

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KERATİN TEMELLİ İSKELE ÜRETİMİ VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ
UYGULAMALARI İÇİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tuğba SEZGİN ARSLAN

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 04/01/2017

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Ahmet Lütfi UĞUR

ÇANAKKALE

Tuğba SEZGİN ARSLAN tarafından Doç. Dr. Ahmet Lütfi UĞUR yönetiminde hazırlanan ve **04/01/2017** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Keratin Temelli İskele Üretimi ve Doku mühendisliği Uygulamaları için Etkinliğinin Değerlendirilmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Doç. Dr. Ahmet Lütfi UĞUR

.....

Başkan

Doç. Dr. Fadime KIRAN

.....

Üye

Yrd. Doç. Dr. Zikriye ÖZBEK

.....

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu tez çalışması, 0111.TGSD.2013 kodlu Sanayi Bakanlığı Teknogirişim Sermayesi tarafından desteklenmiştir.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



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 belirttiğimi beyan ederim.

Tuğba SEZGİN ARSLAN

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması boyunca bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek engin fikirleriyle yetişmeye ve gelişmeye katkıda bulunan danışman hocam sayın Doç. Dr. Ahmet Lütü UĞUR'a,

Çalışmalarımın her aşamasında maddi ve manevi olarak yanımda olan, laboratuvar imkanlarını açan, özellikle hücre kültürü çalışmalarında engin bilgi ve tecrübeleriyle bana ışık tutan, zor zamanlarımda desteğini hep hissettiğim sevgili eşim Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN'a,

Deneysel çalışmalarımı birlikte gerçekleştirdiğim ve manevi destekleriyle yanımda olan laboratuvar arkadaşlarım Burcu EFE, İlkim KANTARCIOĞLU, Evren ERTEN ve Furkan GALATA'ya,

Tez çalışmasının bir bölümü TPE 2014 02104 tescil numaralı ulusal patent kapsamında olup, **0111.TGSD.2013** kodlu Sanayi Bakanlığı Teknogirişim Sermayesi Desteği projesi tarafından desteklenmiştir. Dolayısıyla adı geçen kuruma,

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini hep hissettiğim annem, babam ve kardeşime en derin duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Tuğba SEZGİN ARSLAN

Çanakkale, Ocak 2017

SİMGELER VE KISALTMALAR

DMİ	Doku mühendisliği iskelesi
HDM	Hücre dışı matriks
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
FTIR	Fourier dönüşümlü kızıl ötesi
TGA	Termal gravimetrik analiz
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
XPS	X-ışını fotoelektron spektroskopisi
XRD	X-ışını difraksiyon
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PLA	Poli(laktik asit)
PLLA	Poli(L-laktik asit)
PGA	Poliglikolik asit
PLGA	Poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit)
PCL	Polikaprolakton
PDLA	Poli(D-laktik asit)
PDLLA	Poli(D,L-laktik asit)
PHB	Poli(hidroksi bütirat)
PHBV	Poli(hidroksibütirat-ko-hidroksivalerat)
CaP	Kalsiyumfosfat
HA	Hidroksi apatit
β -TCP	β -trikalsiyum fosfat
BSA	Sığır serum albumin
DMAB	4-(dimetilamino)benzaldehit
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl-2,5-difenil tetrazolyum bromür
iPKH	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
EKH	Embriyonik kök hücre
iAMKH	İnsan adipoz mezenkimal kök hücre
MKH	Mezenkimal kök hücre
HKH	Hematopoieik kök hücre
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi
BSE	Sığır süngerimsi ensefalopati

TSE	Bulaşıcı süngerimsi ensefalopati
BMP-2	Kemik morfogenetik faktör-2
NHS	N-hidroksi süksinimit
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimit
MES	2-morfolinoetansülfonik asit
DMSO	Dimetilsülfoksit
PBS	Sodyum klorür içeren fosfat tamponu



ÖZET

KERATİN TEMELLİ İSKELE ÜRETİMİ VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tuğba SEZGİN ARSLAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Doç. Dr. Ahmet Lütfi UĞUR

04/01/2017, 81

Bu çalışmada, keratin insan saçından ekstrakte edilmiş (Tescilli patent: TPE 2014 02104) kollajen ise *Rhizostoma pulmo* türü denizanasından izole edilmiştir. Elde edilen protein ekstraktlar, Lowry protein, hidroksiprolin ve serbest sülfidril grup tayini ve SDS-PAGE ile karakterize edilmiştir. Denizanası kollajeni ve insan saç keratin ekstraktları % 3 (w/v) konsantrasyonda ultra saf suda çözölmüş ve dondurma-kurutma tekniğı kullanılarak kollajen ve kollajen-keratin süngerimsi iskeleler üretilmiştir. Elde edilen süngerimsi üç-boyutlu doku mühendisliğı FTIR, TGA ve SEM ile karakterize edilmiştir. Biyoiskelelerin gözenek çapları kollajen ve kollajen-keratin için yaklaşık olarak $68,65 \pm 17 \mu\text{m}$ ve $64,08 \pm 17,93 \mu\text{m}$ 'dir. Ayrıca sıvı yerdeğıştirme yöntemi ile yapılan analiz sonucuna göre kollajen iskelelerin gözenekliliğı % $89,93 \pm 0,83$ (n=3), kollajen-keratin iskelerin gözenekliliğı ise % $95,14 \pm 0,30$ (n=3) olarak hesaplanmıştır. İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iAMKH) kültüre edilmiş ve *in vitro* çoklu soy farklılaşma kapasitelerini belirlemek amacıyla, adipojenik, osteojenik ve kondrojenik indüksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Kök hücreler daha sonra süngerimsi üç-boyutlu DMI'ler üzerine ekilmiştir ve iskeleler üzerinde hücre canlılığı MTT temelli mitokondriyal dehidrogenaz aktivite testi ile değerlendirilmiştir ve sitotoksik etki gözlenmemiştir. Ayrıca iskeleler üzerindeki hücre yoğunluğunun günden güne arttığı mikroskopik gözlemlerle kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, kollajen ve kollajen-keratin iskelelerin doku mühendisliğı uygulamalarında kullanılabilecek potansiyel adaylar olabilecekleri düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Dondurma-Kurutma, İnsan Adipoz Mezenkimal Kök Hücreler, Keratin, İskele, Denizanası Kollajeni, Doku Mühendisliğı.

ABSTRACT

KERATIN-BASED SCAFFOLD FABRICATION AND EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS

Tuğba SEZGİN ARSLAN

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural And Applied Sciences

Master of Science Thesis in Bioengineering and Materials Science Engineering

Advisor : Assoc. Prof. Ahmet Lütfi UĞUR

04/01/2017, 81

In this study, keratin was extracted from human hair (National registered patent : TPE 2014 02104) and collagen was also isolated from *Rhizostoma pulmo* species jellyfishes. Obtained protein extracts were characterized by Lowry protein, hydroxyprolin and free sulfhydryl assay and SDS-PAGE. And then jellyfish collagen and human hair keratin extracts were dissolved in distilled water at a concentration of 3 % (w/v). Collagen and collagen-keratin spongy scaffolds were fabricated via freeze-drying technique. The resultant spongy 3D-TES were characterized by FTIR, TGA and SEM. Pore diameters of collagen and collagen-keratin bioscaffolds were approximately $68,65 \pm 17 \mu\text{m}$ and $64,08 \pm 17,93 \mu\text{m}$, respectively. The porosity of collagen was determined to be $89,93 \pm 0,83 \%$ porous (n=3) and the porosity of collagen-keratin scaffolds was also determined to be $95,14 \pm 0,30 \%$ porous (n=3) by liquid displacement analysis. Human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAMSCs) were expanded and induced into adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages to determine their *in vitro* multi-lineage differentiation capacity. Stem cells were seeded onto these spongy 3D TES and cell viability was assessed by MTT based mitochondrial dehydrogenase activity test and there was no cytotoxic evidence for these scaffolds. Microscopic observations also showed that cell density increased day by day. In conclusion, it is believed that collagen and collagen-keratin scaffolds have the potential candidates to use in tissue engineering applications.

Keywords: Freeze-Drying, Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells, Keratin, Scaffold, Jellyfish Collagen, Tissue Engineering.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1. Doku Mühendisliği.....	3
1.2. Doku Mühendisliği Temel İlkeleri.....	3
1.3. Hücreler.....	5
1.4. Kök Hücreler	6
1.5. Biyomalzemeler	9
1.5.1. Sentetik Biyomalzemeler.....	11
1.5.2. Doğal Biyomalzemeler	15
BÖLÜM 2	29
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	29
BÖLÜM 3	33
MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Deneylerde Kullanılan Malzemeler.....	33
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	34
3.2. Yöntem.....	35

3.2.1. İnsan Saçından Keratin Ekstraksiyonu	36
3.2.2. Denizanasından Kollajen İzolasyonu	38
3.2.3. Sıçan Kuyruğundan Kollajen Tip I İzolasyonu	39
3.2.4. İnsan Saç Keratini ve Denizanası Kollajeninin Biyokimyasal Analizi	41
3.2.5. Kollajen ve Kollajen-Keratin Biyokompozit DMI'lerin Üretimi.....	47
3.2.6. İskelelerin Fizikokimyasal Analizi.....	48
3.2.7. İskelelerin Gözenekliliğinin Belirlenmesi	48
3.2.8. Kök Hücrelerin Kültüre Edilmesi ve Farklılaşma Testlerinin Yapılması	49
3.2.9. Keratin ve Keratin-Kollajen DMI'ler Üzerine Hücre Ekilmesi	51
3.2.10. İskele Üzerine Ekilen Hücrelerin Canlılık Düzeylerinin Belirlenmesi	51
3.2.11. Taramalı Elektron Mikroskop Analizi.....	52
3.2.12. İstatistiksel Analiz	53
BÖLÜM 4.....	54
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	54
4.1. İnsan Saçından Keratinin Ekstraksiyon Metodunun Optimizasyon Çalışmaları	54
4.2. Denizanasından Kollajen İzolasyonu ve Atelokollajen Eldesi	58
4.3. Keratin ve Atelokollajenin Biyokimyasal Karakterizasyonu.....	58
4.4. İskelelerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu	62
4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	65
4.6. İskele ve Hücre-iskele Yapılarının Morfolojik Olarak Karakterizasyonu	68
BÖLÜM 5	71
SONUÇLAR ve ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Doku mühendisliği temel ilkeleri	4
Şekil 1.2. Doku mühendisliğinin temel bileşenleri	4
Şekil 1.3. Simetrik ve asimetrik kök hücre bölünmesi	6
Şekil 1.4. Kök hücre tipleri	7
Şekil 1.5. MKH kaynakları ve çoklu soy farklılaşma potansiyeli	8
Şekil 1.6. Mikroçevre diyagramı	11
Şekil 1.7. Bazı sentetik polimerlerin kimyasal yapıları	12
Şekil 1.8. Domuz üriner sisteminden elde edilen ekstra selüler matriks	18
Şekil 1.9. Kollajenin yapısı (a) Kollajen α zincir üçlü heliks yapısı (b) tropokollajen molekülleri (c) 10-300 nm çapındaki kollajen fibril (d) Kollajen fibrillerin bir araya gelerek oluşturduğu 0.5-3 μ m çapındaki bir kollajen fiber.....	19
Şekil 1.10. Kitin ve kitosanın yapıları	20
Şekil 1.11. (a) Deniz süngerı lanthella basta'nın iskeleti (b) lanthella basta'dan elde edilen iki boyutlu kitinli örgü (c) Verongula gigantea süngerı (sağda) ve ondan elde edilmiş iki boyutlu kitinli iskele (solda)	21
Şekil 1.12. (a) Gelatin/aljinat biyokompozit iskele (b) İskelelerin SEM mikrofrafisi.....	22
Şekil 1.13. Klinik ve deneysel olarak fibrinin kullanım alanları	23
Şekil 1.14. İpek fibroini ile üretilen biyomalzemeler (a) hidrojel (b) toz formda ipek fibroini (c) 3D gözenekli iskele (d) doğal ipek liflerinin SEM görüntüsü (e) ipek mikroparçacıklarının SEM görüntüsü.....	24
Şekil 1.15. Memeli, kuş ve sürüngenlerin çeşitli dokularında oluşan keratin tipleri.....	25
Şekil 1.16. İnsan saçı keratin temelli biyomalzemelerin biyomedikal uygulamaları	27
Şekil 3.1. İnsan saçından keratin ekstraksiyonunun şematik gösterimi.....	38
Şekil 3.2. Denizanasından kollajen izolasyonunun şematik gösterimi	39
Şekil 3.3. Sıçan kuyruğundan kollajen tendon izolasyonu	40
Şekil 3.4. Lowry protein tayin metodu için muhtemel reaksiyon mekanizması.....	41
Şekil 3.5. SDS-PAGE analizi	45
Şekil 3.6. Ellman's reaksiyonu	47
Şekil 3.7. Doku mühendisliği iskeleleri.....	48
Şekil 3.8. MTT reaksiyonu	52
Şekil 4.1. Yöntem 1'de keratin ekstraksiyon reaksiyonu	55
Şekil 4.2. Na ₂ SO ₃ 'ün disülfid bağını kırması	55

