartikül ve dHDM katkıları eklendiğinde şişme oranları düşmüştür.



**Şekil 4.35** Hidrojellerin şişme testi sonuçları.

En yüksek şişme değerinin kontrol grubu hidrojelde (%571), en düşük şişme değerinin ise hidrojel 3'te (%393) olduğu görülmüştür. En yüksek şişme değerine en hızlı gelen örnek ise hidrojel 3 olmuştur. Hidrojel 1, hidrojel 2'ye göre daha hızlı şişme göstermekle birlikte dengeye ulaştığında benzer bir davranış göstermiştir.

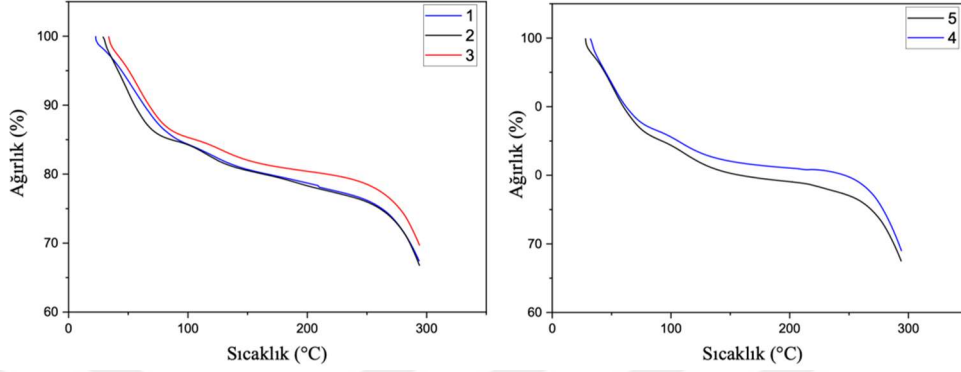
Yarıya giren dHDM şişme oranını azaltmıştır. Bu durum HDM yapısındaki hidrofobik bileşenler (elastin) ile ilişkilendirilebilir. Hidrojel 3'teki azalmanın EDTA grubu dHDM'lerin içeriğindeki yüksek protein oranından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Yara örtülerinin, eksüda emme yeteneğini ölçmek için şişme testleri yapılmaktadır. İdeal yara örtüsü şişme oranlarının %100-900 aralığında olması gerektiği belirtilmektedir [124]. Tüm hidrojel gruplarında belirlenen şişme oranları bu aralığa dahildir.

#### 4.9.5 Termal gravimetrik analiz

Hidrojel ağırlıklarının sıcaklık ve zamana göre değişimi termal gravimetrik analiz ile incelenmiştir (Şekil 4.36). Örneklerde iki ayrı sıcaklıkta bozunma olduğu belirlenmiştir. 50 °C'nin altında su moleküllerine ait bağların yıkımı, 230 °C'de ise kolajen bileşenlerinin degradasyonu gözlenmiştir [122].

dHDM katkılı hidrojellerde Hidrojel 3 daha kararlı bir yapıya sahiptir. HDM içeriğindeki toplam protein miktarının daha fazla olması Hidrojel 3'te yapısal bir destek sağlamış olabilir. Kontrol hidrojel ise katkısız hidrojele göre daha kararlı bir yapı sergilemiştir.

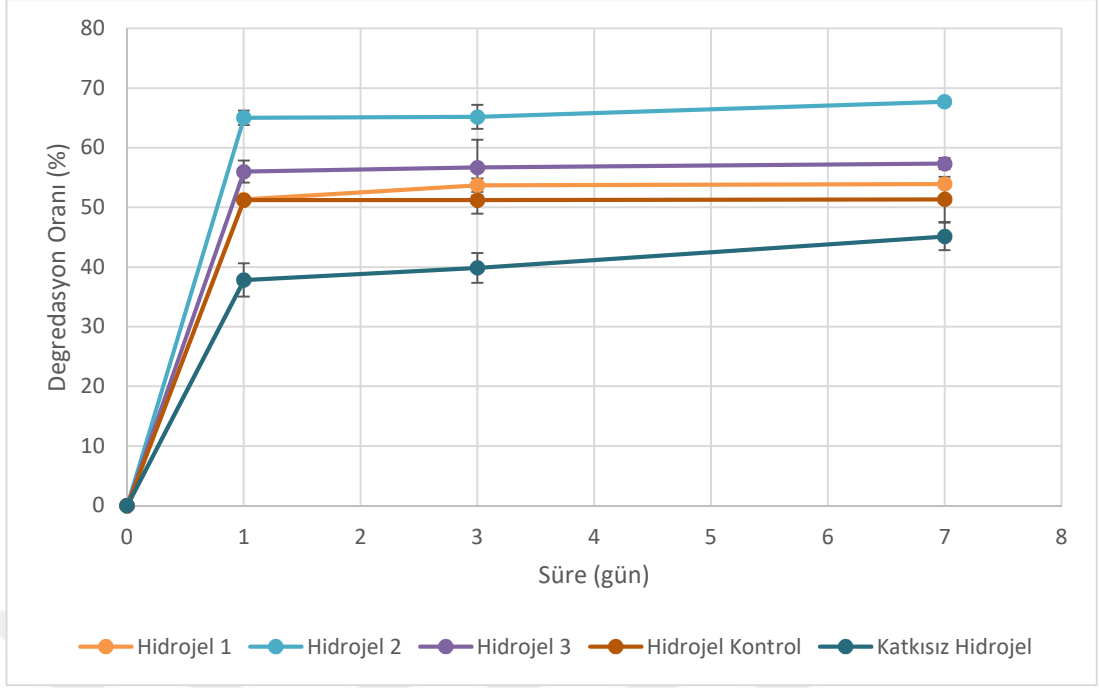


**Şekil 4.36** Hidrojel gruplarının TGA eğrileri (1: Hidrojel 1, 2: Hidrojel 2, 3: Hidrojel 3, 4: Hidrojel kontrol, 5: Hidrojel katkısız).

Tüm hidrojel grupları, küçük farklılıklar olmakla birlikte benzer termal bozunma süreçleri sergilemiştir.

#### 4.9.6 Hidrolitik degradasyon testleri

Hidrolitik degradasyon testinde hidrojellerin 24 saat içerisinde önemli ölçüde degrade olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.37). 24 saat sonunda ağırlık kaybı katkısız hidrojelde en az olurken HDM katkılı hidrojellerde kontrol grubuna göre daha fazla kayıp meydana gelmiştir. Dondurma-çözme yöntemi ile elde edilen dHDM katkılı hidrojel 2 diğerlerine göre daha fazla bozunmuştur. Dondurma-çözme işleminin kolajen ağ yapısının gevşemesine neden olduğu bilinmektedir [125]. Bu durum hidrojel 2'nin daha kolay bozunan bir yapıya sahip olmasını açıklayabilir. Üçüncü ve yedinci günlerdeki bozunma miktarı ise ilk güne oranla oldukça az olmuştur.



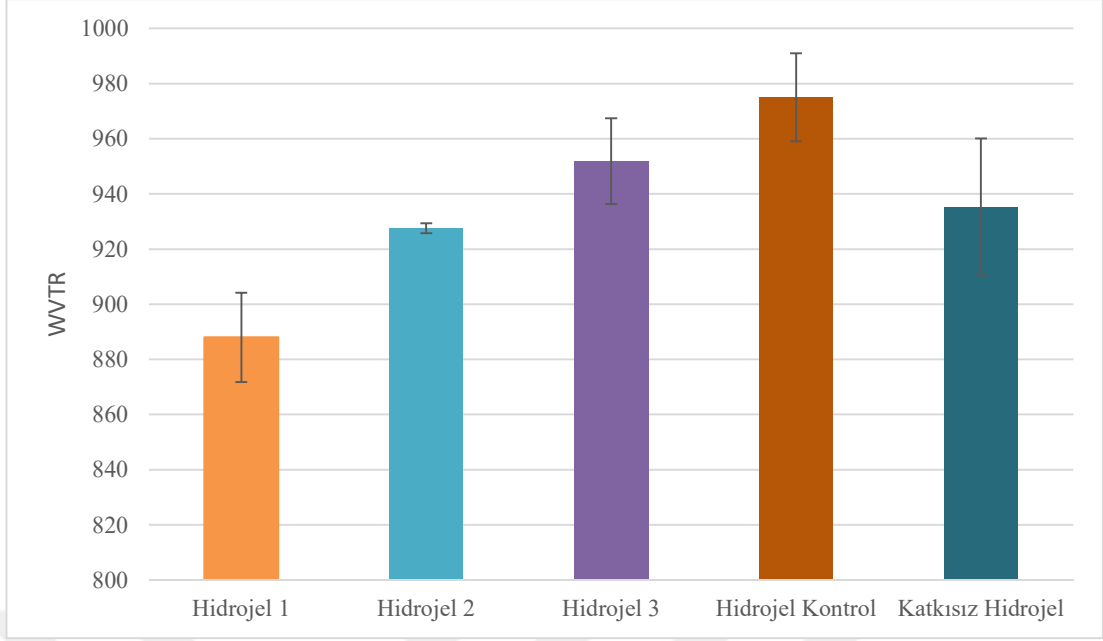
**Şekil 4.37** Hidrojel gruplarının günlere göre degradasyon oranı.

En az bozunma gösteren katkısız hidrojel, kontrol hidrojelden farklı olarak jelatin nanopartikül içermemesi daha az ağırlık kaybı ile ilişkilendirilebilir. Waresindo ve ark., PVA-Gel hidrojelde jelatin oranının artışının daha fazla degradasyona neden olduğu bildirilmiştir [126].

#### 4.9.7 Su buharı geçirgenlik testleri

Hidrojel yara örtülerinin yaranın nem kaybını kontrol etme yeteneğinin ölçülmesi için su buharı geçirgenlik testi gerçekleştirilmiştir. Fazla eksüda yaranın enfekte olmasına ya da iyileşme sürecinin aksamasına neden olabilmektedir.

HDM katkılı ve kontrol grubu hidrojellerin su buharı geçirgenlik testleri 24 saatlik bir analiz ile gerçekleştirilmiş ve WVTR değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.38). dHDM katkısının hidrojellerin su buharı geçirgenlik hızlarını etkilediği belirlenmiştir.



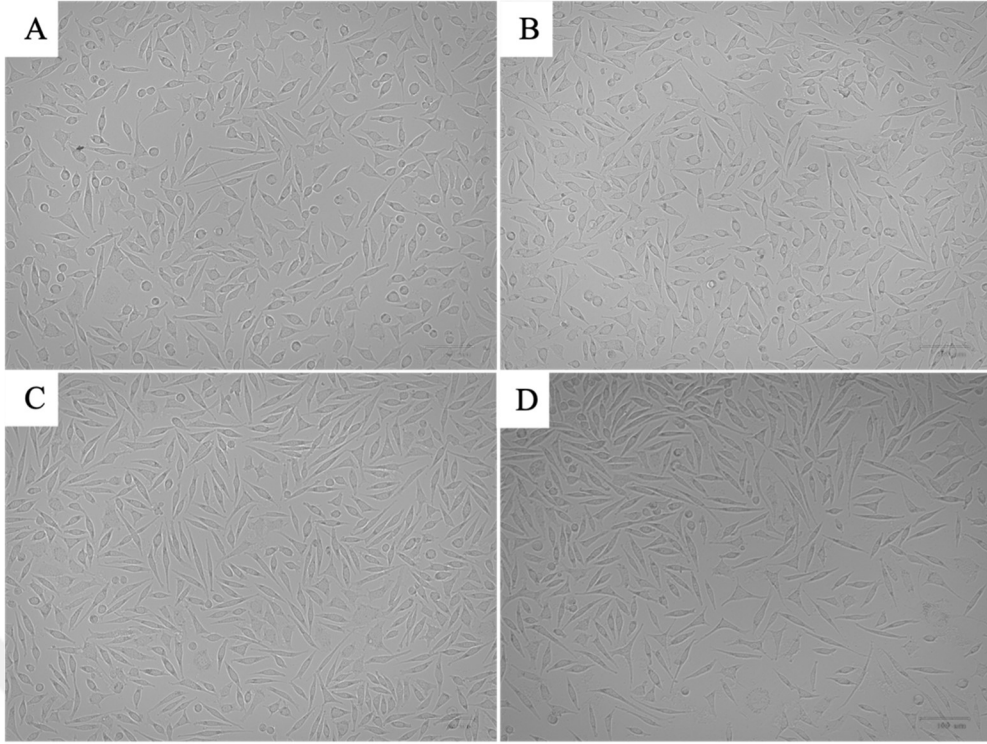
**Şekil 4.38** HDM katkılı ve kontrol grubu hidrojellerin WVTR değerleri.

WVTR değeri HDM katkısız hidrojelde en yüksek iken, triton X100/amonyum hidroksit yöntemi ile elde edilen HDM katkılı hidrojelde (hidrojel 1) en düşüktür. dHDM katkılı hidrojel gruplarındaki su buharı geçirgenlik oranı değişimi, ortalama gözenek boyutu ile aynı doğrultudadır. Katkısız hidrojel WVTR değeri, kontrol grubuna göre daha düşüktür. Degredasyon testinde de daha az bozunma gösteren katkısız hidrojinin daha yoğun ve kararlı bir yapıya sahip olduğu düşünülmektedir.