Şekil 4.3. Alkali hidroliz reaksiyonu	56
Şekil 4.4. 2-merkaptotanol gerçekleşen ile ekstraksiyon reaksiyonu	56
Şekil 4.5. Lowry metodu ile elde edilen BSA standart kalibrasyon grafiği	57
Şekil 4.6. Lowry metodu ile elde edilen sıçan kuyruğu tip I kollajenin standart kalibrasyon grafiği.....	58
Şekil 4.7. Denizanası ve sıçan kuyruğu tip I kollajenin SDS-PAGE analizi.....	59
Şekil 4.8. Keratin ekstraktların ve BSA'nın SDS-PAGE analizi	60
Şekil 4.9. Hidroksiprolin içerik analizi	61
Şekil 4.10. L-sistein standart kalibrasyon grafiği	61
Şekil 4.11. Tüm yöntemlerle elde edilen indirgenmiş keratindeki serbest sülfidril grup içerikleri	62
Şekil 4.12. Biyoiskelelerin FTIR spektrumları	63
Şekil 4.13. Biyoiskelelerin termogravimetrik analizi	64
Şekil 4.14. Kök hücrelerin in vitro çoklu-soy farklılaşma kabiliyetlerinin belirlenmesi Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (A), kondrojenik pellet (B), adipogenezis ve oil red O ile karakterizasyonu (C,D), osteogenezis ve alizarin red S ile karakterizasyonu (E,F), kondrogenezis; safranin O boyaması (G) ve alcian blue 8gx boyaması (H)	66
Şekil 4.15. Kollajen ve kollajen-keratin biyoiskeleler üzerinde iAMKH'lerin 3,7 ve 14. günlerdeki çoğalma ve canlılık düzeyleri	67
Şekil 4.16. MTT reaktifi ile muamele edilmiş biyoiskelelerin makroskobik görüntüsü	68
Şekil 4.17. DMİ'lerin gözenekliliğinin SEM ile belirlenmesi (A) çapraz bağlı kollajen DMİ (x250 büyütme), (B) çapraz bağlı kollajen DMİ (x50 büyütme), (C) çapraz bağlı kollajen-keratin DMİ (x250 büyütme), (B) çapraz bağlı kollajen-keratin DMİ (x50 büyütme)	69
Şekil 4.18. İskelelerin SEM mikrografileri (A) kollajen DMİ üzerine tutunmuş iAMKH'ler (3.gün), (B) 3. gün kollajen-keratin DMİ, (C) 7. gün kollajen DMİ, (D) 7. gün kollajen-keratin DMİ, (E) 14. gün kollajen DMİ, (F) 14.gün kollajen-keratin DMİ.....	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Doku mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bazı sentetik polimerler ve özellikleri	13
Çizelge 1.2. Doku mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bazı doğal polimerler ve özellikleri	16
Çizelge 1.3. Doğal ve sentetik biyomalzemelerin avantajları ve dezavantajları bakımından karşılaştırılması	17
Çizelge 3.1. Ekstraksiyon yöntemleri	37
Çizelge 3.2. SDS-PAGE jel hazırlama çözeltileri ve prosedürü (jel kalınlığı 0,75 mm)	44
Çizelge 3.3. Coomassie Blue R250 boyama çözeltileri	45
Çizelge 4.1. Lowry yöntemine göre belirlenen protein konsantrasyonları ve (%) verim....	57

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Rejeneratif tıp içerisinde yer alan doku mühendisliği, hasar görmüş veya yapısal ya da işlevsel eksikliği olan dokuların onarılması amacıyla yeni biyolojik eşdeğerlerinin geliştirilmesini hedefleyen malzeme mühendisliği ve moleküler biyoloji temel prensiplerini içeren multidisipliner bir bilim dalıdır (Kim ve ark., 2008). Doku mühendisliğinin temelini hücreler ve biyomalzemeler olmak üzere iki önemli bileşen oluşturmaktadır. Kök hücreler, progenitör hücreler veya farklılaşmış primer hücreler olmak üzere doku mühendisliğinde kullanılacak üç farklı hücre tipi vardır. Farklılaşmamış hücreler olan kök hücreler, kendini sürekli yenileme ve sınırsız çoğalma kapasiteleri ile tanımlanmaktadırlar. Embriyonik kök hücreler (EKH'ler), somatik veya yetişkin kök hücreler, doku veya organlarda bulunan yetişkin kök hücreler veya farklılaşmış yetişkin hücrelerden yeniden programlanarak embriyonik kök hücrelere dönüştürülen indüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPKH'ler) farklı kök hücre tiplerini oluşturmaktadırlar (Lorenti ve ark., 2012). Son zamanlarda kök hücre biyolojisi alanı EKH ve yetişkin kök hücrelerin izolasyonundan dolayı daha fazla dikkat çekmeye başlamıştır. Her bir hücre tipinin özel biyolojik özelliklerinden dolayı kısıtlamaları ve avantajları mevcuttur. Sınırsız pluripotensiyelliklerine rağmen EKH'ler, tümör oluşumu gibi istenmeyen farklılaşmaları, etik ve yasal bazı kaygılar nedeniyle temel araştırma ve klinik uygulamalarda kullanılamayan hücre kaynaklarıdır (Seo ve Na, 2011) . Buna rağmen yenilenme ve çoğalma özellikleri ile yetişkin kök hücreler, doku rejenerasyonu için umut verici hücre kaynağı olarak ortaya çıkmıştır. İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAMKH'lerin) rejeneratif tıp açısından belli avantajları vardır (Seo ve Na, 2011; Jung ve Kleinheinz, 2014).

Doku mühendisliği iskeleleri (DMİ) hücre adezyonu, proliferasyonunu ve farklılaşmasını hızlandırarak hasarlı dokuların iyileşmesine destek olabilir. DMİ'lerin seçimi ve dizaynı doku mühendisliğinde önemli bir rol oynamaktadır (Huang ve Fu, 2010). DMİ üretimi için kullanılan polimerler genel olarak sentetik veya doğal polimerler olarak sınıflandırılabilir. Polilaktik asit (PLA), poli(L-laktik asit)(PLLA), poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poliglikolik asit (PGA) ve polikaprolakton (PCL) sıklıkla kullanılan sentetik polimerlerdir. Doğal polimerlere ise kollajen, kitosan, sodyum aljinat, jelatin ve pektin örnek verilebilir (Mallick ve ark., 2016). Doğal ve sentetik polimerlerin bazı avantajları ve dezavantajları vardır. Örneğin, sentetik malzemelerde hücresel tanıma

sinyalleri yoktur. Doğal olarak türevlenmiş polimerlerin ise işlenmesi ve parçalanma hızını kontrol etmek zordur. Bu sorunları çözmek için rekombinant protein teknolojilerinin kullanımı önerilmektedir. Rekombinant doğal polimerler, sentetik polimerlerin istenilen birçok özelliğini birleştirebildiği için hücre adezyonu ve büyümesini destekleyen malzemeler için iyi adaylardır. Birçok ilginç doğal kaynaklı polimerler doku mühendisliği araştırmalarında kullanılmaktadır (Huang ve Fu, 2010). Örneğin kollajen 1970-1980 yılları arasında akademik ve ticari araştırmacılar tarafından mükemmel biyouyumluluk, düşük antijenite, yüksek biyobozunurluk, iyi mekaniksel, hemostatik ve hücre bağlama gibi özelliklerinden dolayı çeşitli bağ doku uygulamalarında biyomalzeme olarak kullanılmaya başlanmıştır (Song ve ark., 2006). Kollajen ekstraksiyonu için başlıca kaynaklardan biri olan sığır kullanımı sığır süngerimsi ensefalopati (BSE) ve bulaşıcı süngerimsi ensefalopati (TSE) hastalıklarının oluşma ihtimalinden dolayı risklidir. Alternatif olarak domuz kollajeni, deniz süngeri ve deniz anası kollajeni kullanılabilir (Song ve ark., 2006; Swatschek ve ark., 2002). Yapısal ve fiziksel özellikleri nedeniyle son zamanlarda keratinler de yara iyileşmesinde, ilaç sanayisinde, doku mühendisliğinde ve medikal aletlerin uygulamalarında yer alan biyomalzemelerin gelişimine katkı sağlamaktadır (Reichl ve ark., 2011). İnsan ve hayvan derisinin stratum korneum epidermisinin temel yapı parçasını oluşturan keratinler; boynuz, toynak, saç, tüy ve tırnak gibi ekzoiskelet yapılarında da bulunmaktadır (Kakkar ve ark., 2014). Ayrıca yapılan çalışmalar neticesinde keratinin diğer malzemelerle (doğal proteinler ve polisakkaritler) oluşturulan kompozitlerinin istenilen özellikte malzeme üretiminde daha iyi olduğu düşünülmektedir (S. Wang ve ark., 2015).

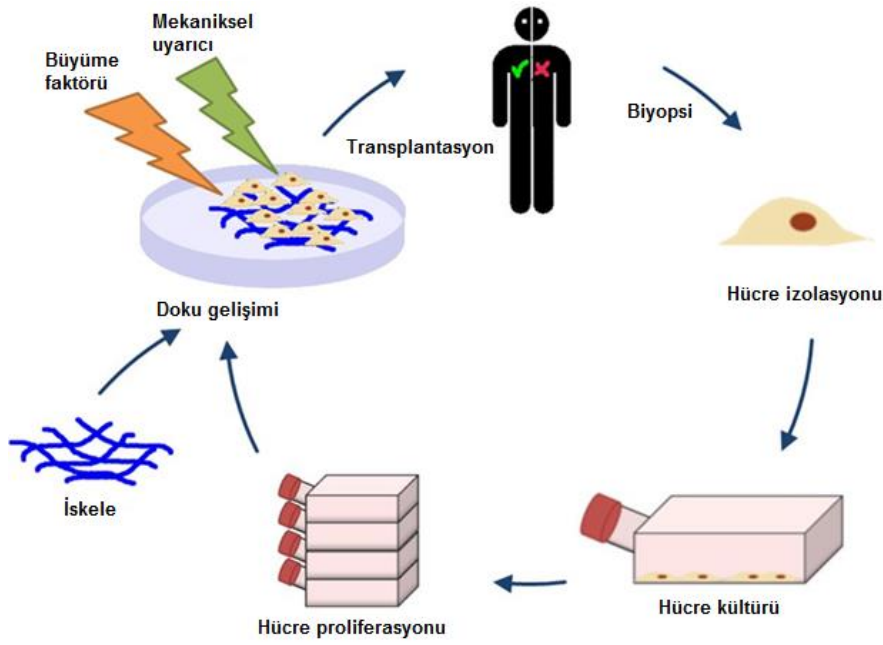
Bu tez çalışmasında insan saçından ekstrakte edilmiş keratin ile *Rhizostoma pulmo* türü denizanasından izole edilen kollajen belli oranlarda karıştırılıp kompozitleri oluşturularak 3-boyutlu süngerimsi doku mühendisliği iskeleleri üretilmiştir. Elde edilen DMİ'ler SEM, FTIR ve TGA ile karakterize edilmiştir. iAMKH'ler satın alınmış ve kök hücre çoğaltma vasatında kültüre edilmiştir. Kök hücrelerin *in vitro* çoklu soy farklılaşma kapasitelerini belirlemek amacıyla, adipojenik, osteojenik ve kondrojenik indüksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Kök hücreler daha sonra süngerimsi üç-boyutlu DMİ üzerine ekilmiştir ve iskeleler üzerinde hücre canlılığı MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) temelli mitokondriyal dehidrogenaz aktivite testi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca bu yüzeylerdeki hücre tutunması SEM ile analiz edilmiştir.

1.1. Doku Mühendisliği

İnsan vücudunda; hastalık, yaralanma ve travma nedeniyle oluşan hasarların rejenerasyonu veya tamir edilmesi gerekmektedir. Genel olarak tedavi hastanın kendisinden (otogreft) veya başka bir bireyden alınan dokunun (transplant veya allogreft) transplante edilmesi ile gerçekleştirilir. Her iki teknik de hayat kurtarıcı olmasına rağmen büyük sorunları da beraberinde getirmektedir. Otogreftlerin eldesi pahalı, ağırlı ve anatomiksel olarak sınırlıdır. Ayrıca hematoma ve enfeksiyondan dolayı donör saha morbiditesine neden olabilmektedir. Benzer şekilde verici doku kaynağı kısıtlamaları, doku reddi ve vericiden bulaşabilecek olan enfeksiyon riski gibi sebeplerden ötürü allogreftler ve transplantların kullanımı da kısıtlıdır (O'Brien, 2011; Arslan ve ark., 2015). Alternatif olarak, doku mühendisliği hastalıklı veya hasarlı dokunun iyileşmesini hızlandıran yeni tedavi edici bir stratejidir. Aralarında açık bir tanımlama olmamakla birlikte “doku mühendisliği”, “rejeneratif tıp”, “hücrel tedavi” ve “hücre transplantasyonu” gibi birkaç teknik terim kullanılabilmektedir (Ikada, 2006). Doku mühendisliği teknolojilerinin kullanımıyla başarılı bir rejenerasyon sağlanması biyomalzeme, ilaç ve biyolojik alanların işbirliğine ihtiyaç duymaktadır (Huang ve Fu, 2010). Doku mühendisliği alanı son on yılda çok fazla gelişme kaydetmiş ve insan vücudunun hemen hemen her doku ve organının rejenerasyonunu sağlayabilen potansiyel bir aday haline gelmiştir. Araştırmacılar, deri, kıkırdak, kemik, karaciğer, kalp kapakçıkları ve arterler, mesane, pankreas, sinir, kornea ve diğer çeşitli yumuşak dokuların geliştirilmesi için çalışmışlardır (Dhandayuthapani ve ark., 2011).

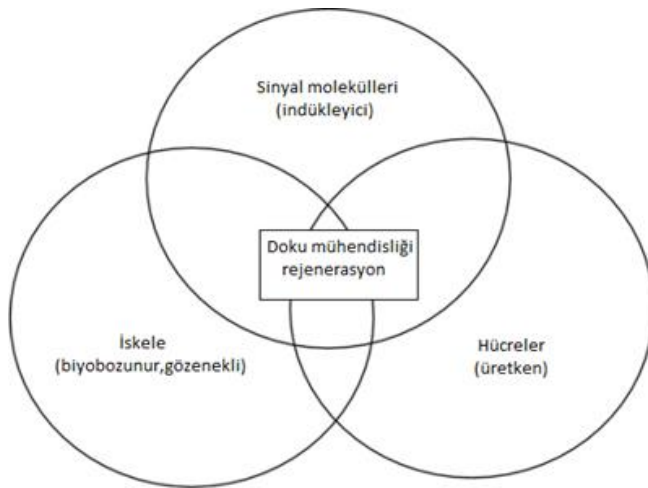
1.2. Doku Mühendisliği Temel İlkeleri

Doku mühendisliği hücrel biyoloji, biyomalzemeler ve mühendislik bilimlerini birleştiren, hasarlı veya kaybedilmiş dokuların tedavisinde potansiyel bir aday olarak öngörülen multidisipliner bir alandır (Akbari ve ark., 2016; Mansouri ve Bagheri, 2016). Bu teknik, biopsi ile alınan küçük bir dokudan hücre izolasyonunu, hücrelerin *in vitro* ortamda çoğalmasını ve daha sonra bu hücrelerin yeni bir doku veya organ oluşturmak için biyobozunur ve gözenekli bir iskele üzerinde kültürünü içermektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Doku mühendisliği temel ilkeleri
(https://en.wikipedia.org/wiki/Tissue_engineering)

Hücreli iskele tekrar hastaya transplante edildikten sonra zamanla degradasyona uğramakta ve yerine çoğalan ve farklılaşan hücrelerin oluşturduğu ekstraselüler matriks geçmektedir. Böylelikle hasarlı doku onarılmaktadır. Teorik olarak yeni ve elverişli canlı dokuların üretilmesi için canlı hücreler, matriks veya iskele ve sinyal molekülleri gibi bazı temel bileşenlerin bulunması gerekmektedir (Mansouri ve Bagheri, 2016) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Doku mühendisliğinin temel bileşenleri (Seo ve Na, 2011)

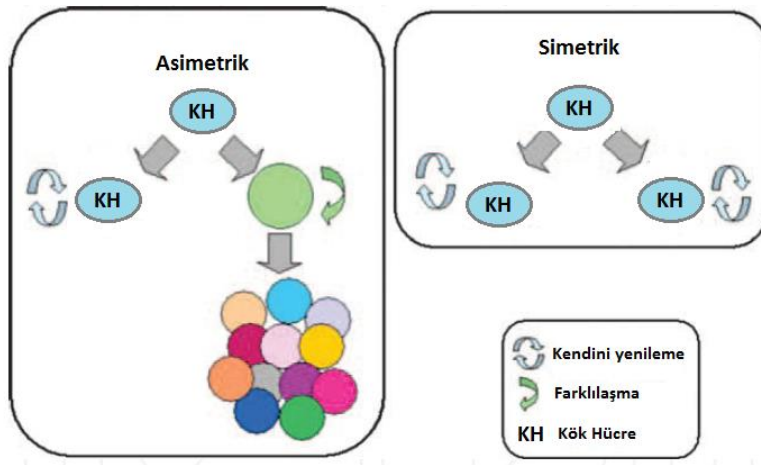
1.3. Hücreler

Doku mühendisliğinde hücreler vericiden alınan küçük bir parça dokudan izole edilirler. Elde edilen bu hücreler ya doğrudan hastaya implante edilirler ya da *in vitro* ortamda kültüre edilerek çoğaltıldıktan sonra destek matriksine tutturulur ve hastaya tekrar implante edilir. Verici doku kaynağı heterolog (kemik gibi), allojenik (aynı türler, farklı bireyler) veya otolog (hastanın kendisinden alınan) olabilmektedir (Koh, 2004). Allojenik özel hücre hatlarının kullanımı hastalık ve yaraların tedavisi için güncel bir yaklaşımdır. Ancak immünojeniteye sebebiyet verebildiklerinden dolayı tedavi süresince bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaç kullanımı gerekmektedir. Kadavradan elde edilen retinal pigment epitel hücreler immün bir bariyer sağlanması için enkapsüle edilmiş ve Parkinson hastalığının tedavisi için kullanılmıştır. Titan Pharmaceuticals® bu konuda klinik araştırmalarda ilerleme sağlamış ve ilk pozitif sonuçlarıyla faz II klinik çalışmalarına devam etmektedir (Fodor, 2003).

İmmünojeniteyi veya hastalık bulaşma riskini en aza indirmek için hücreler hastanın kendisinden izole edilebilirler. Ancak, gerekli olan hücre tipini direkt olarak hastadan temin etmek her zaman kolay olmamaktadır. Örneğin, kardiyomiyositler, osteoblastlar, β hücreleri ve dopaminerjik nöronlar sırasıyla hasarlı kalp dokularını, kemik defektlerini, diyabet ve Parkinson hastalığını tedavi etmek için gerekli olan hücre tipleridir. Bu hücreler böyle hastalıklar veya komplikasyonları olan hastalardan kolayca elde edilememektedir. Bu kısıtlamalar nedeniyle doku mühendisliği stratejileri için alternatif hücre kaynaklarının geliştirilmesi ve bulunması için çalışmalar hız kazanmıştır. Araştırmacılar eksplant dokulardan izole edilen primer hücrelerin kullanımıyla ilgili karşılaşılan bazı sorunların çözümünü sağlayan, istenilen hücre tipine direkt olarak farklılaşabilecek, elde edilmesi daha kolay olan hücre kaynakları keşfetmişlerdir (Polak ve Bishop, 2006; Gersbach, 2011). Bu hücre kaynakları kemik iliği mezenkimal kök hücreler, hematopoietik kök hücreler, kas kaynaklı kök hücreler veya adipoz kaynaklı kök hücreler gibi yetişkin kök hücreler veya progenitör hücrelerdir. Ayrıca, iskelet kasından elde edilen miyoblastlar veya deri fibroblastları gibi yetişkin hücre tipleri de yeniden programlanarak veya transdiferansiye edilerek rejeneratif tıp için yeni bir hücre kaynağı olarak kullanılabilir (Gersbach, 2011). Rejeneratif ve proliferatif özellikleri ile erişkin kök hücreler doku rejenerasyonu için çok uygun kök hücre kaynaklarıdır. Travmatik lezyon sonrası nöronal iyileşme süreçlerini desteklediklerinden dolayı özellikle erişkin kök hücrelerin plastik cerrahideki klinik başarıları kadar operasyonel yetenekleri de kanıtlanmıştır (Jung ve Kleinheinz, 2014).