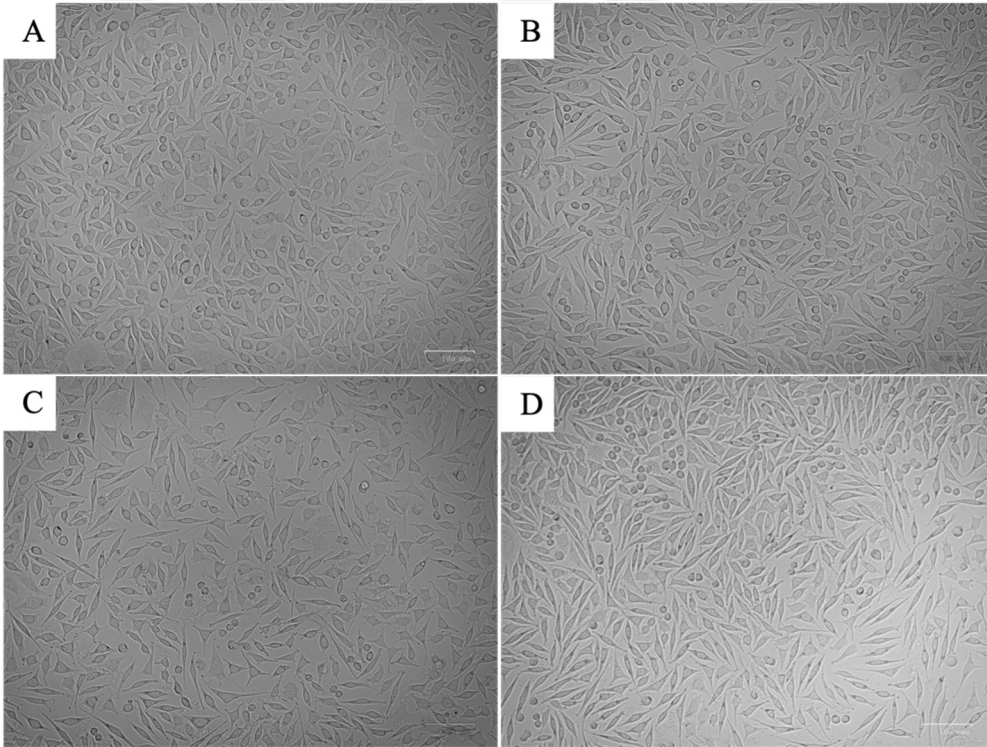
WVTR değeri, normal cilt için  $204 \pm 12$  g/m<sup>2</sup>/gün iken yaralı cilt için  $279 \pm 26$  ile  $5138$  g/m<sup>2</sup>/gün arasında değişmektedir [127]. Ürettiğimiz tüm hidrojellerin WVTR değerleri yara örtüsü olarak kullanıma uygundur. Ancak çok yoğun eksüdalı yaralarda kullanım için düşüktür.

#### 4.10 Hidrojellerin *in vitro* Biyouyumluluklarının Belirlenmesi

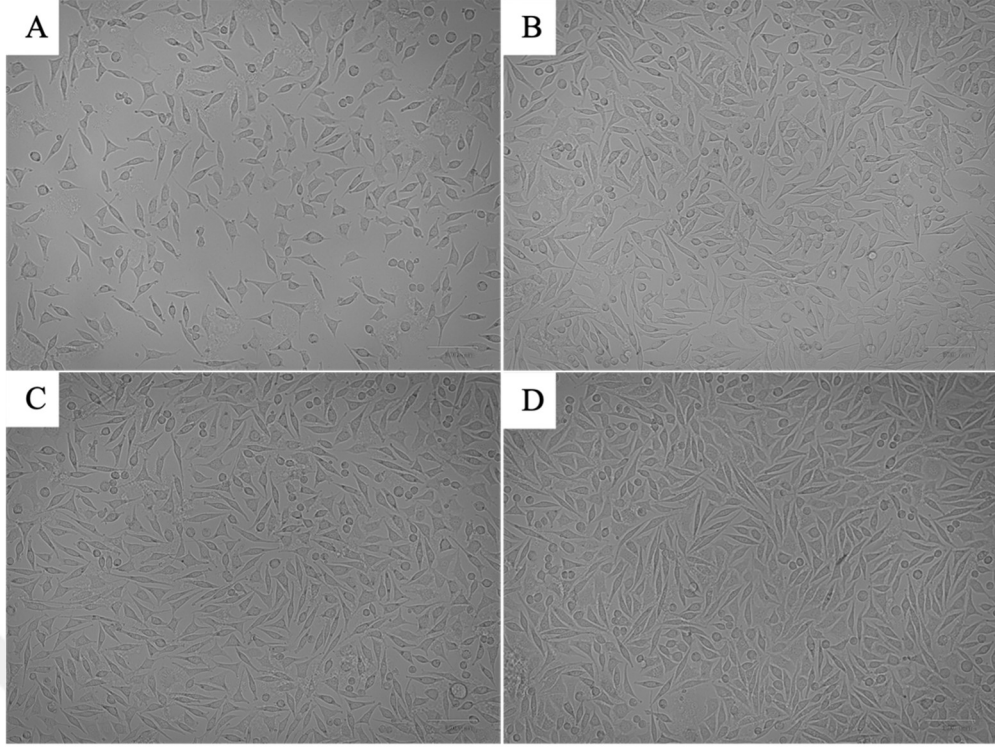
Hidrojel ekstraktının dört farklı konsantrasyonunu (%25, %50, %75, %100) içeren standart besiyerinde 24 saat boyunca kültür edilen hücreler mikroskopta gözlemlenmiştir. Triton X100/amonyum hidroksit ile elde edilen HDM içeren hidrojel-1 ekstraktı ile kültür sonucunda hücrelerin morfolojilerinin ince uzun ve iğsi bir yapıda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.39).



**Şekil 4.39** Hidrojel-1 ekstraktının farklı konsantrasyonları ile 24 saat kültür edilen hücrelerin mikroskop görüntüleri (A:%25, B:%50, C:%75, D:%100).

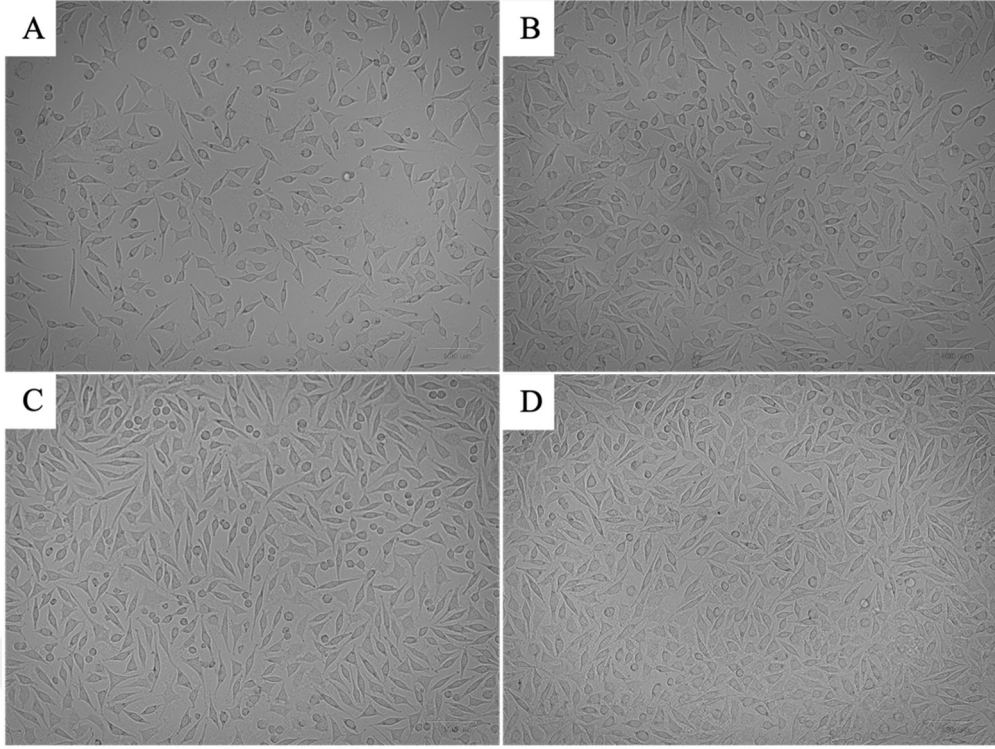


**Şekil 4.40** Hidrojel-2 ekstraktının farklı konsantrasyonları ile 24 saat kültür edilen hücrelerin mikroskop görüntüleri (A:%25, B:%50, C:%75, D:%100).

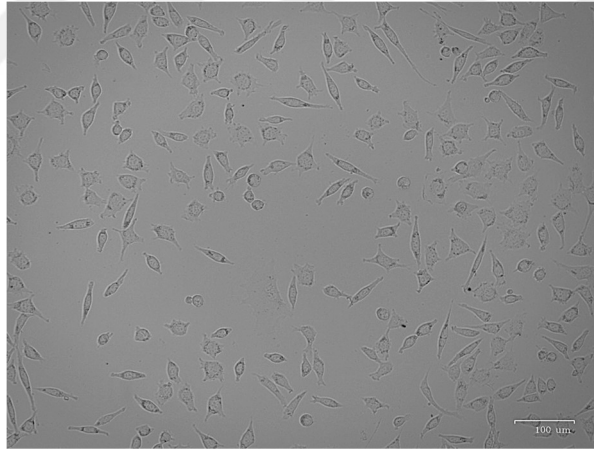


**Şekil 4.41** Hidrojel-3 ekstraktının farklı konsantrasyonları ile 24 saat kültür edilen hücrelerin mikroskop görüntüleri (A:%25, B:%50, C:%75, D:%100).

Hidrojel-2 ve hidrojel-3 ekstraktlarında da hücre morfolojilerinin tipik fibroblast görüntüsünde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.40, Şekil 4.41). Kontrol hidrojel grubunda ise hücrelerin bir kısmının artmış sitoplazma hacmi gösterdiği, heterojen bir popülasyon olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.42). Standart kültür koşullarında tutulan kontrol grubu hücreleri de aynı şekilde farklı morfolojiler gösteren hücrelerden oluşmaktadır (Şekil 4.43). Sağlıklı ve genç hücrelerin karakteristik özelliği olan tipik ince uzun şekilli hücrelerin dECM katkılı hidrojel gruplarında görülmesi matriks katkısının hücre metabolizmasını etkilediğini gösterebilir. Yayılmış ve sitoplazma miktarı artmış hücre görüntüsüne yaşlı, oksidatif strese maruz kalan ya da tümörojenik hücrelerde rastlanmaktadır [128,129]. Morfolojik farklılıklar kontrol grubunda gözlemlenen bu durumun dECM katkısı ile önlenebildiğini düşündürmektedir. Hücre metabolizmasının hidrojel ekstraktları tarafından nasıl etkilendiğinin daha detaylı analizinin yapılması için gen ekspresyon profillerinin belirlenmesi, telomeraz aktivite tayini gibi daha ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



**Şekil 4.42** Hidrojel-kontrol ekstraktının farklı konsantrasyonları ile 24 saat kültür edilen hücrelerin mikroskop görüntüleri (A:%25, B:%50, C:%75, D:%100).

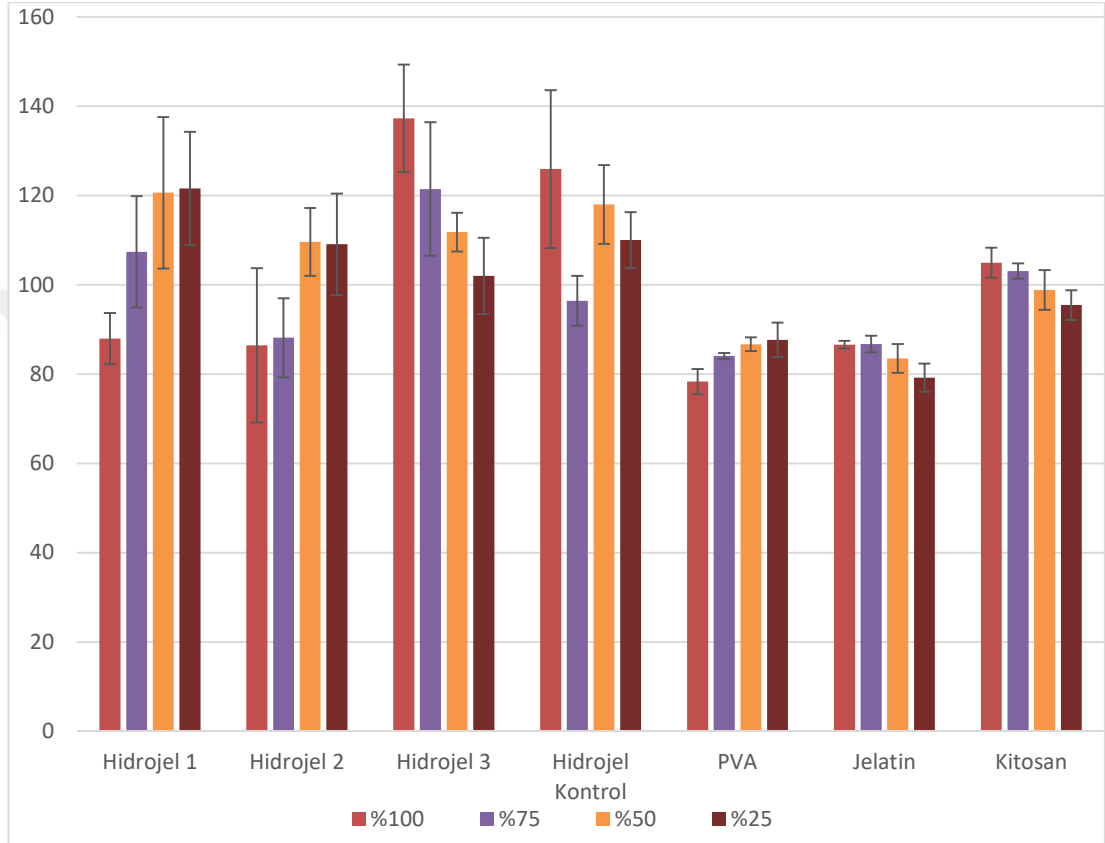


**Şekil 4.43** Standart kültür kabı yüzeyinde kültür edilen kontrol hücrelerinin mikroskop görüntüleri.

Hidrojellerin biyouyumluluklarının incelenmesi için MTT ve nötral kırmızı alım testi uygulanmıştır. Hazırlanan ekstraktların seyreltilmiş konsantrasyonları (%75, %50 ve %25) da çalışmaya eklenmiştir. Aynı zamanda hidrojel üretiminde kullanılan PVA, jelatin ve kitosan çözeltileri de aynı konsantrasyonlarda hazırlanarak çalışma gruplarına eklenmiştir. Standart besi yeri ile kültürü devam ettirilen hücreler de kontrol olarak kullanılmıştır.

#### 4.10.1 MTT analizi

Hidrojel ve hidrojel bileşenlerinin olası toksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan MTT testi sonuçlarına göre üretilen hidrojel yara örtülerinin biyoyumlu olduğu belirlenmiştir. Yara örtülerinin tüm gruplarında ve tüm konsantrasyonlarda hücre canlılık oranının %80'in altına düşmediği görülmüştür (Şekil 4.44).