1.4. Kök Hücreler

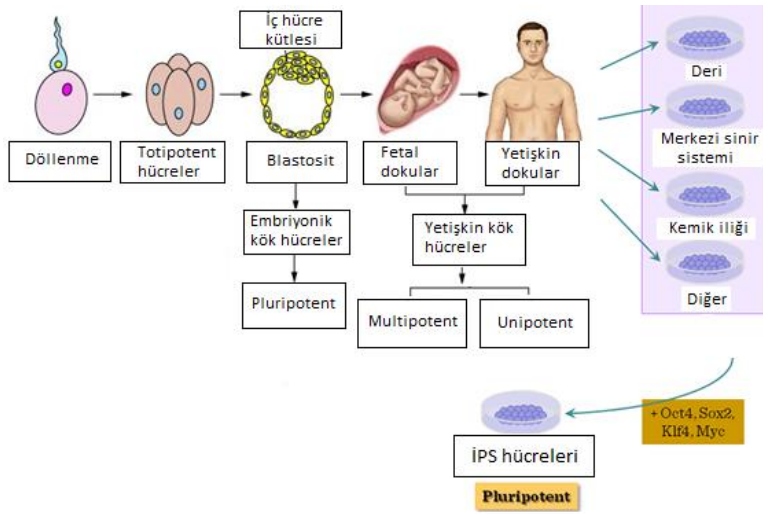
Çoğalabilen farklılaşmamış hücreler olarak tanımlanabilen kök hücreler özelleşmiş hücrelerin bir ya da birkaçına farklılaşabilme ve kendini yenileyebilme kapasitelerine sahiptirler (Baksh ve ark., 2004; Polak ve Bishop, 2006; Hui ve ark., 2011). Kök hücreler simetrik bölünmeyle kendilerini yenileyebilirler. Bu hücre bölünmesi ile tek bir orijinal hücreden iki özdeş kopya (yavru hücre) üretilmektedir. Asimetrik olarak bölünme süresince iki özdeş yavru hücreden biri sabit kalırken diğer hücre sitolojik profilini değiştirebilmekte ve belirli bir hücre tipine farklılaşabilmektedir (Şekil 1.3) (Jung ve Kleinheinz, 2014).



Şekil 1.3. Simetrik ve asimetrik kök hücre bölünmesi (Jung ve Kleinheinz, 2014)

Bütün çok hücreli organizmalarda bulunan kök hücreler, farklı biyolojik fonksiyonları ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşma özellikleri ile birçok doku ve organların gelişimini sağlamaktadırlar. Kök hücreler hastalıklara karşı yapılan savaşta hücre terapisiyle dokuların tamiri için potansiyel sunmaktadır. 21. yüzyılda biyoloji ve tıp alanlarında kök hücre çalışmaları öne çıkmaktadır (Hui ve ark., 2011). Hedeflenen potansiyel terapötik kullanımları spinal kord yaralanmaları, miyokardiyal enfarktüs, Parkinson hastalığı ve diyabet gibi klinik uygulamalar olan kök hücreler, cerrahi tedavide doğrudan yeni bir alan olabilir. Bu yüzden kök hücrelerin temel biyolojisini anlamak önemlidir (Fortier, 2005). Kök hücrelerin sınıflandırılması iki şekilde yapılabilmektedir. Kök hücrelerin alındığı kaynağa göre yapılan sınıflandırma en çok kullanılan sınıflandırmadır. Konak yerlerine bağlı olarak kök hücreler fetüsten veya doğum sonrası bireylerden elde edilen EKH'ler ve yetişkin kök hücreler olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. Kök hücrelerin ikinci ve daha fonksiyonel sınıflandırması gelişme potansiyellerine göre yapılan sınıflandırmadır. Buna göre kök hücreler; totipotent,

pluripotent, multipotent ve unipotent olmak üzere dört başlık altında incelenebilirler (Şekil 1.4) (Can, 2008).



Şekil 1.4. Kök hücre tipleri (Balogh ve Engelmann, 2011)

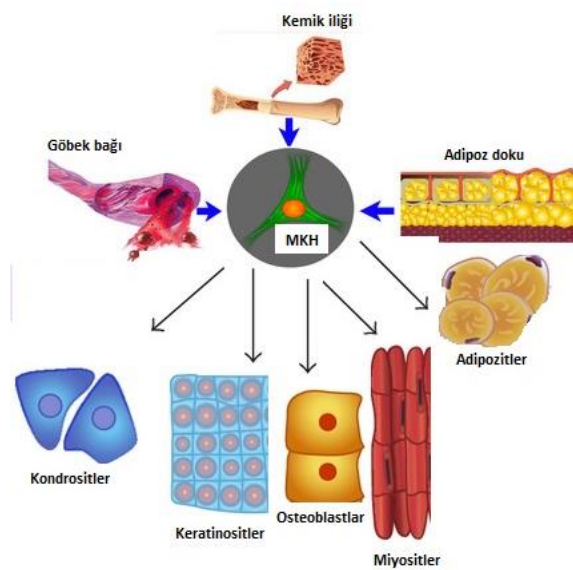
(<http://cursoenarm.net/UPTODATE/contents/mobipreview.htm?25/10/25767>)

Totipotent kök hücreler tam bir organizmayı oluşturma kapasitesine sahip hücrelerdir. Döllenmeden sonra oluşan zigotun, 8 hücreli morula evresine kadar bölünmesiyle meydana gelen hücreler de totipotent özelliktedir. Pluripotent hücreler tüm embriyonik germ tabakalarından (endoderm, mezoderm ve ektoderm) dokuların oluşumunu sağlamaktadırlar. Multipotent kök hücreler ise hücre soylarının daha kısıtlı bir alt kümesini oluşturma kabiliyetindedirler. Unipotent kök hücreler sadece bir hücre tipini üretebilmektedirler (Fortier, 2005).

EKH'ler, blastosist safhasındaki (bu süreç insanlarda döllenmeden sonraki 5-6 gün içinde gerçekleşir) embriyonun iç hücre külesinden izole edilmektedirler. Klinik uygulamalar için EKH'lerin kullanımının birçok avantajları mevcuttur. Bunlardan ilki, EKH'lerin farklılaşma olmadan belirlenen koşullar altında sınırsız çoğalma kapasitesine sahip olmasıdır. EKH'ler implante edilmeden önce rejeneratif doku tamiri için istenilen birçok hücre tipine farklılaşabilmektedir. Bir başka önemli avantaj ise minimal genetik manipülasyon göstermeleri ve bunun bir sonucu olarak iPKH hatlarıyla kıyaslandığında anormal tümör oluşma riskinin daha az olmasıdır. EKH'ler terapötik klonlama uygulamaları boyunca genetik hastalıkların tedavisinde önemli bir potansiyele sahiptir. EKH'lerin klinik faydalarına rağmen kullanımlarını kısıtlayan bazı dezavantajları da ele alınmalıdır. Rutin olarak iç hücre külesinden izole etmek için kullanılan metotlar bir embriyonun tahribatına sebebiyet verdiği için türler arasında özellikle insan EKH

araştırmalarında etik kaygılara yol açmaktadır. EKH'lerin klinik uygulaması için bir başka endişe ise allojenik immünojenite gösterme potansiyelleridir. Bir diğer önemli dezavantajı ise EKH hatlarını farklılaşmamış durumda kalmasını sağlamak ve çoğaltmak için spesifik ve komplike kültür ortamının gerekli olmasıdır. Ayrıca fenotipik stabilitelerinin sağlandığından emin olmak adına kültür ortamındaki hücrelerin genomik durumundaki değişimlerinin sıklıkla izlenmesi gerekmektedir. EKH'lerin verimliliğinde önemli bir rol oynayan blastosistin genetik alt yapısı da çözülmesi gereken bir diğer problemidir. İlaveten cerrahi implantasyon öncesi EKH'ler farklılaşmış bir hücre tipine tamamen yönlendirilemezse tümör oluşma riski ortaya çıkabilmektedir (Hackett ve Fortier, 2011). EKH'ler hücre transplantasyon tedavilerinde verici kaynaklar olarak umut vaat etse de transplantasyon sonrası immün reddi ve etik kaygılar kullanımlarını kısıtlamaktadır. Bu sorunun çözümü için araştırmacılar iPKH'leri direkt olarak hastanın somatik hücrelerinden elde etmişlerdir. iPKH'ler retroviral transfeksiyon yöntemiyle Oct3/4, Sox2, c-Myc ve Klf4 gibi 4 genin aktarılmasıyla fare fibroblastlarından elde edilmektedir. Elde edilen iPKH'ler, EKH'ler ile benzer özellikler göstermektedir. Etik problemlerin aşılmasına karşın iPKH kolonisi oluşumu için viral vektörlerin kullanımı tümör oluşum riskini arttırmakta ve klinik çalışmalarda yeniden programlanmış hücrelerin transplantasyonu için kaygıya neden olabilmektedir (Okita ve ark., 2007; Hackett ve Fortier, 2011).

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) kendini yenileme ve çoklu soy farklılaşma yeteneklerine sahip olan stromal hücrelerdir. MKH'ler göbek kordonu, endometrial polipler, kemik iliği, adipoz doku gibi kaynaklardan izole edilebilmektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. MKH kaynakları ve çoklu soy farklılaşma potansiyeli (Isakson ve ark., 2015; Liu ve ark., 2015)

İzolasyon kolaylığı ve elde edilen miktar bakımından bu kaynaklar klinik uygulamalar ve deneysel çalışmalar için en kullanışlı kaynaklardır. Adipoz kaynaklı kök hücreler insan vücudunda her yerde bulunduğu için MKH'lerin umut vaat edici bir kaynağı olabilmektedirler. MKH'lerin multipotensi özelliği onları klinik uygulamalar için çekici bir seçenek haline getirmektedir (Ding ve ark., 2011). MKH'ler adipojenik, retiküler, osteoblastik, miyoblastik ve fibroblastik soylara farklılaşabilirler ve yüksek derecedeki plastisite veya interkonversiyon ile istenilen tek bir veya daha fazla hücre hattı için progenitörler oluşturabilirler (Oreffo ve ark., 2005). Çoklu soy farklılaşma potansiyellerinin yanı sıra B, T ve doğal öldürücü hücrelerin fonksiyonunu ve proliferasyonunu inhibe edici güçlü modülatör etkileri vardır. İmmünbaskılamının fizyolojik önemi belli olmamasına rağmen temelinde yatan mekanizma stromal fonksiyon olabilmektedir (Ding ve ark., 2011). Araştırmacılar MKH'leri lipoaspirat veya kemik aspiratında bulunan diğer hücrelerden ayırt etmek için iki strateji geliştirmişlerdir. Bunlardan birincisi MKH'lerin hücre kültürü plastiğine yapışma özelliği göstermesidir. İkinci özellik ise MKH'lerin CD105, CD73, CD90, CD44, CD166 ve CD29 gibi yüzey işaretçilerine pozitif; CD45, CD14 ve CD34 gibi hematopoietik kök hücrelere (HKH'lere) ait hücre yüzey antijenlerine ise negatif olmasıdır. Kendini yenileme ve osteoblast, kondrosit ve adiposit gibi çoklu mezenkimal hücre soylarına farklılaşma kapasitesine sahip MKH'ler iğsi formda kübik fibroblastik hücrelerdir (Arslan, 2013; Liu ve ark., 2015).

Kök hücreler doku mühendisliği için neredeyse tükenmez hücre kaynakları sağlamaktadırlar. Son zamanlarda araştırmacılar, kök hücrelerin hastalıklı veya hasarlı dokularda istenilen soylar için farklılaşmayı hızlandırması, uyumlu hücrelerin saflaştırılması, hücre popülasyonunda karsinojenik bir kalıntının bulunmadığının doğrulanması ve yerini tutabilecek bir biçimde implantasyon veya işlevlerini arttırıcı çalışmalar üzerine odaklanmıştır. Ancak istenilen dokunun oluşması için başlangıç aşaması, en uygun kök hücre seçimidir (Polak ve Bishop, 2006).