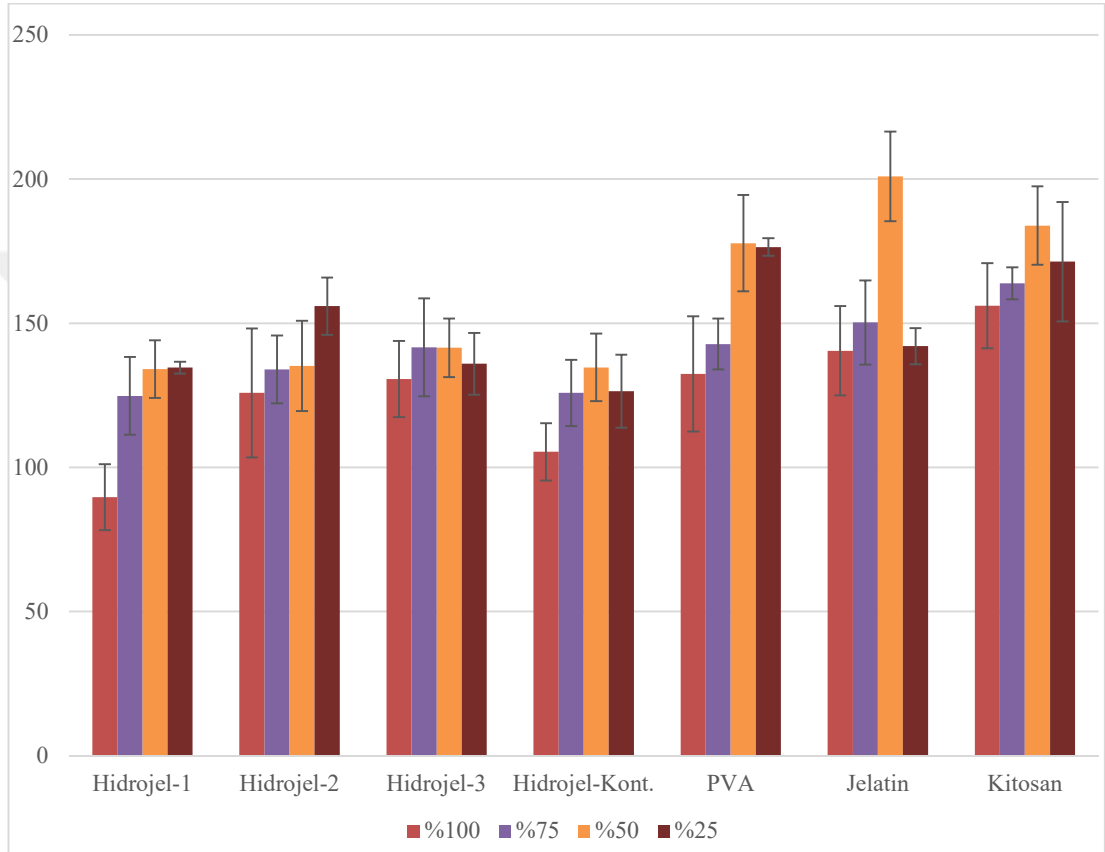
**Şekil 4.44** Hidrojel ve hidrojel içeriğindeki polimerlerin farklı konsantrasyonlarının uygulandığı fibroblastların MTT analizi.

Hidrojel 1 ve hidrojel 2 örneklerinde konsantrasyon azaldıkça hücre canlılık oranı artarken, hidrojel 3 ve kontrol grubunda azalmıştır. Yara örtülerinin üretiminde kullanılan biyomalzemelerin hücre canlılığını %70'in altına düşürmediği ve sitotoksik olmadığı belirlenmiştir.

#### 4.10.2 Nötral kırmızı alım testi

Nötral kırmızı alım testi sonuçlarına göre hidrojel ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve hidrojel içeriğindeki polimerlerin uygulandığı gruplarda hücre canlılığı üzerinde sitotoksik bir etkilerinin olmadığı, hatta hücre proliferasyonunda kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artışlara neden oldukları

görülmüştür (Şekil 4.45). Hücre zar bütünlüğünü ve lizozomal aktiviteyi gösteren NKA testine göre HDM katkılı hidrojellerin, fibroblast membran bütünlüğünü desteklediği belirlenmiştir. Kontrol grubu hücrelere oranlandığında hidrojel ekstraktlarının uygulandığı gruplarda artış olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle hidrojel yapısından gelebilecek olan herhangi bir toksik maddenin hücre içi birikim yapmadığı düşünülmektedir.



**Şekil 4.45** Hidrojel ve hidrojel içeriğindeki polimerlerin farklı konsantrasyonlarının uygulandığı fibroblastların nötral kırmızı alım testi sonuçları.

Fibrinojen hidrojel yapısına eklenen deselülarize deri HDM'sinin, hücre canlılığının korunmasını sağladığı ve hidrojel yapısal stabilitesini artırdığı bildirilmiştir. Diğer yandan üzerine tekrar hücre eklenen HDM katkılı hidrojelilerin 15 gün sonunda mekanik mukavemetlerinin iyileşme gösterdiği raporlanmıştır [130]. Çalışmamızda dHDM katkılı hidrojel ekstraktlarının azalan konsantrasyonları genel olarak %100 ekstraktlara göre hücreleri daha iyi desteklemiştir. ISO10993-12 protokolüne göre biyouyumluluk testlerinde kullanılmak üzere hazırlanması önerilen ekstraksiyon çözeltileri biyomalzemelerin en ekstrem şartlardaki etkisini belirlemek üzere yoğun bir miktarda hazırlandığından (3cm<sup>2</sup>/ml), elde edilen bu %100 ekstraksiyon

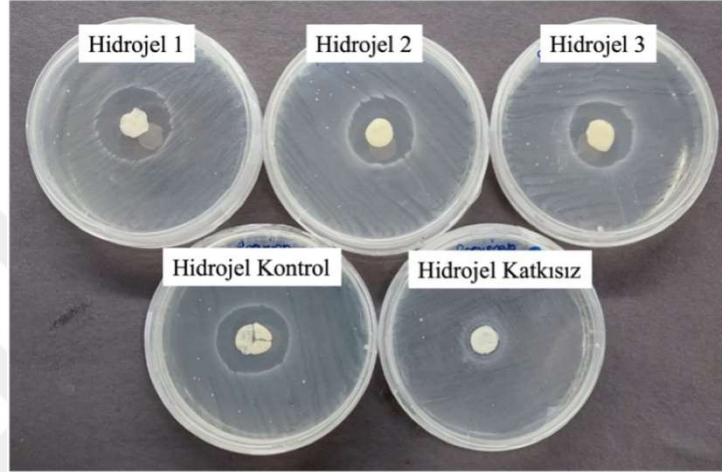
çözeltilerinden dilue edilerek hazırlanan %75, %50, %25 gibi konsantrasyonlardaki çözeltilerin de etkisinin araştırılması önerilmektedir.

Hücreleştirilmiş domuz derisinden hidrojel üretiminin yapıldığı bir araştırmada %3 ve %25 oranında HDM kullanımının hücrelerin proliferasyonunu artırırken %50 ve %100 konsantrasyonlarının sitotoksik olduğu saptanmıştır. Bu durum hücreleştirme işlemi sonrası yıkama sırasında deterjanların tamamen uzaklaştırılmadığı ve kalan miktarın hücreleri öldürebildiği şeklinde yorumlanmıştır [120]. Hazırladığımız hidrojel ekstraktlarında da dHDM kaynaklı olası kimyasal ve hücre kalıntılarının hücrelerin çoğalmasını etkileyebileceği düşünülmektedir. Fernández-Pérez ve ark., hidrojel üretimi yaptıkları çalışmalarında, hücreleştirme protokolünde SDS kullanımının hücre kültüründe sitotoksikiteye neden olurken triton kullanımının toksik etki göstermediğini ve hücre kültüründe kullanımının daha uygun olduğunu bildirmiştir [131]. Uyguladığımız sitotoksikite testlerinde triton kullanımının elde edilen dHDM katkılı hidrojellerin toksik etkilerinin olmasına neden olmadığı belirlenmiştir. Bu durum literatür bilgisi ile uyumludur. Ancak, hücre yapısının zar bütünlüğünün incelendiği NKA testi sonuçlarına bakıldığında triton kullanılan hidrojel-1 ekstraktının toksik olmasa da diğer dHDM katkılı hidrojellere göre hücreleri daha az desteklediği belirlenmiştir ( $p < 0,01$ ). Mitokondriyal aktivitenin tespit edildiği MTT testi sonuçlarında ise fiziksel ve kimyasal yöntem arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p > 0,05$ ). Hücre membran bütünlüğünün bozulmasını sağlama amacıyla hücreleştirme işleminde kullanılan tritonun, yıkamalar sonrasında ortamda hala bulunma ihtimalinin olduğu düşünülmektedir. Bunun için daha ileri çalışmalar ile kalıntı analizlerinin yapılması gerektiği düşünülmektedir.

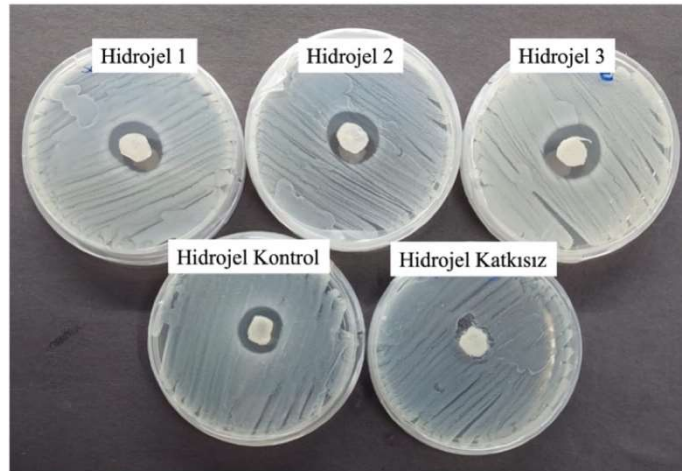
#### **4.11 Hidrojellerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Gentamisin, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* gibi bakterileri etkileyen aminoglikozitlerden biridir, protein sentezini inhibe ederek bakterileri yok eder. Geniş spektrumlu aktivitesi nedeniyle klinik olarak sıklıkla kullanılmaktadır [132]. Piyelonefrit, sistit, zatürre, plevral ampiyem, peritonit, sepsis, menenjit, pürülan deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, enfekte yaralar, yanıklar vb. tedavisinde tercih edilmektedir [133]. Gentamisin yüklü nanopartikül eklediğimiz hidrojel yara örtülerinin antibakteriyel özellik kazanarak yara enfeksiyonu riskinin düşürülebileceği düşünülmüştür.

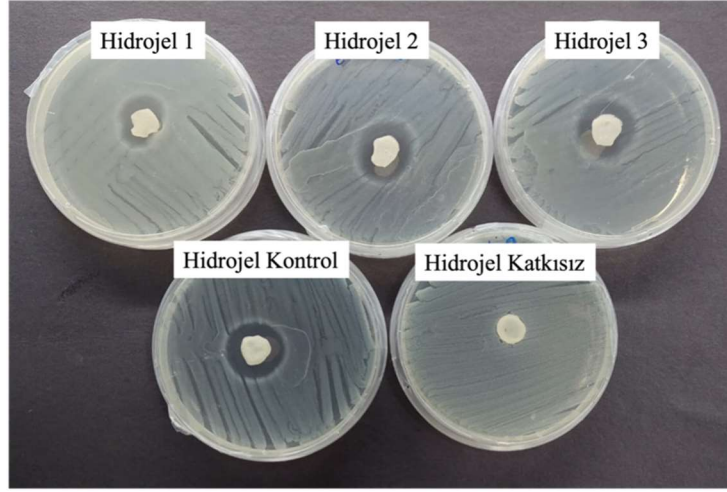
Hazırlanan hidrojel yara örtülerinin antibakteriyel aktiviteleri disk difüzyon testi ile analiz edilmiştir. Hidrojellerin 24 saat boyunca 37°C’de inkübasyonları sonucunda katkısız hidrojel, *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği, *P. aeruginosa* üzerinde ise bir miktar etki gösterdiği belirlenmiştir. dHDM katkılı ve kontrol hidrojel yara örtüleri ise her üç mikroorganizmaya karşı antibakteriyel özellik göstermiştir (Şekil 4.46-4.48). Oluşan zon çapları ise Çizelge 4.5’te sunulmuştur.



Şekil 4.46 Hidrojellerin *P. aeruginosa* üzerinde oluşturdukları zon görüntüleri.



Şekil 4.47 Hidrojellerin *S. aureus* üzerinde oluşturdukları zon görüntüleri.



Şekil 4.48 Hidrojellerin *Escherichia coli* üzerinde oluşturdukları zon görüntüleri.

Çizelge 4.5 Hidrojellerin *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *E. coli* üzerinde belirlenmiş zon çapları (mm).

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Hidrojel 1	29 ± 1,4	20,5 ± 2,1	16,5 ± 4,9
Hidrojel 2	27	22 ± 1,4	23 ± 2,8
Hidrojel 3	26 ± 1,4	22,5 ± 0,7	22,5 ± 0,7
Hidrojel Kontrol	27,5 ± 2,1	16 ± 5,6	22
Hidrojel Katkısız	12	-	-

Hidrojel yara örtüleri içerisine eklediğimiz gentamisin yüklü nanopartiküllerin antimikrobiyal etkisi bu çalışma ile gösterilmiştir. Nanopartikül içermeyen katkısız hidrojeller yalnızca *P. aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal etki göstermiştir. Bu etki de katkılı hidrojellere göre daha az olmuştur.

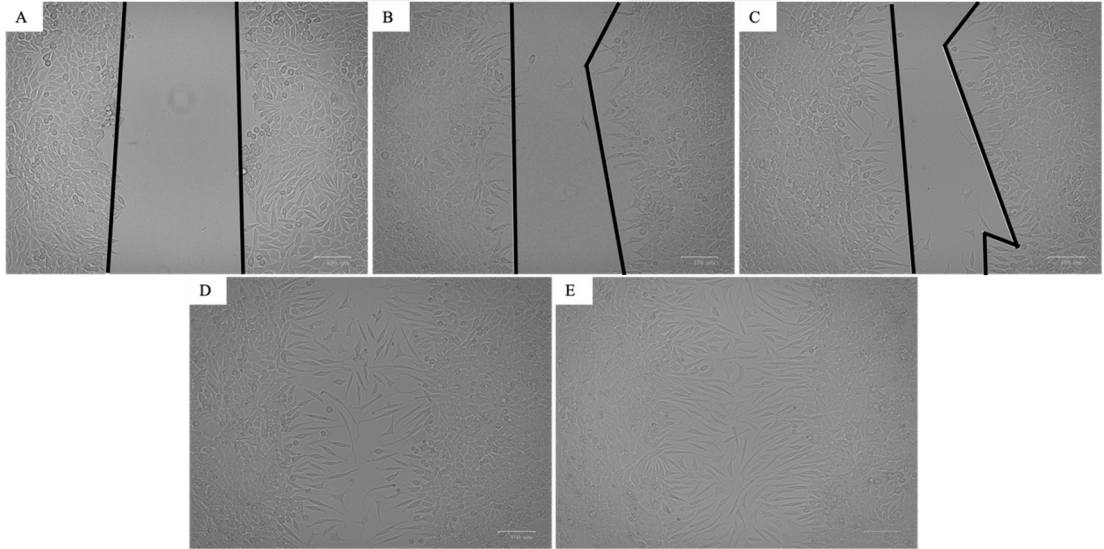
dHDM katkılı hidrojellerin *S. aureus* üzerindeki antimikrobiyal etkileri daha fazla olmuştur. HDM yapısında da bulunan tip VI kolajenin alfa 3 alt biriminin hücre dışı membrana zarar verdiği ve *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'nın sitoplazmik içeriğinin salınmasına neden olduğu literatürde raporlanmıştır. Ayrıca, lamininin a3 ve a4 zincirlerinden türetilen peptitlerin, *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı doza bağlı bir antibakteriyel aktivite gösterdiği gösterilmiştir [134].

Katkısız hidrojelin gösterdiği bu antimikrobiyal etkinin kitosan bileşeninden geliyor olabileceği düşünülmektedir. Kitosanın etki şekli, antimikrobiyal aktivitelerinin hedef bölgesine bağlı olarak hücre dışı etkiler, hücre içi etkiler veya her ikisi olarak sınıflandırılmaktadır. Yüksek moleküler ağırlıklı kitosan genellikle besin maddelerinin hücre dışından alınmasını önleyerek ve hücre geçirgenliğini değiştirerek

etki eder. Düşük molekül ağırlıklı kitosan ise ek olarak hücre içi antimikrobiyal etkiye sahiptir. Ayrıca, kitosanın antimikrobiyal etki şekli büyük ölçüde hedeflenen mikroorganizmanın türüne de bağlıdır [135]. Kitosanın mikroorganizma yüzeyine nüfuz etmesinde kendi moleküler ağırlığı ve hücrenin gözenek boyutu etkilidir. Gözenek boyutları *Escherichia coli* için 2,06 nm, *Pseudomonas aeruginosa*'da  $13 \pm 5$  nm ve *Staphylococcus aureus* için ise yaklaşık 6 nm'dir [135,136]. Hidrojel yapısındaki kitosanın yalnızca *P. aeruginosa* üzerinde etkili olması, mikroorganizmaların gözenek boyutları ile ilişkili olabilir.

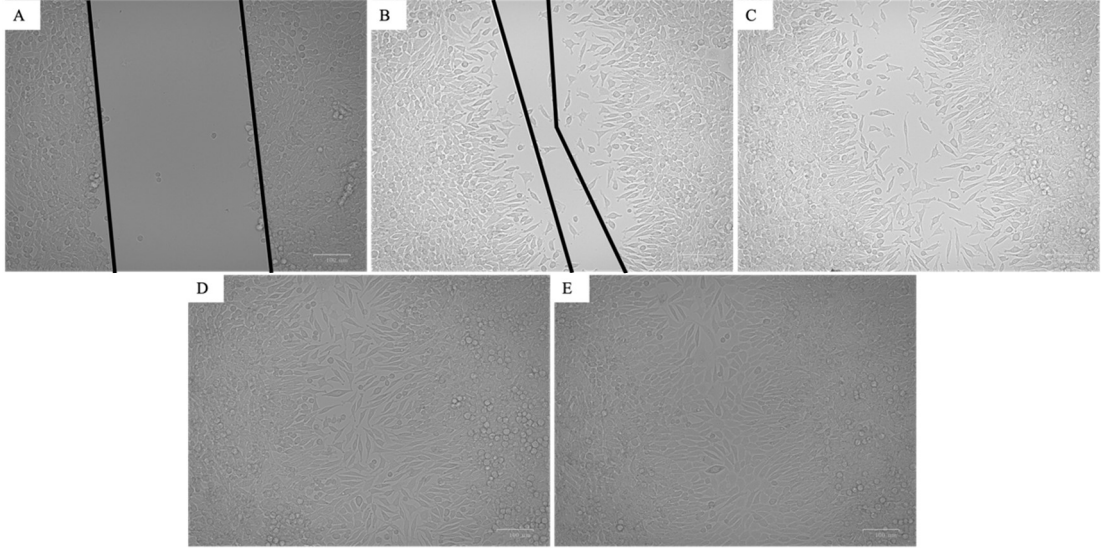
#### 4.12 Hidrojellerin Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri

Hidrojel yara örtülerinin, yara iyileşme üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla *in vitro* çizik testi yapılmıştır. Kültür kabı yüzeyinde oluşturulan çizigin kapanma süresi mikroskop altında görüntülenerek takip edilmiştir (Şekil 4.49-4.54). Fotoğraflar 0., 6., 12., 24. ve 48. saatlerde çekilerek karşılaştırma yapılmıştır.

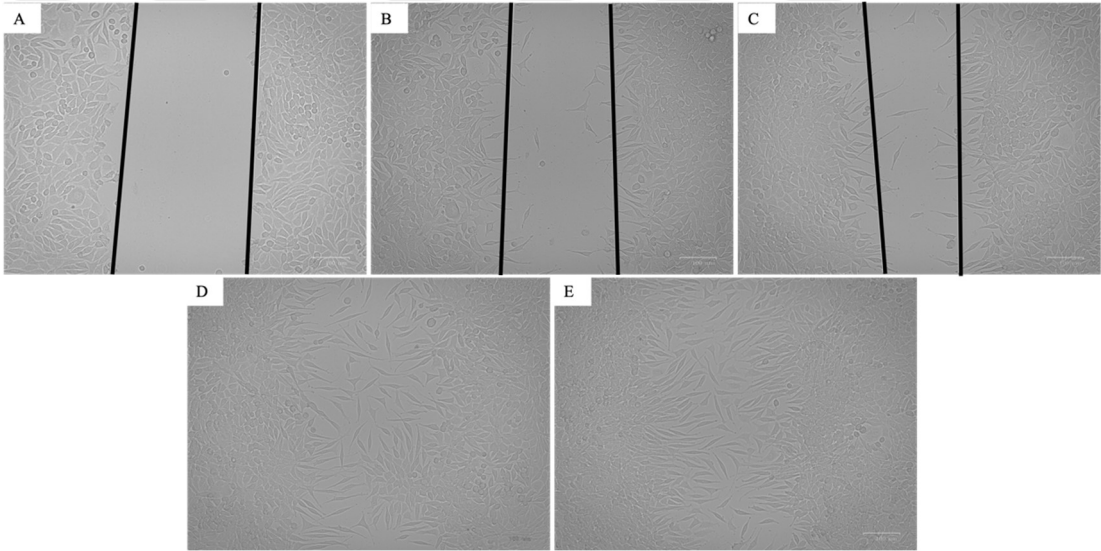


**Şekil 4.49** Hidrojel 1 ekstraktı ile inkübasyon sırasında *in vitro* yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat).

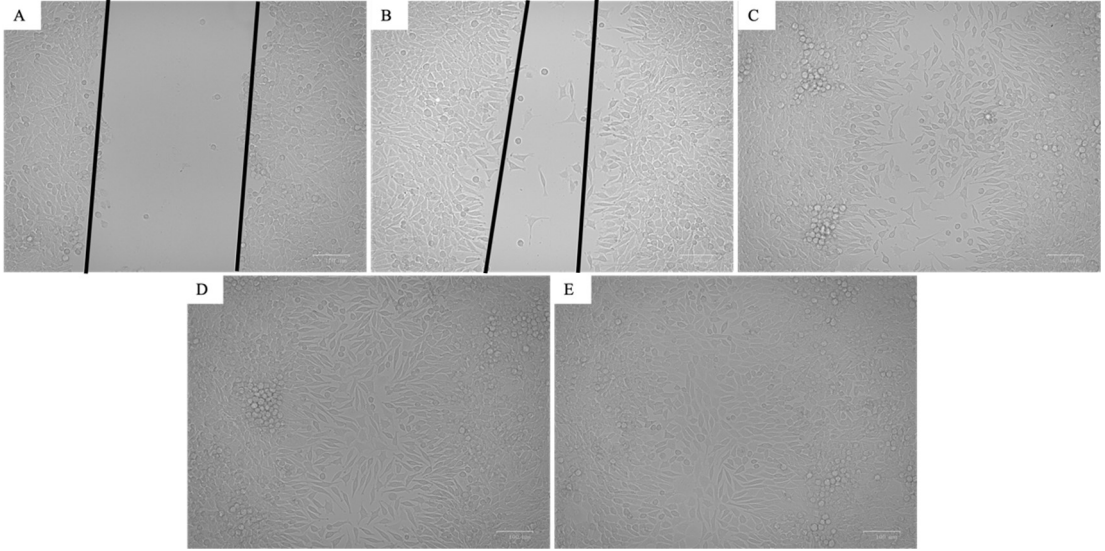
Çalışmada standart besi yeri ile kültürü devam ettirilen hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır (Şekil 4.46). 24 saat sonunda tam kapanma meydana gelmiştir. dHDM katkılı hidrojellerde ise yara kapanma süresinin seyreltilmiş (%50) gruplarda daha kısa olduğu belirlenmiştir. Hidrojel 1 ve 2 ekstraktlarında çizigin hücreler ile doldurulması 24 saat sürerken, %50 ekstraktlarda bu süreç 12 saatte tamamlanmıştır.



**Şekil 4.50** Hidrojel 1 (%50) ekstraktı ile inkübasyon sırasında *in vitro* yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat).

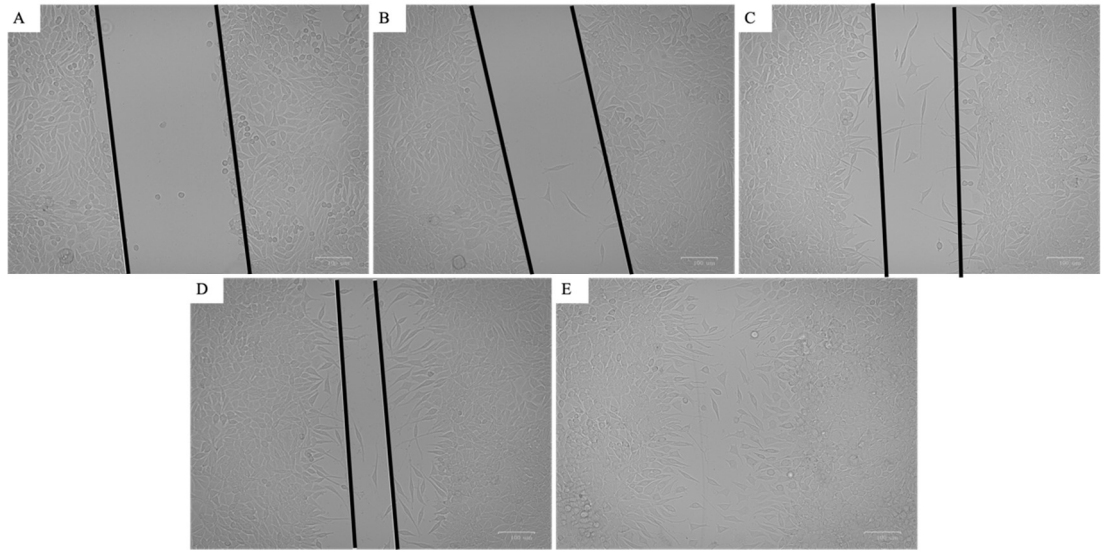


**Şekil 4.51** Hidrojel 2 ekstraktı ile inkübasyon sırasında *in vitro* yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat).

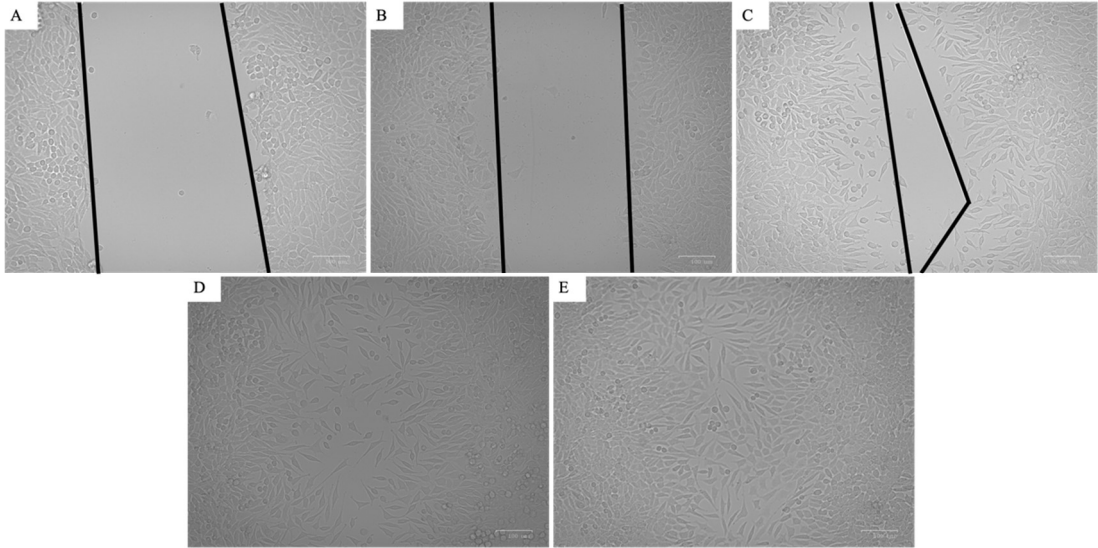


**Şekil 4.52** Hidrojel 2 (%50) ekstraktı ile inkübasyon sırasında *in vitro* yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat).

Hidrojel 3 grubunda tam kapanma süresi 48 saat sürerken, %50 ekstrakt kullanıldığında 24 saat yeterli olmuştur (Şekil 4.45,46).