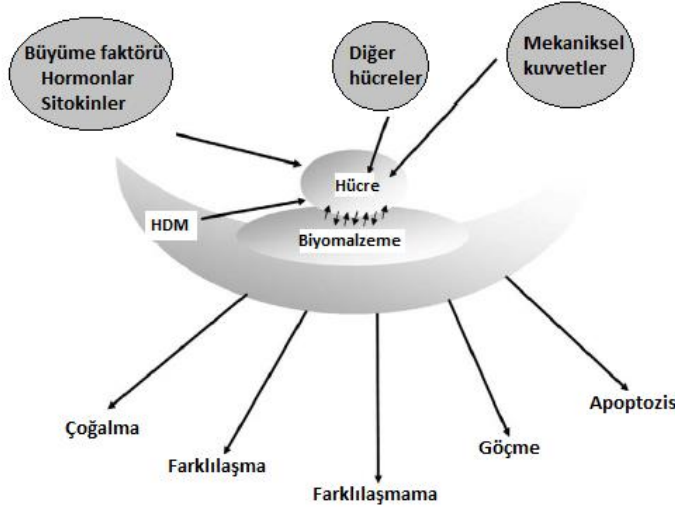
1.5. Biyomalzemeler

Son birkaç yıldır, doku mühendisliğindeki etkileyici gelişmeler hastalıklı veya yaralanmış vücut kısımları ve organların geliştirilmesine yönelik yeni yaklaşımların ortaya çıkmasını sağlamıştır. Doku mühendisliği, matriks (çoğunlukla fonksiyonel ve yeni DMİ'ler) ve hücrelerin birlikte kullanıldığı bir yaklaşımla yeni doku oluşumunu amaçlamaktadır. Farklı organların rejenerasyonu için farklı DMİ'ler ile tasarımlar mevcuttur (Amrollahi ve Tayebi, 2015). İdeal bir DMİ biyo-uyumlu, esnek, elastik ve

biyo-bozunur olmalıdır. Gözenekli iskele, damar doku oluşumu, hücre adezyonu ve çoğalması için üç boyutlu bir alan sağlamalı, besinlerin ve metabolik atık ürünlerinin difüzyonuna olanak tanımalı ve yeni oluşan dokunun olgunlaşmasına kadar uygun mekaniksel özelliklerini muhafaza etmelidir (Pavia ve ark., 2012).

Doku mühendisliği son yıllarda önemli ölçüde gelişmesine rağmen, yeni doku innervasyonunun kontrol edilememesi, belirli dokuların kültüre edilmesiyle ilgili problemler ve yapılardaki yetersiz mikro vaskülarizasyon gibi etmenler bu yaklaşımı kısıtlayıcı bazı problemlerdir. Bilim insanları bu problemleri çözmek için DMİ'lerin oluşumunda biyomalzeme kullanımı, DMİ'lerin dizaynı ve hücre ekim teknikleri gibi doku mühendisliği yapılmış dokuları etkileyen üç ana faktör üzerine odaklanarak araştırmalar yapmışlardır (Amrollahi ve Tayebi, 2015). Genel olarak, DMİ'lerin üretimi için doğal ve sentetik olmak üzere iki tip biyomalzemeler kullanılmaktadır. Her iki tür biyomalzeme grubunun spesifik avantajları ve dezavantajları vardır. Dolayısıyla farklı fazlardan oluşan kompozit biyomalzemelerin kullanımı giderek daha yaygın hale gelmektedir (O'Brien, 2011).

Biyomalzemeler rejeneratif tıptaki modern stratejilerde merkezi roller oynarlar ve tasarlanabilen biyofiziksel ve biyokimyasal çevreler olarak hücre davranışını ve fonksiyonunu yönlendirebilirler. Biyomalzemeler tarafından sağlanan rehberlik hasarlı dokuların yeniden yapılanmasını ve fonksiyonunu yeniden sağlamasını kolaylaştırır. Yeni nesil biyomalzemeler doğal HDM ve HDM bağlı büyüme faktörlerinin düzenleyici özelliklerini taklit edebilecek özellikte üç boyutlu hücre dışı mikroçevreler olarak terapötik ve temel biyolojik çalışmalar için büyük bir hızla geliştirilmektedir (Lutolf ve Hubbell, 2005).



Şekil 1.6. Mikroçevre diyagramı (Lorenti ve ark., 2012)

Hücreler ve biyomalzemeler bir bütün olarak düşünülmelidir. Karakteristik bir mikroçevre bütün hücre tipleri, biyomalzemeler, HDM bileşenleri, büyüme faktörleri tarafından üretilen sinyaller, hormonlar, sitokinler ve mekaniksel kuvvetler ile oluşmaktadır. Hücreler, mekaniksel kuvvetlerden gelen sinyalleri biyokimyasal cevaplara dönüştürebilme kabiliyetindedirler. Hücrelerin çoğalması, farklılaşması veya farklılaşmaması, göçü, apoptozisi ve diğer spesifik olaylar HDM efektörler ile moleküler etkileşimlere göre belirlenmektedir (Şekil 1.6).

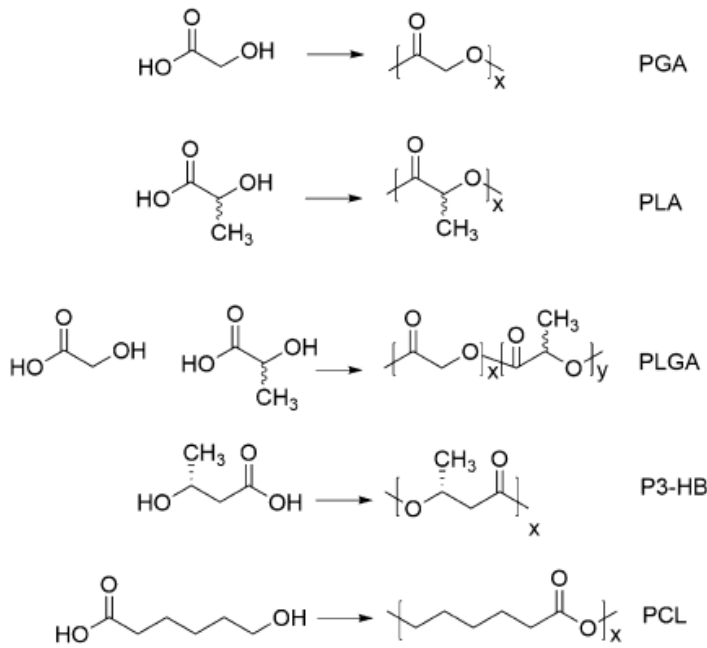
Doğal, sentetik veya hibrit biyomalzemelerden hangisi seçilirse seçilsin, kullanılan biyomalzeme doku onarımını kolaylaştırıcı, implant bölgesinin yeniden modellenmesini sağlayıcı ve *in vivo* ortamda hücrelerin bulunduğu fizyolojik çevreyi çoğaltıcı nitelikte olmalıdır (Lorenti ve ark., 2012).

1.5.1. Sentetik Biyomalzemeler

Biyobozunur sentetik polimerlerin rejeneratif tıp uygulamaları için mekaniksel özelliklerinin işlenebilir olması ve çeşitli uygulamalar için uygun bozunma kinetikleri gibi özel birçok avantajları vardır. Diğer tüm sentetik polimerler gibi belirli kalitede, saflıkta, şekillerde ve kütlelerde istenilen çeşitli yüzey özellikleri ile üretilmektedirler. Ayrıca, polimerlerin fonksiyonel grupları kimyasal olarak modifiye edilip doku büyümesini indükleyebilecek hale getirilebilmektedir. Biyobozunur sentetik polimerlerin çok fazla klinik uygulamaları vardır ve emilebilir süturlar, ilaç taşıma sistemleri ve ortopedik aletlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Son zamanlarda, sentetik biyobozunur polimerler genellikle doku mühendisliği uygulamaları için araştırılmaktadır (Hacker ve Mikos, 2011).

Çok çeşitli katı ve hidrojel formda polimerler geliştirilmektedir. Bozunur polimerler vücut sıvılarında kapsamlı zincir ayrılması reaksiyonlarına maruz kalarak küçük çözünebilir oligomerler veya monomerler oluştururlar. Bu bozunma biyolojik aktif prosesler veya pasif hidrolitik bölünmelerle devam edebilmektedir. Ancak bozunma ürünleri toksik ve immünojenik olmamalı ve vücut içinde böbrek veya başka yollarla yok edilebilmelidir (Griffith, 2002).

PLA, PLLA, PLGA, PGA ve PCL gibi sentetik polimerler klinik uygulamalarda sıklıkla kullanılan bazı sentetik polimerlerdir (Şekil 1.7) (Gunatillake, 2003).



Şekil 1.7. Bazı sentetik polimerlerin kimyasal yapıları (Ricapito ve ark., 2016)

PLA, PGA ve PCL gibi sentetik biyobozunur polilaktonlar ve kopolimerlerinin hepsi biyoyumlu olmakla birlikte bozunma ürünleri metabolik yollarla (sitrik asit döngüsü) veya direkt böbreklerle vücuttan atılmaktadırlar. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), bu polimerler arasındaki birkaç sentetik biyobozunur polimerin emilebilir sütür ve ilaç taşıma sistemleri gibi biyomedikal aletlerde insan kliniğinde kullanımına onay vermiştir (Ishaug ve ark., 1994; Savioli Lopes ve ark., 2012). Doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan sentetik polimerlerin genel özellikleri Çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Doku mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bazı sentetik polimerler ve özellikleri (Kim ve ark., 2011)

Polimerler	Biyouyumluluk	Dezavantajları	Biyo bozunurluk	Uygulamalar
PLA	Minimum sitotoksikite ve inflamasyon	Rastgelezincir hidrolizi	24 ay	Deri, kırık, kemik, ligament, damar, sinir
PGA	Minimum sitotoksikite ve inflamasyon	Rastgele zincir hidrolizi	6-12 ay	Deri, kırık, kemik, ligament, damar, sinir
PLGA	Minimum sitotoksikite ve inflamasyon	Rastgele zincir hidrolizi	1-6 ay	Deri, kırık, kemik, ligament, damar, sinir
PCL	Minimum sitotoksikite ve inflamasyon	Hidrofobik yapı	3 yıl	Deri, kırık, kemik, ligament, damar, sinir
Polianhidritler	Minimum sitotoksikite ve inflamasyon	Sınırlı mekaniksel özellik	Yüzey aşınması, kontrol edilebilir	Kemik

1.5.1.1. Poli(Laktik asit)

PLA, %100 yenilenebilir kaynaklardan elde edilebilen, çok çeşitli, biyobozunur alifatik poliesterdir. Sütür, kemik fiksasyon malzemeleri, ilaç taşıma sistemleri ve doku mühendisliği gibi biyomedikal alanlarda kullanılan dikkat çekici bir malzemedir. Laktik asit kiral bir molekül olduğu için PLA'nın PLLA, poli (D-laktik asit) (PDLA) ve poli(D,L-laktik asit) (PDLLA) gibi stereoizomerleri vardır. Nispeten ataktik ve optik olarak inaktif olan PDLLA amorf bir yapıda iken, optik olarak aktif olan PLLA ve PDLA kristal formdadır. Laktik asidin biyolojik kaynaklarda en çok bulunan formu L-izomerdir. Bu yüzden L-izomer biyolojik bir metabolittir ve PLA'nın ana fraksiyonunu teşkil etmektedir. PLA, cerrahi implant malzemesi ve ilaç taşıma sistemlerinde; yeni doku oluşumu için geliştirilen gözenekli iskelelerin yapımında kullanılmaktadır (Pavia ve ark., 2012; Revati ve ark., 2015).