**Şekil 4.53** Hidrojel 3 ekstraktı ile inkübasyon sırasında *in vitro* yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat).

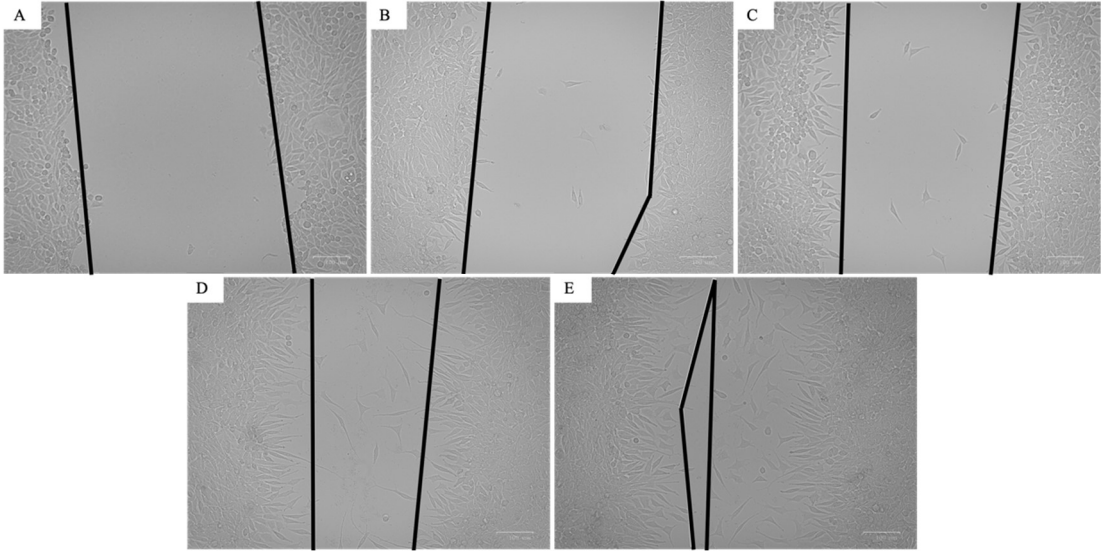


**Şekil 4.54** Hidrojel 3 (%50) ekstraktı ile inkübasyon sırasında *in vitro* yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat).

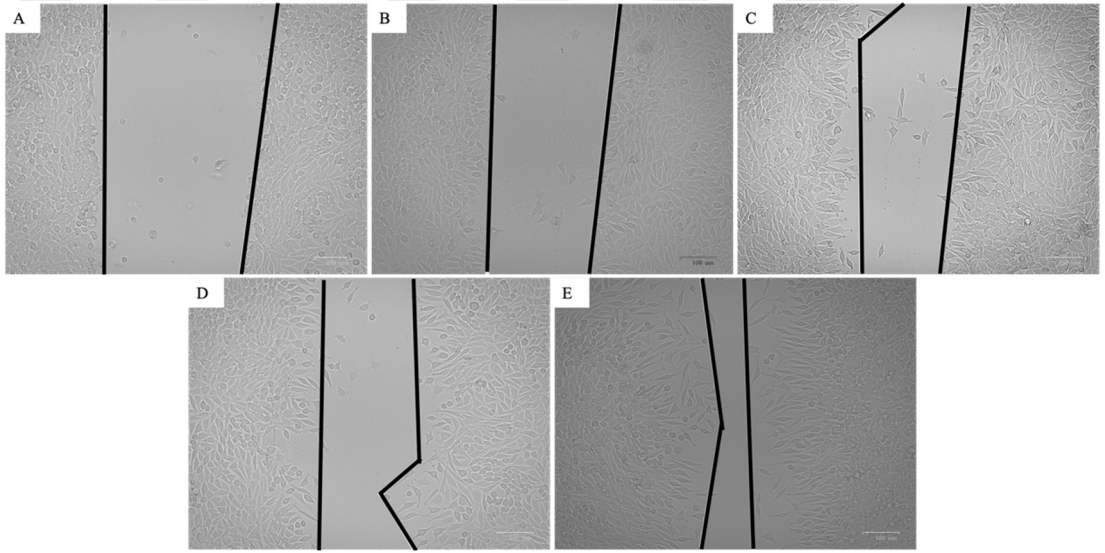
dHDM içermeyen hidrojel kontrol ekstraktları, yara iyileşme sürecinin en yavaş ilerleme gösterdiği grup olmuştur. 48 saat sonunda hala kapanmayan bölgenin var olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.55). %50 ekstrakt kullanıldığında ise 48 saat sonunda kapanmayan alan daha büyük olmuştur. dHDM içeren hidrojellerden farklı olarak bu grupta seyreltilmiş ekstrakt kullanıldığında yara iyileşme süreci yavaşlamıştır. Hidrojel ekstraktları ile yapılan MTT analizinde de konsantrasyon düştükçe hücre canlılık oranı azalmıştır.

MTT ve NKA testiler sonuçlarına göre dHDM katkılı hidrojellerin konsantrasyonu azaldıkça hücre canlılığı artmıştır. *In vitro* çizik testi sonuçlarının da bu doğrultuda olduğu, besi yeri ile sulandırılan ekstraktların yara iyileşmesini daha iyi desteklediği gözlenmiştir.

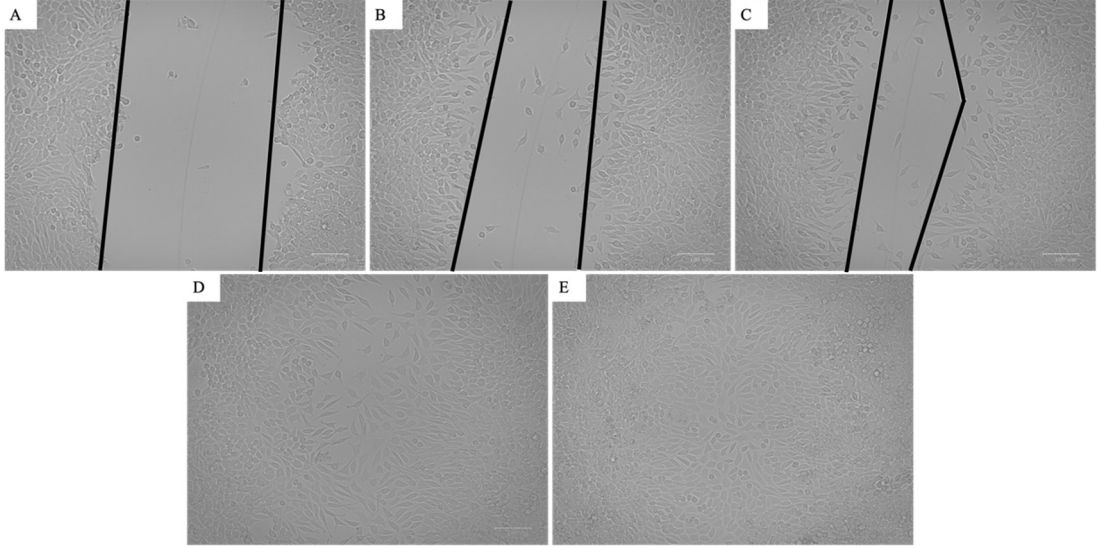
MTT sonuçlarında kontrol hidrojel ekstraktının (%100) hücreleri dHDM katkılı hidrojellere göre daha fazla desteklediği gösterilmiştir. Yara iyileşme çalışmasında ise dHDM katkısının hücre proliferasyonu ve göçünü artırdığı belirlenmiştir.



**Şekil 4.55** Hidrojel Kontrol ekstraktı ile inkübasyon sırasında *in vitro* yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat).



**Şekil 4.56** Hidrojel Kontrol (%50) ekstraktı ile inkübasyon sırasında *in vitro* yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat).



**Şekil 4.57** Kontrol grubu *in vitro* yara modelinin zamana göre değişimi (A:0., B:6., C:12., D:24., E:48. saat).

Bu çalışma ile dHDM katkısının yara iyileşme süresini kısalttığı *in vitro* olarak gösterilmiştir. Matriks katkısı içermeyen kontrol hidrojeline kıyasla daha hızlı iyileşmenin gözlenmesi dHDM'nin fibroblastların proliferasyonunu desteklediğini göstermektedir.

EDTA ile elde edilen dHDM katkılı hidrojel 3 ekstraktının diğer matriks gruplarına göre daha yavaş iyileşme sağlamıştır. Hücresizleştirme yönteminin HDM katkısının hücreler üzerindeki etkisini değiştirebileceği düşünülmektedir.

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Günümüzde modern yara örtüsü olarak hücrelerden elde edilen hücre dışı matriksin kendisi doku mühendisliği için hidrojel yapı iskelesi olarak üretilmekte ve pek çok farklı uygulamada kullanılmaktadır. HDM hücreler için fiziksel, kimyasal ve mekanik avantajlar sağlayan ve hücre yapışmasını, çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını destekleyen en iyi mikro ortamı yaratmaktadır.

Organ/dokulardan veya kültüre edilen hücrelerden elde edilen doğal HDM, hücresel çalışmalarda hücre kültür kaplarında kaplama malzemesi olarak veya yumuşak ve sert doku mühendisliğinde biyouyumlu iskeleler imal etmek için kullanılmaktadır. Hücre kültürlerinden elde edilen hücresizleştirilmiş HDM, hayvan dokulardan elde edilen ksenojenik HDM ile kıyaslandığında immünojenik bileşenlerden yoksundur. Ancak uygulanan fiziksel, kimyasal ve/veya enzimatik hücresizleştirme teknikleri birçok bileşenin denatüre edilmesine ve moleküler etkileşimlerin bozulmasına neden olabilir. Bu durum bu tekniğin bir dezavantajı olabilirken, avantajlardan biri, ortaya çıkan hücresizleştirilmiş HDM iskelesinin ana bileşenleri ve doğal dokuda bulunan bazı mekanik özelliklerini korumasıdır [137]. Benzersiz hücre nişini yeniden oluşturan HDM bazlı ürünler, konak dokularla hızlı bir şekilde entegre olma ve doku fonksiyonunun restorasyonunu hızlandırmada oldukça etkilidir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda doğal HDM tabanlı doku iskeleleri, farklı yaklaşımlar kullanılarak biyolojik olarak üretilmiştir. Doğal dokudan türetilen HDM, tipik olarak hidrojellere veya köpük, nanolif ve 3D baskı ile kompleks yapılar şeklinde hibrit kompozitlere dönüştürülebilir. Hücre kaynaklı HDM eldesi farklı biyolojik üretim yöntemlerini gerektirmektedir. Genellikle hücreler, HDM'yi biriktirmek için bir iskele üzerine ekilir ve bu da HDM içerikli üç boyutlu hibrit malzemelerin eldesi ile sonuçlanır. Hücre tabaka teknolojisinin kullanılması, hücreli/hücresiz HDM'den oluşan karmaşık 3D yapıların üretilmesine olanak tanır. HDM bazlı ürünlerin mekanik mukavemetini, *in vivo* stabilitesini ve biyolojik performansını artırmak için, genellikle çapraz bağlama reaktifleri veya biyoaktif faktörler kullanılarak modifikasyon yapılır [138]. Ancak hücre kültürlerinden elde edilen HDM'nin gelişmiş biyoaktivitesine rağmen, dokuları

yeniden oluşturmak için bir iskele olarak uygulanması bazı durumlarda yetersiz mekanik özellikleri nedeniyle istenilen sonuçları sağlayamamaktadır. Güncel araştırmalarda hücre kaynaklı HDM'nin sentetik biyomateryaller ile kombinasyonun iskele mekanik özelliklerini ve yapısal desteğini geliştirmek için etkili bir strateji olabileceği belirtilmektedir. Bu alanda literatürde yer alan çalışmaların çoğu, hücreleri elektrospun liflerin üzerine ekip, çoğaltıp ardından HDM hibrit elektrospun liflerini elde etmek için hücreleştirme tekniğini uygulamıştır. Farklı olan yaklaşım ise hücre kaynaklı HDM'nin normal *in vitro* hücre kültürü kaplarında üretildiği, hücreleştirme sonrası toplandığı ve liyofilize edilerek toz form haline getirildiği yöntemdir. Böylece başka bir polimer çözeltilisine HDM ekleyerek, HDM içeren kompozit malzemeler üretilebilir ve istenilen özellikleri sağlamak üzere farklı kombinasyonlar oluşturulabilir [139]. Bu tez çalışmasında bu doğrultuda yara iyileşmesinin hızlandırılması için fibroblast hücre kültüründen hücreleştirme tekniği ile elde edilen HDM katkılı hibrit hidrojel üretilmiştir.

Hücre kültürlerinden türetilen hücreleştirilmiş HDM, özellikle son birkaç yıldır biyomedikal araştırmalarda artan büyük bir ilgi görmektedir ve ülkemizde öncelikli alan uygulamalarında hücrelerinden arındırılmış yüksek oranda biyoaktif ve rejeneratif özellikteki doku ve organ platformlarına ve deri uygulamalarına yönelik biyomalzemelere odaklanılması önerilmektedir. Literatürde organ ve dokulardan hücreleştirme yoluyla elde edilen HDM ile ilgili pek çok çalışma bulunmakla birlikte hücre kültüründen elde edilen HDM ile ilgili çalışmalar hala çok sınırlıdır.

HDM iskelesinin özelliklerini ve bileşimini etkileyen ana parametreler, kullanılan hücre tipi, kültür koşulları ve hücreleştirme yaklaşımıdır. Hücre kaynaklı HDM iskelelerinin üretimi için çeşitli protokoller literatürde mevcuttur. Bununla birlikte, daha önce bildirilen protokollerin hiçbiri, HDM yapısal bütünlüğünün korunması, hücre kalıntısının giderilmesi ve yara iyileşmesi ile ilgili testler için uygunluk açısından amaçlanan uygulamaların gerekliliklerine tam olarak uymamaktadır [140]. Bu tez çalışmasında farklı hücreleştirme yöntemleri kullanılarak HDM eldesinin optimizasyonu üzerine çalışılmıştır.

Hücreleştirme yöntemlerinde hücrelerin ortamdaki etkin bir biçimde uzaklaştırılması ve HDM'nin üç boyutlu yapısının, içeriğindeki proteinlerin mümkün olduğunca korunması amaçlanmaktadır. Böylece elde edilen dHDM, *in vivo*'daki en

yakın üç boyutlu yapıyı gösterebilmektedir. Hücrelerin %90 üzerinde uzaklaştırılması ile de immün cevap oluşturma riskinin önüne geçilmesi hedeflenmektedir.