1.5.1.2. Poli(L-laktik asit)

PLLA genellikle biyobozunurluk, biyouyumluluk, termal plastisite ve uygun mekaniksel özellikleri nedeniyle biyomedikal alanlarda kullanılmaktadır. Fakat, yüksek kristalinite ile bağlanmış fragmanlarının bozunma zamanları uzun olduğu için vücutta inflamasyon reaksiyonlarına sebebiyet vermektedir. Bu sorunu çözmek için PLLA, L-laktik ve D,L-laktik asit monomerlerinin kombinasyonları şeklinde kullanılabilir. Böylelikle, kristal formdaki fragmanlar oluşmazken bozunma daha hızlı gerçekleşir (Savioli Lopes ve ark., 2012; Revati ve ark., 2015). Malzeme kuvvetinin uzun süre stabil kalması gereken ligament ve tendon rekonstrüksiyonu veya ürolojik ve damar cerrahisi gibi uygulamalarda PLLA fiberler sıklıkla tercih edilmektedir. Ayrıca enjekte edilebilir mikroküre formunda elde edilebilen PLLA, rekonstrüktif yüz cerrahisinde geçici dolgu olarak kullanılmaktadır (Savioli Lopes ve ark., 2012).

1.5.1.3. Poli(glikolik asit) ve Kopolimeri Poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit)

PGA, biyomedikal malzeme olarak kullanılan ilk ticari sentetik biyobozunur polimerdir. Tıp ve cerrahide daha çok yara örtüsü uygulamalarında kullanılmaktadır. Nispeten hidrofilik doğası sebebiyle, PGA *in vivo* ortamda sulu çözeltilerde hızlı bir şekilde bozunarak 2 veya 4 hafta arasında mekaniksel bütünlüklerini kaybetmektedirler. Biyobozunur özelliklerinden dolayı, son zamanlarda deri veya kan damarlarının rekonstrüksiyonundaki kullanımları artmıştır (Chu ve Browning, 1988; Ma, 2004).

PLA ve PGA'nın kopolimeri olan PLGA lineer alifatik poliestерlerin bir ailesidir. Kemik doku tamiri uygulamalarında sıklıkla kullanılan PLGA, biyouyumlu bir kopolimerdir. Bu malzemelerden yapılan implantların sıçan tibialarında kemik iyileşmesini hızlandırdığı ve kraniyal hasarlarda tedavi edilmemiş kontrol grubuna göre kemik oluşumunu daha fazla indüklediği görülmüştür. Benzer şekilde, tavşanlar üzerinde yapılan çalışmalar neticesinde herhangi bir inflamasyona sebebiyet vermeden osteokondral defektlerdeki artiküler iyileşmeyi hızlandırdığı görülmüştür (Athanasίου ve ark., 1996).

1.5.1.4. Diğer Sentetik Biyomalzemeler

Lineer alifatik poliestерlerin diğer üyeleri olan PCL ve poli(hidroksi bütirat) (PHB) gibi sentetik polimerler de ayrıca doku mühendisliği araştırmalarında kullanılmaktadır. PCL'nin bozunma hızı PLA ve PGA polimerlerine göre önemli ölçüde daha yavaştır. Bu yavaş bozunma hızı, genel doku mühendisliği uygulamalarında PCL'nin kullanımını sınırlamaktadır. Ancak, uzun sürede kalıcı olan implantların önemli olduğu kontrollü

salınım uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bozunma özelliklerinin geliştirilmesi adına PCL temelli kopolimerler sentezlenmektedir. PHB mikroorganizmalar tarafından fermentasyon yoluyla üretilmektedir. PHB ve PHB temelli kopolimerler hidrofobik özellikte oldukları için bozunma hızları çok yavaştır. Dolayısıyla PGA, PLA ve PLGA gibi polimerlerle karşılaştırıldığında, doku mühendisliği uygulamalarında daha az kullanılmaktadırlar (Ma, 2004).

Polimerik malzemelere ek olarak araştırmacılar, kemik ve diğer mineralize dokuların rejenerasyonu için kalsiyum fosfat seramiklerini (CaP) kullanmışlardır. Kemik yapısında doğal olarak bulunan Hidroksi apatit (HA), β -trikalsiyum fosfat (β -TCP) ve türevleri gibi CaP seramikleri biyouyumluluk, osteokondüktivite (yüzey özelliklerinin osteoblastik hücre adezyonu, çoğalması ve farklılaşmasını desteklemesi), osteoindüktivite (kemik oluşumunu indüklemeye yeteneği) ve biyobozunurluk özellikleri ile ortopedik kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu için kullanılmaktadırlar. Ancak, mekaniksel olarak çok kırılgan oldukları için doku mühendisliği uygulamaları için gözenekli yapılar haline getirmek ve işlemek oldukça zordur. Bu nedenle böyle inorganik malzemelerin diğer sentetik veya doğal polimerle oluşturulan kompozit malzemeleri oluşturularak elde edilen üç boyutlu iskeleler kemik doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ma, 2004; Oh ve ark., 2006).

1.5.2. Doğal Biyomalzemeler

Doğal kaynaklı biyomalzemeler tüm dünyada bilim insanları tarafından ilgi çekmektedir. Doğal kaynaklı polimerlerin hücre adezyonu, doğal dokulara benzer mekaniksel özellikler, biyobozunurluk ve biyouyumluluk gibi mükemmel biyolojik özellikleri nedeniyle doku mühendisliği alanında sıklıkla kullanılmaktadırlar. Doğal kaynaklı biyomalzemeler protein temelli biyomalzemeler (kollajen, jelatin, ipek, vb.), polisakkarit temelli biyomalzemeler (selüloz, kitin/kitosan, glukoz, vb.) ve hücrelerinden arındırılmış (deselülerize) doku temelli biyomalzemeler (deselülerize kalp kapakçıkları, kan damarları, karaciğer, vb.) olmak üzere farklı gruplara ayrılabilir (B. S. Kim ve ark., 2011; Ha ve ark., 2013).

Çizelge 1.2. Doku mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bazı doğal polimerler ve özellikleri (B. S. Kim ve ark., 2011)

Polimerler	Biyouyumluluk	Dezavantajları	Biyobozunurluk	Uygulamalar
Kollajen	Minimum sitotoksisite ve inflamasyon	Küçük heliksel olmayan telopeptitlerin proteolitik yıkımı	Kontrol edilebilir	Deri, kırık, kemik, ligament, tendon, damar, sinir
Hyalüronik asit	Minimum bağışıklık sistemi tepkisi, inflamasyon yok	Yüksek viskozite, kimyasal modifikasyon sonrası çok sayıda saflaştırma basamağı	1 saat-1 ay	Deri, kırık, kemik, ligament, damar, sinir, karaciğer
Aljinik asit	Minimum bağışıklık sistemi tepkisi, inflamasyon yok	Kontrol edilemeyen hidrojel çözünmesi	1 gün-3 ay	Deri, kırık, kemik sinir, kas, pankreas
Kitosan	Minimum bağışıklık sistemi tepkisi, inflamasyon yok	Kontrol edilemeyen deasetillenme ve moleküler ağırlık	3 gün-6 ay	Deri, kırık, kemik, damar, sinir, pankreas, karaciğer
Jelatin	Minimum sitotoksisite ve inflamasyon	Zayıf mekaniksel özellik	Kontrol edilebilir	Deri, kırık, kemik, ligament, meme
Fibrin	Minimum sitotoksisite ve inflamasyon	Zayıf mekaniksel özellik	Kontrol edilebilir	Deri, kırık, kemik, ligament, karaciğer, tendon, damar
İpek	Minimum sitotoksisite ve inflamasyon	Serisinin inflamasyonu	Kontrol edilebilir	Deri, kırık, kemik, ligamentler, kulak zarı, tendon, damar

Doğal biyomalzemeler yapı, içerik ve uyarıcı etkiler bakımından HDM'yi taklit edebilecek nitelikte ve hücre adezyonunu, çoğalmasını ve farklılaşmasını arttırıcı özellikte olmaları sebebi ile sentetik olanlara göre bazı avantajlara sahiptirler. Ancak, inflamasyon, enfeksiyon veya bağışıklık sistemi tepkisi ve patojen bulaşma riskleri gibi bazı özellikleri ise kullanımlarını sınırlamaktadır. İlaveten zayıf mekaniksel dayanımları ve vücutta hızlı bir şekilde metabolize olmaları da dezavantajları arasında sayılabilir. Sentetik biyomalzemelerin ise patojen bulaştırma riski yoktur ve biyobozunurluk özellikleri kontrol

edilebilmektedir. Ancak, hücre adezyonu ve çoğalmasını tetikleyen yüzey moleküllerinin olmayışı, vücutta parçalanmaları sırasında istenmeyen yan ürünlerin oluşması gibi bazı dezavantajları vardır (De la Puente ve Ludeña, 2014). Doğal ve sentetik biyomalzemelerin özellikleri karşılaştırılmalı olarak çizelge 1.3’de verilmiştir.

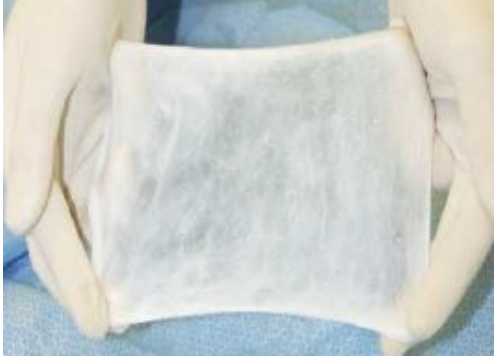
Çizelge 1.3. Doğal ve sentetik biyomalzemelerin avantajları ve dezavantajları bakımından karşılaştırılması (De la Puente ve Ludeña, 2014)

	Avantajları	Dezavantajları
Doğal malzemeler (Kollajen, fibrin, aljinat, vb.)	Genellikle biyouyumlu, biyobozunur, toksik veya immünojenik değil Doğal HDM’yi (yapı, içerik ve uyarıcı etkiler bakımından) taklit edebilecek nitelikte Besinlerin hücrelere iyi bir şekilde iletimi	Patojen bulaşma riski Genellikle modifikasyon ve işleme tekniklerinin gereksinimi Uygulamaya bağlı olarak mekaniksel ve bozunma özellikleri
Sentetik malzemeler (PGA, PLA, PLGA, vb.)	Nispeten biyouyumluluk Kullanım kolaylığı Kontrollü bozunma oranları Patojen iletimi gibi risklerin olmaması	Hücre etkileşimini geliştirmek için gerekli yüzey modifikasyonu İşleme tekniklerinin mekaniksel ve bozunma özelliklerini etkilemesi Bozunma ürünlerinin inflamasyona sebebiyet verebilmesi

1.5.2.1. Hücrelerinden Arındırılmış Doku Temelli Biyoiskeleler

Hücrelerinden arındırılmış dokulardan elde edilen biyolojik iskeleler araştırma ve klinik amaçlar için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Hücrelerinden arındırma (deselülerizasyon) prosesleri ile elde edilen hücresiz HDM’ler, yapılarında bulunan kimyasal sinyallerle kök hücreleri indüklerken doğal ve mekaniksel sağlam yapıları sayesinde hücrelerin hasarlı bölgede yeniden toplanmasını desteklemektedirler. Bu nedenle rejeneratif tıpta kullanılan biyomalzemeler olarak umut vaat etmektedirler (Erten ve ark., 2016). Deselülerize matrikslere örnek olarak tip I kollajen, GAG ve bazı büyüme faktörleri içeren incebağırsak submukozası verilebilir. İncebağırsak submukozası birçok dokunun rekonstrüksiyonu için kullanılmaktadır. Tüm bu olumlu etkilerine rağmen, deselülerize

matriks kullanımı patojen bulaşma riski ve immün red gibi problemleri de beraberinde getirmektedir (Ma, 2004).

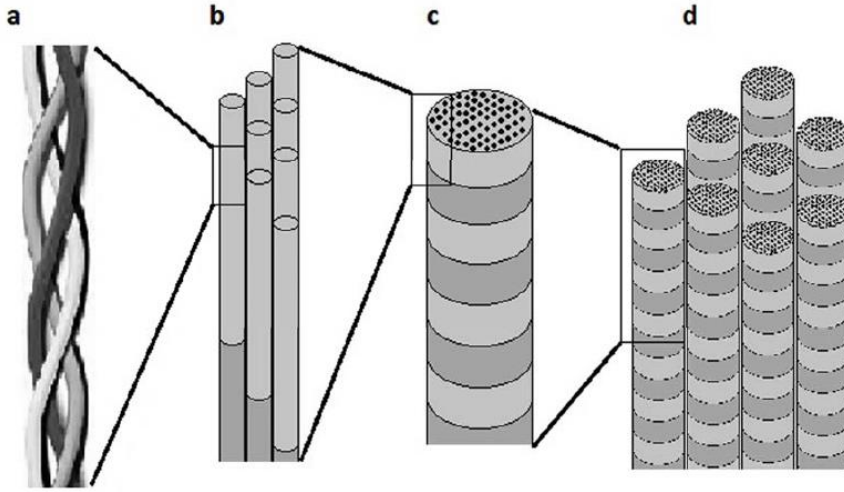


Şekil 1.8. Domuz üriner sisteminden elde edilen ekstraselüler matriks (Badyalak, 2004)

1.5.2.2. Kollajen

Tüm bağ dokuda bulunan ve yapısal proteinlerin ana sınıfını oluşturan kollajen en çok çalışılan HDM biyomoleküllerden biridir. Bu fibröz protein türü kemik ve derinin önemli bir bileşeni olup memelilerin kuru ağırlığının yaklaşık % 25'ini teşkil etmektedirler. Bu güne kadar 29 farklı tip kollajen karakterize edilmiştir. Tüm kollajen tiplerinin üçlü heliks yapıda olduğu gösterilmiştir. Kollajen tip I, II, III, V ve XI'in kollajen liflerden oluştuğu bilinmektedir. Kollajenin moleküler yapısını bir araya gelmiş üç α zincir oluşturmaktadır. Her bir α zincir -Gly-X-Y- dizisindeki binden fazla amino asitten oluşmaktadır. Tropokollajen molekülündeki üç α zincirin sıkı paketlenmesi için her üçüncü amino asidin glisin olması gerekmektedir (Şekil 1.9). Ayrıca X ve Y pozisyonları ise genellikle prolin ve 4-hidroksiprolin amino asitleriyle tamamlanmaktadır (Parenteau-Bareil ve ark., 2010).

Biyouyumluluk, düşük toksisite, kontrol edilebilir biyobozunurluk özelliklerinin yanı sıra biyoyapısal, fiziksel, kimyasal ve immünolojik özellikleri nedeniyle kollajen genellikle deri, kıkırdak, kemik ve sinir doku mühendisliğinde kullanılmaktadır. Ancak bu avantajlarına rağmen çapraz bağlanmamış kollajen iskelelerin zayıf mekaniksel dayanımları ve hızlı bozunma oranları uygulamalarını sınırlayan önemli problemlerdir. Bu sorunları aşmak için çapraz bağlama ve diğer biyomalzemeler ile kompozit iskele üretimi gibi işlemler kullanılabilmektedir (H. M. Wang ve ark., 2013).

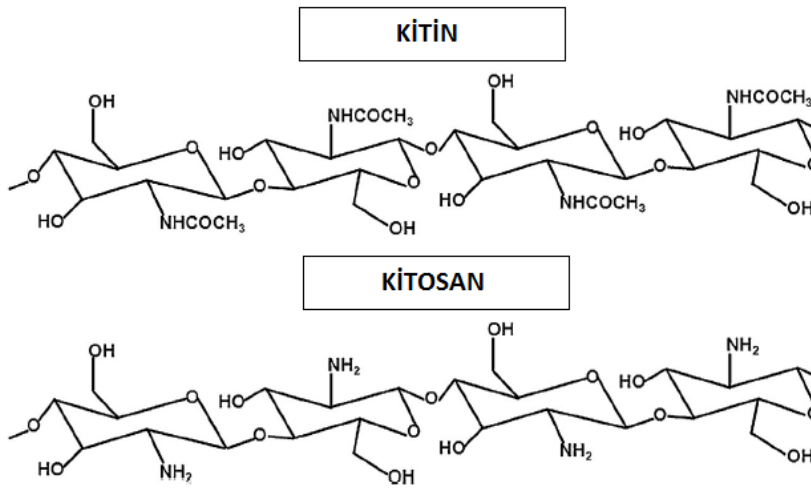


Şekil 1.9. Kollajenin yapısı (a) Kollajen α zincir üçlü heliks yapısı (b) tropokollajen molekülleri (c) 10-300 nm çapındaki kollajen fibril (d) Kollajen fibrillerin bir araya gelerek oluşturduğu 0.5-3 μ m çapındaki bir kollajen fiber (Parenteau-Bareil ve ark., 2010)

Kollajen kaynağı olarak sığır veya domuz kullanımı, BSE, TSE ve şap gibi hastalıklarının bulaşmasına sebebiyet verebilmektedir. İlaveten Müslümanlar domuz ürünlerini; Hindular ise sığır ve domuz ürünlerini inançları sebebiyle tüketmemektedir. Bu nedenle bilim insanları yeni kollajen kaynakları araştırmışlar ve hastalık bulaşma riskinin düşük olması, dini açıdan engel teşkil etmemesi, ham materyallerin bolluğu ve diğer alternatif kaynaklara göre yüksek verimlerde kollajen ekstraksiyonu gibi avantajları sebebiyle deniz hayvanlarından elde edilen kollajenin umut vaat edici olduğunu düşünmüşlerdir. Kollajen mürekkep balığı, kahverengi şerit kırlangıç balığı, yassı balık, tırpana, kirpi balığı, kahverengi bantlı bambu, köpek balığı ve sazan gibi birçok deniz hayvanlarından ekstrakte edilebilmektedir. Ancak *Stomolophus meleagris* ve *rhizostoma* gibi denizanası türlerinden kollajen izolasyonu ile ilgili sadece birkaç çalışma yapılmıştır. *Rhizostoma* ve *Stomolophus meleagris* gibi bazı denizanası türleri Çin’de bin yılı aşkın bir süredir gıda ve tıpta kullanılmıştır. Kollajen içeriği çok fazla olan bu türler artrit, hipertansiyon, bronşit, sırt ağrısı, mide ülseri, astım, soluk borusu iltihabı ve deri yanığı gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmışlardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar denizanası kollajeni ve türevlerinin romatoid artrit, osteoartrit ve osteoporoz gibi hastalıkları önlemede etkili olduğunu göstermektedir (Barzideh ve ark., 2014).

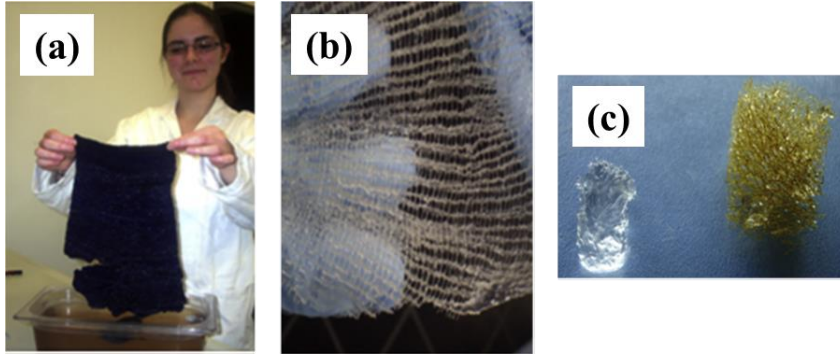
1.5.2.3. Kitin-Kitosan

Kitin, selülozdan sonra doğada en çok bulunan ikinci biyopolimerdir ve genellikle deniz kabuklularının ve böceklerin kabuklarından, mantarların ve yeşil alglerin hücre duvarından ve mayalardan farklı biyoteknolojik yaklaşımlar kullanılarak elde edilmektedirler. Kitosan (1→4)-2-asetamido-2-deksi-β-D-glukan (N-asetil D-glukozamin) and (1→4)-2-amino-2-deoksi-β-D-glukan (D-glukozamin) birimlerinden oluşan lineer semi-kristal bir polisakkarittir. Doğada yaygın olarak bulunmayan bu polimer kitinin kısmi deasetillenmesi ile kolayca elde edilebilmektedir (Şekil 1.10). Kitinin deasetillenmesi, alkali ortamda veya enzimatik yöntemler kullanılarak kimyasal hidroliz ile yapılmaktadır.



Şekil 1.10. Kitin ve kitosanın yapıları (Anitha ve ark., 2014)

Kitosan ve kitinin gıda, beslenme, malzeme bilimi, biyoteknoloji, ilaç, tarım ve çevresel koruma gibi çok boyutlu uygulama potansiyelleri vardır. Kitosan, antibakteriyel, antifungal, mukoadeziv, analjezik, biyouyumluluk, biyobozunurluk ve hemostatik özellikleri nedeniyle kaybedilmiş veya hasarlı dokuların rejenerasyonu için kullanılan iskelelerin üretiminde kullanılan uygun bir biyopolimerdir. Şekil 1.11’de deniz süngeri *Lanthella basta*’nın iskeleti ve *Verongula gigantea*’dan elde edilmiş gözenekli iskeleler görülmektedir.



Şekil 1.11. (a) Deniz sünger *Lanthella basta*'nın iskeleti (b) *Lanthella basta*'dan elde edilen iki boyutlu kitinli örgü (c) *Verongula gigantea* sünger (sağda) ve ondan elde edilmiş iki boyutlu kitinli iskele (solda) (Anitha ve ark., 2014)

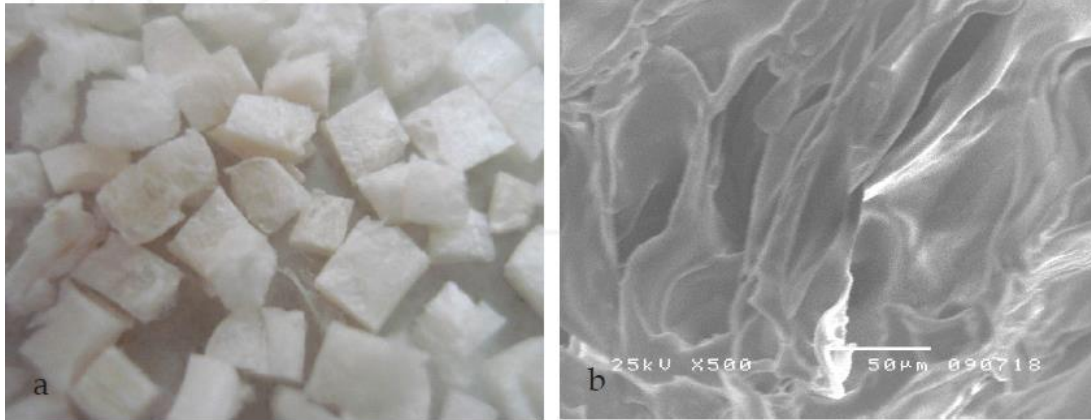
Kitosanın biyodegradasyonu sonucu toksik olmayan farklı uzunluklarda oligosakkaritler oluşmaktadır. Bu oligosakkaritler metabolik yollarla elimine edilebilirler. Kitosanın bozunma oranı deasetillenme derecesiyle, N-asetil D-glukozamin kalıntıları ve molekül ağırlığıyla ilgilidir. Hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasını destekleyecek nitelikte olan kitosan temelli biyolojik iskeleler cerrahi sütürlarda, diş implantlarında, kemik ve deri uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Croisier ve Jérôme, 2013; Anitha ve ark., 2014).