Fibroblast hücre kültüründe uyguladığımız üç farklı teknik karşılaştırıldığında hücreleri uzaklaştırmada fiziksel ve kimyasal yöntemlerin etkili olduğu belirlenmiştir. dHDM yapısı incelendiğinde ise fiziksel yöntem uygulandığında HDM'nin en önemli bileşenlerinden biri olan kolajenin daha iyi korunduğu gösterilmiştir. dHDM bileşiminin kullanılan deselülerizasyon tekniğinden etkilenebileceği belirlenmiştir. Ancak, kütle spektrometresi ya da enzime bağlı immünosorbent testleri (ELISA) gibi daha hassas ve detaylı teknikler kullanılarak dHDM bileşenlerinin tanımlanması, hücresizleştirme tekniklerinin etkilerinin daha iyi analiz edilmesini sağlayacaktır.

Uygulanan kültür sürelerine bakıldığında daha kısa süreli kültürden elde edilen dHDM'nin hücre canlılığını daha iyi desteklemiştir. Kısa süreli kültürlerde toplanan dHDM miktarı azalmaktadır. Bu nedenle hücre kültüründe hücresizleştirme uygulamalarında kültür süresinin optimize edilmesi gerektiği düşünülmektedir. Hücre canlılığını destekleyen aynı zamanda yeterli miktarda matriks elde edilebilmesini sağlayan kültür süresi her hücre tipi için belirlenmelidir. Çalışmamızda fibroblast kültüründe üç ve altı haftalık kültürden elde edilen dHDM miktarı karşılaştırıldığında kültür süresi iki katına çıktığında elde edilen protein miktarı aynı oranda artmamıştır (ortalama 1,4 kat artmıştır). Kültür süresinin bir hafta olması ise protein miktarını oldukça (ortalama 2,3 kat) düşürmüştür. Kontaminasyon riskinin azaltılması ve yöntemin daha kolay uygulanabilir olması nedeniyle üç haftalık kültür süresinin en uygun zaman dilimi olduğu belirlenmiştir.

Hücresizleştirme tekniklerinin karşılaştırılmasında çalışmamızda kullanılan yöntemlere ek olarak farklı protein içeriklerinin analiz edilerek karşılaştırma yapılması, dHDM'lerin fonksiyon ve yapıları üzerindeki etkilerin daha iyi anlaşılmasında etkili olabilir. Ayrıca farklı tipteki hücrelerin kültüründe meydana getirdikleri etkilerin gözlenmesi fibroblast kaynaklı dHDM'lerin kullanım alanları ile ilgili farklı bakış açıları kazandırabilir.

Çalışmamızda, ticari bir hücre hattı kullanılarak *in vitro* HDM üretiminin gerçekleştirilmesi ve hücresizleştirme yöntemlerinin etkinliklerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Primer fibroblast hücre kültürü kaynaklı HDM üretiminin gerçekleştirilerek elde edilen matriksin miktarı ve biyolojik aktivitelerinin

karşılaştırılması büyük ölçekli üretimlerde kullanılabilir. hücrelerin belirlenmesi için yol gösterici olabilir.

dHDM'lerin PVA-Gel-Cs hidrojel yapılarında, gözenek miktarı ve boyutlarında farklılık yarattığı gözlemlenmiştir.

Fibroblast hücrelerinden elde edilen dHDM'lerin hidrojel üretiminde katkı olarak kullanılması ile üretilen yara örtüsünün biyouyumluluk ve yara iyileştirme özelliklerinin artırılması hedeflenmiştir. Sitotoksikite testleri ile toksik etki göstermediği belirlenen dHDM katkılı hidrojel yara iyileşme sürecini *in vitro* ortamda hızlandırmıştır. Matriks katkılı hidrojelde, dHDM içermeyen hidrojel göre yara iyileşme etkinliğinin daha hızlı olması, hücre kültürü kaynaklı HDM'nin biyomalzemelerin biyouyumluluk ve biyoaktivitelerinin artırılması amacıyla kullanımını desteklemektedir.

Biyolojik yöntemle elde edilen dHDM'nin yara iyileşmesi üzerindeki destekleyici etkisi fiziksel ve kimyasal yöntemle elde edilen dHDM katkılarına göre daha az bulunmuştur. Katkı malzemesi olarak kullanılan hücre kültürü kaynaklı dHDM'ler, hidrojel mekanik ve fiziksel özelliklerini değiştirmek ile birlikte hücre canlılığını artırmış ve yara iyileşme sürecini hızlandırmıştır. Bununla birlikte dHDM elde edilme yönteminin bu hidrojel etkinliğinin derecesini değiştirebileceği belirlenmiştir. Bu nedenle dHDM'nin doku mühendisliği çalışmalarında yer alırken kullanım amaçlarına göre farklı hücreleştirme tekniklerinin denenmesi gerektiği önerilmektedir.

Gelecekte, *in vivo* yara iyileşme çalışmalarının yapılması üretilen hidrojel etkinliklerinin kanıtlanması açısından faydalı olacaktır. Böylece hidrojel yapılarının, fiziksel ve biyolojik özelliklerinin yara iyileşme sürecindeki etkileri netlik kazanacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] **Langer, R. ve Vacanti, J. P.** (1993). Tissue Engineering, *Science* (1979), 260: 920–926.
- [2] **Kimmel, H., Rahn, M. ve Gilbert, T. W.** (2010). The clinical effectiveness in wound healing with extracellular matrix derived from porcine urinary bladder matrix: A case series on severe chronic wounds, *Journal of the American College of Certified Wound Specialists*, 2.
- [3] **Choi, J. S., Kim, J. D., Yoon, H. S. ve Cho, Y.** (2013). Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules, *Tissue Eng Part A*, 19.
- [4] **Ren, H., Shi, X., Tao, L., Xiao, J., Han, B., Zhang, Y. ve Ding, Y.** (2013). Evaluation of two decellularization methods in the development of a whole-organ decellularized rat liver scaffold, *Liver International*, 33.
- [5] **Ferng AS, Connell AM, Marsh KM, Qu, N., Medina, A. O., Bajaj, N. ve Khalpey, Z.** (2017). Journal of Clinical and Translational Research Acellular porcine heart matrices: whole organ decellularization with 3D-bioscaffold & vascular preservation, *J Clin Transl Res*, 3.
- [6] **Winter, G. D.** (1962). Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig, *Nature*, 193.
- [7] **Zhao, H., Wu, Y., Xie, Y., Li, Y., Chen, C., Li, C. ve Yuan, J.** (2024). Hydrogel dressings for diabetic foot ulcer: A systematic review and meta-analysis, *Diabetes Obes Metab*.
- [8] **Kenawy, E. R., Kamoun, E. A., Mohy Eldin, M. S. ve El-Meligy M. A.** (2014). Physically crosslinked poly(vinyl alcohol)-hydroxyethyl starch blend hydrogel membranes: Synthesis and characterization for biomedical applications, *Arabian Journal of Chemistry*, 7.
- [9] **Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Piperigkou, Z., Manou, D., Passi, A., Skandalis, S. S. ve Onisto, M.** (2021). A guide to the composition and functions of the extracellular matrix, *FEBS Journal*, 288.
- [10] **Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., Karamanos, N.** (2016). Extracellular matrix structure, *Adv Drug Deliv Rev*, 97, 4–27.
- [11] **Yue, B.** (2014). Biology of the Extracellular Matrix, *J Glaucoma*, 23, S20–S23.
- [12] **Bonnans, C., Chou, J. ve Werb, Z.** (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 786–801.
- [13] **Hu, M., Ling, Z. ve Ren, X.** (2022). Extracellular matrix dynamics: tracking in biological systems and their implications, *J Biol Eng*, 16.

- [14] **Theocharis, A., Gialeli, C., Hascall, V., Karamanos, N.** (2012). Extracellular matrix: A functional scaffold, *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*.
- [15] **Isaeva, E. V., Beketov, E. E., Arguchinskaya, N. V., Ivanov, S. A., Shegay, P. V. ve Kaprin, A. D.** (2022). Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering (Review), *Sovremennye tehnologii v medicine*, 14, 57.
- [16] **Pompili, S., Latella, G., Gaudio, E., Sferra, R. ve Vetuschi, A.** (2021). The Charming World of the Extracellular Matrix: A Dynamic and Protective Network of the Intestinal Wall, *Front Med (Lausanne)*, 8.
- [17] **Dzobo, K. ve Dandara, C.** (2023). The Extracellular Matrix: Its Composition, Function, Remodeling, and Role in Tumorigenesis, *Biomimetics*, 8.
- [18] **Kular, J. K., Basu, S. ve Sharma, R. I.** (2014). The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering, *J Tissue Eng*, 5.
- [19] **Matusiewicz, M.** (2011). Extracellular Matrix Remodeling, *Encyclopedia of Cancer, Springer Berlin Heidelberg*, 1362–13.
- [20] **Kyriakopoulou, K., Piperigkou, Z., Tzaferi, K. ve Karamanos, N.** (2023). Trends in extracellular matrix biology, *Mol Biol Rep*, 50, 853–863.
- [21] **Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M. ve Werb, Z.** (2011). Extracellular Matrix degradation and remodeling in development and disease, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- [22] **Dimitra, M., ve Caon, I.** (2019). The Complex Interplay Between Extracellular Matrix and Cells in Tissues, *In: Vigetti Davide and Theocharis AD (Ed.), The Extracellular Matrix: Methods and Protocols, Springer*, 1–20.
- [23] **Zagris, N.** (2001). Extracellular matrix in development of the early embryo, *Micron*, 32.
- [24] **Muncie, J. M. ve Weaver, V. M.** (2018). The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate, *Current Topics in Developmental Biology*.
- [25] **Liu, C., Pei, M., Li, Q. ve Zhang, Y.** (2022). Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration, *Front Med*, 16.
- [26] **Sharma, P., Kumar, P., Sharma, R., Dhar Bhatt, V. ve Dhot, P.** (2019). Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope, *J Med Life*, 12, 225–229.
- [27] **Hansen, K. C., Kiemele, L., Maller, O., O'Brien, J., Shankar, A. ve Schedin, P.** (2009). An In-solution Ultrasonication-assisted Digestion Method for Improved Extracellular Matrix Proteome Coverage, *Molecular & Cellular Proteomics*, 8, 1648–1657.
- [28] **Fitzpatrick, L.E. ve McDevitt, T. C.** (2015). Cell-derived matrices for tissue engineering and regenerative medicine applications, *Biomater Sci*, 3, 12–24.

- [29] **Porzionato, A., Stocco, E., Barbon, S., Grandi, F. ve De Caro, R.** (2018). Tissue-engineered grafts from human decellularized extracellular matrices: A systematic review and future perspectives, *Int J Mol Sci*, 19.
- [30] **McInnes, A. D., Moser, M. A. J. ve Chen, X.** (2022). Preparation and Use of Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering, *J Funct Biomater*, 13.
- [31] **Badylak, S. F., Brown, B. N. ve Gilbert T. W.** (2013). Tissue Engineering with Decellularized Tissues, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition*.
- [32] **Freytes, D.O., Badylak, S. F., Webster, T. J., Geddes, L. ve Rundell, A.** (2004). Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds, *Biomaterials*, 25.
- [33] **Nieponice, A., Gilbert, T. W. ve Badylak, S. F.** (2006). Reinforcement of Esophageal Anastomoses With an Extracellular Matrix Scaffold in a Canine Model, *Annals of Thoracic Surgery*, 82.
- [34] **Wainwright, D. J.** (1995). Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns, *Burns*, 21.
- [35] **Valdatta, L., Cattaneo, A. G., Pellegatta, I., Scamoni, S., Minuti, A. ve Cherubino, M.** (2014). Acellular Dermal Matrices and Radiotherapy in Breast Reconstruction: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Literature, *Plast Surg Int*, 2014.
- [36] **Hernandez, S. C., Sibley, H., Fink, D. S., Kunduk, M., Kakade, A. ve McWhorter, A.** (2016). Injection Laryngoplasty Using Micronized Acellular Dermis for Vocal Fold Paralysis: Long-term Voice Outcomes, *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 154.
- [37] **Snyder, S. J., Arnoczky, S. P., Bond, J. L. ve Dopirak, R.** (2009). Histologic Evaluation of a Biopsy Specimen Obtained 3 Months After Rotator Cuff Augmentation With GraftJacket Matrix. Arthroscopy, *Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 25.
- [38] **Oberwallner B, Brodarac A, Anić P, Šarić, T., Wassilew, K., Neef, K. ve Stamm, C.** (2015). Human cardiac extracellular matrix supports myocardial lineage commitment of pluripotent stem cells, *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 47.
- [39] **Mirmalek-Sani, S. H., Orlando, G., McQuilling, J. P., Pareta, R., Mack, D., Salvatori, M. ve Soker, S.** (2013). Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering, *Biomaterials*, 34.
- [40] **Du, P., Da Costa, A. D. S., Savitri, C., Ha, S., Wang, P. Y. ve Park, K.** (2020). An injectable, self-assembled multicellular microsphere with the incorporation of fibroblast-derived extracellular matrix for therapeutic angiogenesis, *Materials Science and Engineering*, C 113.
- [41] **Gu, Y., Zhu, J., Xue, C., Li, Z., Gu, X.** (2014). Chitosan/silk fibroin-based, Schwann cell-derived extracellular matrix-modified scaffolds for bridging rat sciatic nerve gaps, *Biomaterials*, 35, 2253–2263.

- [42] **Hoshiba, T. ve Gong, J.** (2018). Fabrication of cell-derived decellularized matrices on three-dimensional (3D)-printed biodegradable polymer scaffolds, *Microsystem Technologies*, 24, 613–617.
- [43] **Lawson, J. H., Glickman, M. H., Ilzecki, M., Jakimowicz, T., Jaroszynski, A., Peden, E. ve Niklason, L. E.** (2016). Bioengineered human acellular vessels for dialysis access in patients with end-stage renal disease: Two phase 2 single-arm trials, *The Lancet*, 387, 2026–2034.
- [44] **Blum, J. C., Schenck, T. L., Birt, A., Giunta, R. E., Wiggenshauser, P.** (2021). Artificial decellularized extracellular matrix improves the regenerative capacity of adipose tissue derived stem cells on 3D printed polycaprolactone scaffolds, *J Tissue Eng*, 12.
- [45] **Carvalho, M.S., Silva, J.C., Cabral, J. M. S., da Silva, C. ve Vashishth, D.** (2019). Cultured cell-derived extracellular matrices to enhance the osteogenic differentiation and angiogenic properties of human mesenchymal stem/stromal cells, *J Tissue Eng Regen Med*, 13, 1544–1558.
- [46] **Tang, C., Jin, C., Li, X., Li, J., Du, X., Yan, C. ve Wang, L.** (2019). Evaluation of an autologous bone mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix scaffold in a rabbit and minipig model of cartilage repair, *Medical Science Monitor*, 25, 7342–735.
- [47] **Antich, C., Jiménez, G., de Vicente, J., López-Ruiz, E., Chocarro-Wrona, C. ve Marchal, J.** (2021). Development of a Biomimetic Hydrogel Based on Predifferentiated Mesenchymal Stem-Cell-Derived ECM for Cartilage Tissue Engineering, *Adv Healthc Mater*, 10.
- [48] **Ng, C. P., Mohamed Sharif, A. R., Heath, D. E., Chow, J., Zhang, C., Chan-Park, M. ve Griffith, L.** (2014). Enhanced ex vivo expansion of adult mesenchymal stem cells by fetal mesenchymal stem cell ECM, *Biomaterials*, 35, 4046–4057.
- [49] **Gilkes, D. M., Bajpai, S., Chaturvedi, P., Wirtz, D. ve Semenza, G.** (2013). Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts, *Journal of Biological Chemistry*, 288.
- [50] **Kusuma, G. D., Yang, M. C., Brennecke, S. P., O'Connor, A., Kalionis, B. ve Heath, D. E.** (2018). Transferable Matrixes Produced from Decellularized Extracellular Matrix Promote Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Facilitate Scale-Up, *ACS Biomater Sci Eng*, 4, 1760–1769.
- [51] **Moffat, D., Ye, K. ve Jin, S.** (2022). Decellularization for the retention of tissue niches, *J Tissue Eng*, 13.
- [52] **Zemmyo, D., Yamamoto, M. ve Miyata, S.** (2020). Fundamental study of decellularization method using cyclic application of high hydrostatic pressure, *Micromachines (Basel)*, 11.
- [53] **Sart, S., Jeske, R., Chen, X., Ma, T. ve Li, Y.** (2020). Engineering stem cell-derived extracellular matrices: Decellularization, characterization, and biological function, *Tissue Eng Part B Rev*, 26.

- [54] **Hoshiba, T.** (2017). Cultured cell-derived decellularized matrices: a review towards the next decade, *J Mater Chem B*, 5, 4322–4331.
- [55] **Lai, W. Y., Li, Y. Y., Mak, S. K., Ho, F. C., Chow, S. T., Chooi, W. H. ve Chan, B. P.** (2013). Reconstitution of bone-like matrix in osteogenically differentiated mesenchymal stem cell-collagen constructs: A three-dimensional in vitro model to study hematopoietic stem cell niche, *J Tissue Eng*, 4.
- [56] **Hoshiba, T., Yamada, T., Lu, H., Kawazoe, N. ve Chen, G.** (2012). Maintenance of cartilaginous gene expression on extracellular matrix derived from serially passaged chondrocytes during in vitro chondrocyte expansion, *J Biomed Mater Res A*, 100 A.
- [57] **Lu, H., Hoshiba, T., Kawazoe, N. ve Chen, G.** (2011). Autologous extracellular matrix scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 32.
- [58] **Marin, E., Boschetto, F. ve Pezzotti, G.** (2020). Biomaterials and biocompatibility: An historical overview, *J Biomed Mater Res A*, 108.
- [59] **Huebsch, N. ve Mooney, D. J.** (2009). Inspiration and application in the evolution of biomaterials, *Nature*, 462.
- [60] **Todros, S., Todesco, M. ve Bagno, A.** (2021). Biomaterials and their biomedical applications: From replacement to regeneration, *Processes*, 9.
- [61] **Williams, D. F.** (2008). On the mechanisms of biocompatibility, *Biomaterials*, 29.
- [62] **Reza Rezaie, H., Beigi Rizi, H., Rezaei Khamseh, M.M. ve Öchsner, A.** (2020). A Review on Dental Materials, Cham, *Springer International Publishing*.
- [63] **Id, I.** (2017). Applications of Polymers in the Biomedical Field, *Curr Trends Biomed Eng Biosci*, 4.
- [64] **Raghavendra, G. M., Varaprasad, K. ve Jayaramudu, T.** (2015). Biomaterials, Nanotechnology Applications for Tissue Engineering, *Elsevier*, 21–44.
- [65] **Chong, E. T. J., Ng, J. W. ve Lee, P. C.** (2023). Classification and Medical Applications of Biomaterials—A Mini Review, *Bio Integration*, 4.
- [66] **Ulery, B. D., Nair, L. S. ve Laurencin, C. T.** (2011). Biomedical applications of biodegradable polymers, *J Polym Sci B Polym Phys*, 49.
- [67] **AL-Sabagh, A. M. ve Abdeen, Z.** (2010). Preparation and Characterization of Hydrogel Based on Poly(vinyl alcohol) Cross-Linked by Different Cross-Linkers Used to Dry Organic Solvents, *J Polym Environ*, 18.
- [68] **Teodorescu, M., Bercea, M. ve Morariu, S.** (2018). Biomaterials of Poly(vinyl alcohol) and Natural Polymers, *Polymer Reviews*, 58.
- [69] **Tamura, K., Ike, O., Hitomi, S., Isobe, J., Shimizu, Y. ve Nambu, M.** (1986). A new hydrogel and its medical application, *ASAIO transactions / American Society for Artificial Internal Organs*, 32.

- [70] **Kamoun, E. A., Chen, X., Mohy Eldin, M. S., Kenawy, E. R.** (2015). Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers, *Arabian Journal of Chemistry*, 8.
- [71] **Baker, M. I., Walsh, S. P., Schwartz, Z., ve Boyan, B.** (2012). A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 100 B.
- [72] **Wang, M., Li, Y., Wu, J., Xu, F. ve Jansen, J. A.** (2008). In vitro and in vivo study to the biocompatibility and biodegradation of hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol)/gelatin composite, *J Biomed Mater Res*, A 85.
- [73] **Sciarretta, F. V.** (2013). 5 to 8 years follow-up of knee chondral defects treated by PVA-H hydrogel implants, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 17.
- [74] **Jiang, T., James, R., Kumbar, S. G. ve Laurencin, C.** (2014). Chitosan as a Biomaterial: Structure, Properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery, *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*.
- [75] **Tolaimate, A., Desbrières, J., Rhazi, M. ve Vottero, P.** (2000). On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin, *Polymer (Guildf)*, 41.
- [76] **Lehr, C. M, Bouwstra, J. A, Schacht, E. H., ve Junginger, H. E** (1992). In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers, *Int J Pharm*, 78.
- [77] **Ma, L., Gao, C., Mao Z, Zhou, J., Shen, J., Hu, X. ve Han, C.** (2003). Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering, *Biomaterials*, 24.
- [78] **Victor, R. S., Santos, A. M. C., de Sousa, B. V. ve Menezes, R. R.** (2020). A review on Chitosan's uses as biomaterial: Tissue engineering, drug delivery systems and cancer treatment, *Materials*, 13.
- [79] **Lukin, I., Erezuma, I., Maeso, L., Zarate, J., Desimone, M., Al-Tel, T. ve Orive, G.** (2022). Progress in Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering, *Pharmaceutics*, 14.
- [80] **Won, Y. W., Yoon, S. M., Lim, K. S. ve Kim, Y.** (2012). Self-assembled nanoparticles with dual effects of passive tumor targeting and cancer-selective anticancer effects, *Adv Funct Mater*, 22.
- [81] **Ulrich, D., Edwards, S. L., Su, K., Tan, K., White, J., Ramshaw, J. ve Gargett, C.** (2014). Human endometrial mesenchymal stem cells modulate the tissue response and mechanical behavior of polyamide mesh implants for pelvic organ prolapse repair, *Tissue Eng Part A*, 20.
- [82] **Pal, K., Banthia, A. K. ve Majumdar, D. K.** (2007). Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications, *AAPS PharmSciTech*, 8.
- [83] **Yoruç, H. A. ve Sener, B.** (2012). A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones Cont., 67–114.

- [84] **Vallet-Regí, M.** (2001). Ceramics for medical applications, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*.
- [85] **Li, J. & Hastings, G. W.** (2016). Oxide bioceramics: Inert ceramic materials in medicine and dentistry, *Handbook of Biomaterial Properties, Second Edition*.
- [86] **Kargozar, S., Ramakrishna, S. ve Mozafari, M.** (2019). Chemistry of biomaterials: future prospects, *Curr Opin Biomed Eng*, 10.
- [87] **Salernitano, E. ve Migliaresi, C.** (2014). Composite materials for biomedical applications: a review, *J Appl Biomater Biomech*, 1.
- [88] **Raghavendra, G. M., Varaprasad, K. ve Jayaramudu, T.** (2015). Biomaterials: Design, Development and Biomedical Applications, *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*.
- [89] *Composites as Biomaterials Biomaterials*, (2007). Springer New York, 207–224.
- [90] **Wang, P., Huang, B., Horng, H., Yeh, C. ve Chen, Y.** (2018). Wound healing, *Journal of the Chinese Medical Association*, 81: 94–101.
- [91] **Broussard, K. C. ve Powers, J. G.** (2013). Wound dressings: Selecting the most appropriate type, *Am J Clin Dermatol*, 14.
- [92] **Junker, J. P. E., Kamel, R. A., Catterson, E. J. ve Eriksson, E.** (2013). Clinical Impact Upon Wound Healing and Inflammation in Moist, Wet, and Dry Environments, *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2.
- [93] **Deutsch, C., Edwards, D. ve Myers, S.** (2017). Wound dressings, *Br J Hosp Med*, 78: C103–C109.
- [94] **Sarabahi, S.** (2012). Recent advances in topical wound care, *Indian Journal of Plastic Surgery*, 45.
- [95] **Rezvani, G. E., Khalili, S., Nouri Khorasani S, ve Ramakrishna, S.** (2019). Wound dressings: Current advances and future directions, *J Appl Polym Sci*, 136.
- [96] **Weller, C. ve Sussman, G.** (2006). Wound dressings update, *Journal of Pharmacy Practice and Research* 36.
- [97] **Zhang, Y., Holland, E., Chun, M., O'brien, M., Nguyen, A. ve Sun, L.** (2020) Just a Flesh Wound? A Detailed Review of Modern Dressings, *Health Science Journal* 14.
- [98] **Wichterle, O. ve Lím, D.** (1960). Hydrophilic Gels for Biological Use, *Nature*, 185.
- [99] **Fan, L., Yang, H., Yang, J., Peng, M. ve Hu, J.** (2016). Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings, *Carbohydr Polym*, 146: 427–434.
- [100] **Na, Y. H.** (2013). Double network hydrogels with extremely high toughness and their applications, *Korea Australia Rheology Journal*, 25.
- [101] **Zhang, L., Chen, J. ve Han, C.** (2009). A multicenter clinical trial of recombinant human GM-CSF hydrogel for the treatment of deep second-degree burns, *Wound Repair and Regeneration*, 17.

- [102] **Shi, R., Zhou, J., Wang, B., Wu, Q., Shen, Y., Wang, P. ve Shu, X.** (2013). The clinical outcomes of new hyaluronan nasal dressing: A prospective, randomized, controlled study, *Am J Rhinol Allergy*, 27.
- [103] **Namazi, H., Rakhshaei, R., Hamishehkar, H. ve Kafil, H.** (2016). Antibiotic loaded carboxymethylcellulose/MCM-41 nanocomposite hydrogel films as potential wound dressing, *Int J Biol Macromol*, 85.
- [104] **Qu, J., Zhao, X., Liang, Y. ve Guo, B.** (2018). Antibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing, *Biomaterials*, 183.
- [105] **Yang, Y., Lin, H., Shen, H., Wang, B., Lei, G. ve Tuan, R.** (2018). Mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix enhances chondrogenic phenotype of and cartilage formation by encapsulated chondrocytes in vitro and in vivo, *Acta Biomater*, 69.
- [106] **Baroncelli, M., Van Der Eerden, B. C. J., Chatterji, S., Rull Trinidad, E., Kan, Y., Koedam, M. ve Van Leeuwen, J.** (2018). Human Osteoblast-Derived Extracellular Matrix with High Homology to Bone Proteome Is Osteopromotive, *Tissue Eng Part A*, 24: 1377–1389.
- [107] **rao Patabhi, S., Martinez, J. S. ve Keller, T. C. S.** (2014). Decellularized ECM effects on human mesenchymal stem cell stemness and differentiation, *Differentiation*, 88: 131–143.
- [108] **Chiang, C. E., Fang, Y. Q., Ho, C. T., Assunção, M., Lin, S. J. ve Huang, C.** (2021). Bioactive Decellularized Extracellular Matrix Derived from 3D Stem Cell Spheroids under Macromolecular Crowding Serves as a Scaffold for Tissue Engineering, *Adv Healthc Mater*, 10.
- [109] **Choi, M., Sultana, T., Park, M. ve Lee, B.** (2021). Fibroblast cell derived extracellular matrix containing electrospun scaffold as a hybrid biomaterial to promote in vitro endothelial cell expansion and functionalization, *Materials Science and Engineering C*, 120.
- [110] **Siddiqui, S. ve Arshad, M.** (2014). Osteogenic potential of punica granatum through matrix mineralization, cell cycle progression and runx2 gene expression in primary rat osteoblasts, *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22.
- [111] **Hashimoto, K., Yamashita, K., Enoyoshi, K., Dahan, X., Takeuchi, T., Kori, H ve Gotoh, M.** (2020). The effects of coating culture dishes with collagen on fibroblast cell shape and swirling pattern formation, *J Biol Phys*, 46.
- [112] **Hoshiba, T. ve Yokoyama, N.** (2020). Decellularized extracellular matrices derived from cultured cells at stepwise myogenic stages for the regulation of myotube formation, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1867.
- [113] **Zhai, M., Xu, Y., Zhou, B., ve Jing, W.** (2018). Keratin-chitosan/n-ZnO nanocomposite hydrogel for antimicrobial treatment of burn wound healing: Characterization and biomedical application, *J Photochem Photobiol B*, 180.
- [114] **Zhou, J., Yao, D., Qian, Z., Hou, S., Li, L., Jenkins, A. ve Fan, Y.** (2018). Bacteria-responsive intelligent wound dressing: Simultaneous In situ detection and inhibition of bacterial infection for accelerated wound healing, *Biomaterials*, 161.

- [115] **Liang, C. C., Park, A.Y. ve Guan, J. L.** (2007). In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Nat Protoc*, 2.
- [116] **Ha, S. S., Song, E. S., Du, P., Suhaeri, M., Lee, J. ve Park, K.** (2020). Novel ECM Patch Combines Poly(vinyl alcohol), Human Fibroblast-Derived Matrix, and Mesenchymal Stem Cells for Advanced Wound Healing, *ACS Biomater Sci Eng*, 6: 4266–4275.
- [117] **Maia, F. R., Reis, R. L. ve Oliveira, J. M.** (2020). Decellularized hASCs-derived matrices as biomaterials for 3D in vitro approaches, *Methods in Cell Biology, Academic Press Inc.*, 45–58.
- [118] **Ji, J., Zhang, D., Wei, W., Shen, B., Zhang, Y., ve Gu, P.** (2018). Decellularized matrix of adipose-derived mesenchymal stromal cells enhanced retinal progenitor cell proliferation via the Akt/Erk pathway and neuronal differentiation, *Cytotherapy*, 20: 74–86.
- [119] **Xiong, X., Yang, X., Dai, H., Feng, G., Zhang, Y., Zhou, J. ve Zhou, W.** (2019). Extracellular matrix derived from human urine-derived stem cells enhances the expansion, adhesion, spreading, and differentiation of human periodontal ligament stem cells, *Stem Cell Res Ther*, 10.
- [120] **Braga, G.C.D., Camargo, C.P., Harmsen M.C. ve Gemperli, R.** (2022). A modified hydrogel production protocol to decrease cellular content, *Acta Cir Bras*, 37.
- [121] **Golebiowska, A.A., Intravaia, J.T., Sathe, V.M. ve Nukavarapu, S.P.** (2024). Decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative therapies: Advances, challenges and clinical prospects, *Bioact Mater*, 32.
- [122] **Davidov, T., Efraim, Y., Hayam, R. ve Machluf M.** (2021). Extracellular matrix hydrogels originated from different organs mediate tissue-specific properties and function, *Int J Mol Sci*, 22.
- [123] **Sallehuddin, N., Fadilah, N.I.M., Hwei, N.M. ve Fauzi M.B.** (2022). Characterization and Cytocompatibility of Collagen–Gelatin–Elastin (CollaGee) Acellular Skin Substitute towards Human Dermal Fibroblasts: In Vitro Assessment, *Biomedicines*, 10.
- [124] **Gonçalves, M.M., Carneiro, J., Justus, B. ve Paula, J.P.** (2020). Preparation and characterization of a novel antimicrobial film dressing for wound healing application, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56.
- [125] **Qu, C., Hirviniemi, M., Tiitu, V. ve Lammi, M.J.** (2014). Effects of Freeze-Thaw Cycle with and without Proteolysis Inhibitors and Cryopreservant on the Biochemical and Biomechanical Properties of Articular Cartilage, *Cartilage*, 5.
- [126] **Waresindo, W.X., Luthfianti, H.R., Priyanto, A., Hadipin, D.A., ve Khairurrijal, K.** (2023). Freeze-thaw hydrogel fabrication method: basic principles, synthesis parameters, properties, and biomedical applications, *Mater Res Express*, 10.
- [127] **Wang, L., Khor, E., Wee, A. ve Li, L.Y.** (2002). Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing, *J Biomed Mater Res*, 63.
- [128] **Zainuddin, A., Chua, K.H., Rahim, N.A. ve Makpol, S.** (2010). Effect of experimental treatment on GAPDH mRNA expression as a housekeeping gene in human diploid fibroblasts, *BMC Mol Biol*, 11.

- [129] **Angelucci, C., Maulucci, G., Lama, G., Colabianchi, A., Papi, A. ve Sica, G.** (2012). Epithelial-Stromal Interactions in Human Breast Cancer: Effects on Adhesion, Plasma Membrane Fluidity and Migration Speed and Directness, *PLoS One*, 7.
- [130] **Jorgensen, A.M., Chou, Z., Gillispie, G., Lee, S.J. ve Atala, A.** (2020). Decellularized Skin Extracellular Matrix (dsECM) Improves the Physical and Biological Properties of Fibrinogen Hydrogel for Skin Bioprinting Applications, *Nanomaterials (Basel)*, 10.
- [131] **Fernández-Pérez, J. ve Ahearne, M.** (2019). The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels, *Sci Rep*, 9.
- [132] **Heydariyan, Z., Soofivand, F., Dawi, E.A. ve Niasari, M.** (2023). A comprehensive review: Different approaches for encountering of bacterial infection of dental implants and improving their properties, *J Drug Deliv Sci Technol*, 84.
- [133] **Vardanyan, R.S. ve Hruby, V.J.** (2006). Antibiotics, Synthesis of Essential Drugs, *Elsevier*, 425–498.
- [134] **Jiménez-Gastélum, G.R., Aguilar-Medina, E.M., Soto-Sainz, E. ve Silva-Benítez, E.L.** (2019). Antimicrobial Properties of Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering, *Biomed Res Int*, 2019.
- [135] **Ke, C.L., Deng, F.S., Chuang, C.Y., ve Lin, C.H.** (2021). Antimicrobial actions and applications of Chitosan, *Polymers (Basel)*, 13.
- [136] **Pasquina-Lemonche, L., Burns, J., Turner, R.D., ve Hobbs, J.K.** (2020). The architecture of the Gram-positive bacterial cell wall, *Nature*, 582.
- [137] **Chen, Y., Chen, J., Zhang, Z., ve Lin, X.** (2017). Current advances in the development of natural meniscus scaffolds: innovative approaches to decellularization and recellularization, *Cell Tissue Res*, 370.
- [138] **Xing, Q., Yates, K., Tahtinen, M., ve Zhao, F.** (2015). Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation, *Tissue Eng Part C Methods*, 21.
- [139] **Thakkar, S., Ghebes, C.A., Ahmed, M., ve Moroni, L.** (2013). Mesenchymal stromal cell-derived extracellular matrix influences gene expression of chondrocytes, *Biofabrication*, 5.
- [140] **Riis, S., Hansen, A.C., Johansen, L., Lund, K. ve Pennisi, C.B.** (2020). Fabrication and characterization of extracellular matrix scaffolds obtained from adipose-derived stem cells, *Methods*, 171: 68–76.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Çiğdem İnci Aydemir

**Doğum Tarihi ve Yeri** :

**E-posta** :

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2011, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
- **Yüksek Lisans** : 2014, Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Kök Hücre Üretim Personeli; Liv Hospital, Rejeneratif Tıp, Kök Hücre Araştırma ve Üretim Merkezi (LivMedCell)
- Araştırma Görevlisi, Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre AD

### TEZDEN TÜRETİLEN ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Aydemir Çİ, Taner G. Comparison of the Effectiveness of Different Decellularization Methods in Obtaining Extracellular Matrix from Long-Term Cell Culture 6th International Azerbaijan Congress On Life, Engineering, Mathematical, And Applied Sciences, Baku, 20-22 March, 2024.
- Kısa ve Uzun Süreli Hücre Kültürlerinden Farklı Hücresizleştirme Yöntemleri ile Elde Edilen Ekstrasellüler Matris Yapısı İçeriğinin ve Sito/Genotoksik Etkilerinin Araştırılması,(2023-2024), TÜBİTAK Proje No: 223S660, Yürütücü.

### DİĞER ESERLER, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Selek, A., Halbutoğulları, Z. S. U., Aydemir, Ç. İ., Cetinarıslan, B., Canturk, Z., Tarkun, I., & Erdal, K. (2023). Letrozole Decreased Testosterone-Induced Cell Proliferation and Prolactin Secretion also Increased Apoptosis in MMQ and GH3 Rat Prolactinoma Cell Lines, *Mol Neurobiol*, 60, (5), 2442-2454.

- Dereli, G. C., Taner, G. & Aydemir, Ç. İ. (2023). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic/antigenotoxic effects of resveratrol in human limbal explant cultures, *Int Ophthalmol*, 43, (6),1977-1985.
- Parın, F.N., Aydemir, Ç.İ., Taner, G., & Yildirim, K. (2021). Co-electrospun-electrosprayed PVA/folic acid nanofibers for transdermal drug delivery: Preparation, characterization, and in vitro cytocompatibility, *Journal of Industrial Textiles*, 51, 1323S - 1347S.
- Dai, A., Başpınar, O., Yeşilyurt, A., Sun, E., Aydemir, Ç. İ., Öztel, O. N. & Karaöz E. (2018). Efficacy Of Stem Cell Therapy In Ambulatory And Nonambulatory Children With Duchenne Muscular Dystrophy -Phase I-II., *Degener Neurol Neuromuscul Dis*, 1179-9900, 8, 63-67.
- Kabatas, S., Civelek, E., İnci, Ç., Yalçınkaya, E. Y., Günel, G., Kır, G., Albayrak, E., Karaöz E. (2018). Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in a Patient with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Pilot Study, *Cell Transplantation*, 0963-6897, 1425-1433.
- Ogulur, I., Gurhan, G., Aksoy, A., Duruksu, G., İnci, C., Filinte, D., Kombak, F.E., Akkoc, T. (2014). Suppressive effect of compact bone-derived mesenchymal stem cells on chronic airway remodeling in murine model of asthma, *Int Immunopharmacol*, 6;20(1):101-109.
- Yuksel, S., Guleç, M. A., Gultekin, M. Z., Adanır, O., Caglar, A., Beytemur, O., Küçük yıldırım, B.O., İnci, Ç. & Karaoz, E. (2016). Comparison of the Early-Period Effects of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma on Achilles Tendon Ruptures in Rats, *Connective Tissue Research*, (5):360-73.
- Karaöz, E. & İnci, Ç. (2016). Umbilical Cord Tissue and Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Properties and Therapeutic Potentials. Perinatal Tissue-Derived Stem Cells: Alternative Sources of Fetal Stem Cells, *B. Arjmand, Cham, Springer International Publishing*, 41-63.
- Aydemir, Ç.İ., Temiztürk, H. E. & Taner, G. (2024) In vitro Cytotoxicity and Genotoxicity/Antigenotoxicity Evaluation of Encapsulated Black Garlic Extracts on A549 Cells, *Journal of Bursa Faculty of Medicine*, 2 2, 59–68.
- Karaöz, E & İnci, Ç. (2014). Tedavide Kullanılan Kök Hücreler, Kaynakları ve Eldesi, *Turkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics*, 7(3):7-16.
- Koyun, M., Aydemir, Ç. İ., Taner, G. & Can, G. D. (2022). Determination of the Genoprotective Effects of Rosmarinic Acid On Limbal Stem Cells by Comet Assay, PP-24, *11th International Congress of the Turkish Society of Toxicology*, Antalya, Turkey.
- Karaoz, E., Subasi, C., Albayrak, E., İnci, C., Fayda, M., Akat, A. (2016). Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes do not Promote the Proliferation of Cancer Cells. Chemical Approaches To Targeting Drug Resistance In Cancer Stem Cells, *Cost Action Cm1106, 4th Workshop*, P7, Chioggia.
- Duruksu, G., İnci, C. & Karaoz, E. (2014). The effect of extracellular matrix proteins on cell viability and growth of pancreatic beta cell line BRIN-BD11, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine (TERMIS-EU)*, Deagu, South Korea.

- İnci, Ç., Duruksu, G. & Karaöz, E. (2014). Response of Pancreatic Beta Cells to Extracellular Matrix Proteins: Viability, Proliferation and Functionality, *Frontiers in Medical Sciences: Diabetes, Cancer and Their Connection*, P159, Marma Convention Center, Maltepe University, Istanbul/Turkey.
- Yusufoglu, S., Aksoy, A., Inci, C., Saglam, O., Erman, G., Birsen, G. & Karaoz, E. (2014). The Effects Of CD4+ And CD8+ T Cells On Human  $\beta$  Cells Derived From Type 1 Diabetic Patients And Healthy Individuals, *Beta Cells in Health and Disease*, P-8, Kocaeli.
- Karaöz, E., Aksoy, A., Yusufoglu, S., İnci, Ç., Sağlam, Ö. & Erman, G. (2014). Tip 1 Diyabetik ve Sağlıklı Hastalardan Elde Edilen CD4+ Ve CD8+ T Hücrelerinin İnsan Beta Hücrelerine Etkisi, *Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi*, P-51, Kocaeli.
- İnci, Ç., Duruksu, G. & Karaöz, E. (2014). Pankreatik Beta Hücrelerin Hücre Dışı Matriks Proteinlerine Yanıtı: Canlılık, Çoğalma Ve Fonksiyon, *Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi*, P-49, Kocaeli.
- Karaöz, E., Aksoy, A., İnci, Ç., Ünal, Z. S. & Duruksu, G. (2014). Deneysel tip 1 diyabet geliştirme modeli. 1. *Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi*, PP-29, S-02, Kocaeli.
- Can, G. D., Taner, G. & Aydemir, Ç. İ. (2020). Resveratrolün Mitomisin-C Kaynaklı Kornea Epitel Hücre Hasarına Karşı Kemoprotektif Etkisi, *OD 2020 Sanal Ulusal Kongresi ve Canlı cerrahi Bileşik Toplantısı*, SS-066.
- İnci, Ç. & Karaöz, E. (2015). Pankreatik Adacık Kaynaklı Kök Hücrelerin Sitokin Aracılığıyla Apoptoza Yönlendirilmiş Beta Hücreleri Üzerindeki Koruyucu Etkileri, *51. Ulusal Diyabet Kongresi*, HTSS-10, S.180, Antalya.
- Gürhan, G., Ögülür, İ., Duruksu, G., İnci, Ç., Filinte, D., Kombak, E., Barlan, I.B., Akkoç, T. (2013). Sıçan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Akut Astım Fare Modelinde Histopatoloji ve Sitokin Düzeyleri Üzerine Etkisi, *XX. Ulusal Allerji & Klinik İmmünoloji Kongresi*, P-158, Antalya.