1.5.2.4. Aljinat ve Jelatin

Aljinat kahverengi alglerde doğal olarak oluşan anyonik ve hidrofilik bir polisakkarittir. Ticari olarak ulaşılabilen aljinatlar *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* ve *Macrocystia pyrifera* gibi üç kahverengi alg türünden ekstrakte edilmektedirler (Saltz ve Kandam, 2016). Orta derecede pH ve sıcaklıkta hidrojel forma getirilebilen aljinat, genel olarak toksik olmayan, biyouyumlu, biyobozunur, daha ucuz ve doğada çokça bulunan bir biyopolimer olarak kabul edilmektedir. Tüm bu önemli avantajlar aljinatları biyomedikal uygulamalar için çok faydalı yapmaktadır. Özellikle ilaç ve diğer biyolojik olarak aktif maddelerin kontrollü taşıma sistemlerinde ve hücrelerin enkapsülasyonu gibi çalışmalarda kullanılmaktadırlar. Kalsiyum aljinat doğal bir hemostat olduğu için aljinat temelli yara örtüleri kanamalı yaralar için oldukça önemlidir.

Kollajenin kontrollü hidrolizi ile elde edilen jelatin yüksek miktarda glisin, prolin ve hidrosiprolin gibi amino asitler içermektedir. Yapısal olarak jelatin molekülleri glisin-XY üçlü sekanslarının tekrarlarını içermektedir. X ve Y genellikle prolin ve hidroksiprolin gibi amino asitlerdir. Bu sekanslar jelatinin üçlü heliksel yapısı ve jelleşme yeteneğinden sorumludur. Jelatin plazma çoğaltıcı, yara örtüsü, cerrahi kullanım için yapıştırıcı ve emici

ped olarak biyomedikal alanlarda kullanılmaktadır (Ha ve ark., 2013). Şekil 1.12’de jelatin / aljinat biyokompozit iskeleler ve SEM mikrografileri verilmiştir.

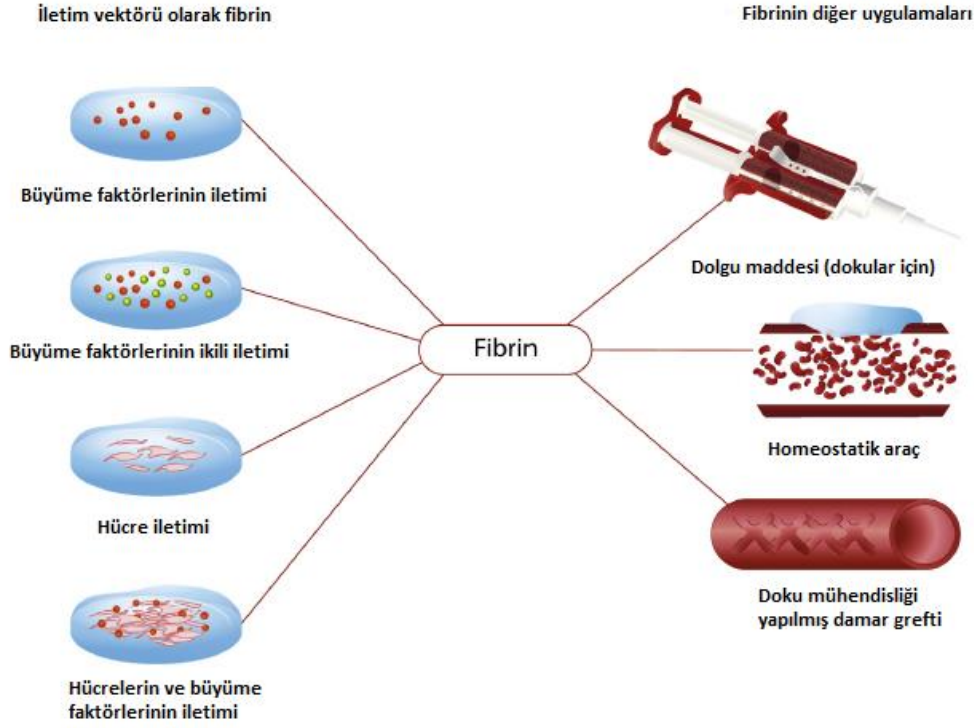


Şekil 1.12. (a) Jelatin/aljinat biyokompozit iskele (b) İskelelerin SEM mikrografisi (Ha ve ark., 2013)

1.5.2.5. Fibrin

Kanın pıhtılaşmasında görev alan fibröz bir protein olan fibrin ticari olarak üretilmekte ve cerrahi işlemler sırasında hemostatik araç ve doku yapıştırıcısı olarak kullanılmaktadır. Doku mühendisliği uygulamalarında büyüme faktörlerinin, hücrelerin, ilaçların ve genlerin taşınmasında bir vektör olarak kullanımı da söz konusudur (Şekil 1.13). Fibrin iskelelerin en sık kullanılan formları ise fibrin hidrojeller, fibrin yapıştırıcılar ve fibrin mikrobuncuklardır.

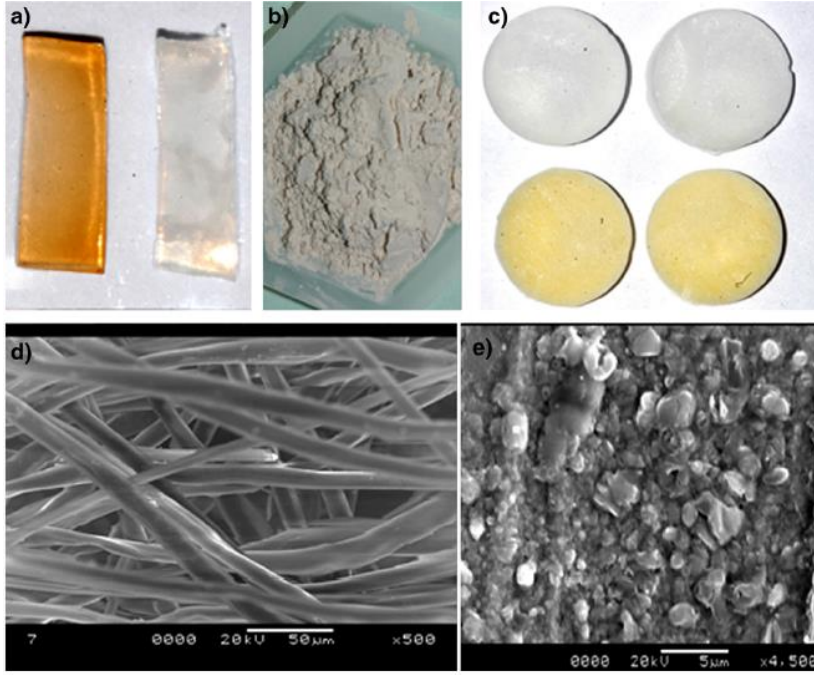
Büyüme faktörleri, yara iyileşmesi, hücre çoğalması ve farklılaşmasında merkezi bir rol oynarlar. Vücut içinde hızlı metabolize olduklarından, büyüme faktörleri ile yara iyileşmesi için yaygın olarak yapılan *in vivo* klinik çalışmalar başarısız olmaktadır. Ancak üretilen fibrin hidrojeller sayesinde büyüme faktörleri korunarak bozunma süreçleri kontrol altına alınabilmektedir. Ayrıca çalışmanın içeriğine ve amacına göre optimum salınım için modifiye edilebilmektedir (Whelan ve ark., 2014).



Şekil 1.13. Klinik ve deneysel olarak fibrinin kullanım alanları (Whelan ve ark., 2014)

1.5.2.6. İpek Fibroini

İpek, genellikle ipek böceği, örümcek, akrep ve sinekler gibi Lepidoptera larvaları tarafından üretilen fibröz protein liflerdir. İpek biyopolimerlerinden elde edilen doku iskeleleri, deri yanıkları ve yaralarının tedavisi için doku rejenerasyonunda kullanılmaktadırlar. İpek fibroin peptitleri, parlak, esnek, elastik kaplama gücü, elverişli yayılma ve yapışma özellikleri nedeniyle kozmetikte de sıklıkla kullanılmaktadır. İlaven, ipek lifler biyouyumlu ve biyobozunur polimerler oldukları için cerrahi sütürlar olarak kullanılmaktadır. Biyolojik iskele olarak umut vaat edici diğer medikal uygulamaları ise kan damarları, kemik doku, kırıldak doku ve diş rekonstrüksiyonudur. Daha iyi oksijen geçirgenliği sağlayan yeni nesil kontak lens üretimi, yapay kornealar, deri, greftleri ve epilepsi hastalığının tedavisi için ilaç taşıma sistemi gibi uygulamalar ipek proteini temelli biyomalzemelerin gelecekteki çalışmaları arasında sayılabilir (Kundu ve ark., 2013). Şekil 1.14'te ipek fibroini ile üretilen bazı biyomalzemeler gösterilmiştir.

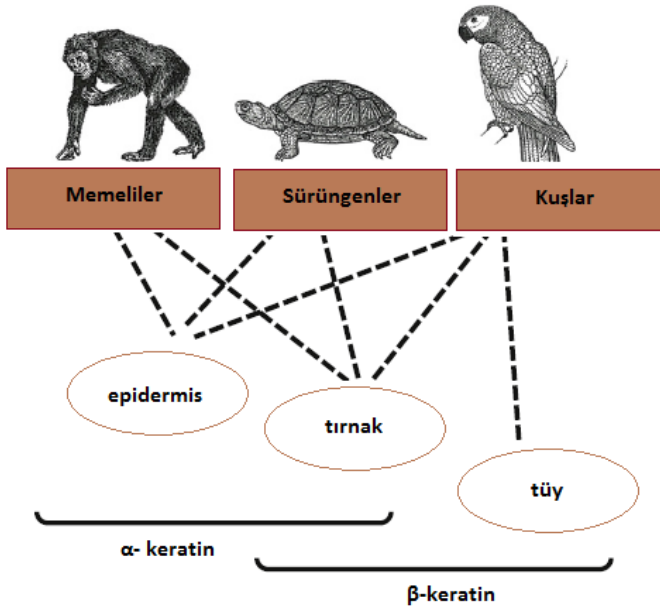


Şekil 1.14. İpek fibroini ile üretilen biyomalzemeler (a) hidrojeller (b) toz formda ipek fibroini (c) 3D gözenekli iskele (d) doğal ipek liflerinin SEM görüntüsü (e) ipek mikroparçacıklarının SEM görüntüsü (Kundu ve ark., 2013).

1.5.2.7. Keratin

Keratin, sistein amino asit kalıntıları arasında bulunan -S-S- çapraz bağları (disülfid bağları) nedeniyle yüksek kararlılık ve düşük çözünürlük gibi özelliklerle karakterize edilen yapısal fibröz bir proteindir (Zoccola ve ark., 2009). Amino asit analiz sonucuna göre keratinlerin sistein içeriği diğer proteinlere göre daha fazladır (toplam amino asit rezidülerinin % 6-17'si) ve bu da daha fazla molekül içi disülfid bağ oluşumu anlamına gelmektedir (Fujii ve Li, 2008).

Keratinler sülfür miktarlarına ve molekül ağırlıklarına bağlı olarak β keratin (yumuşak keratin) veya α keratin (sert keratin) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Disülfid bağları fazlalığı daha sert ve daha dayanıklı yapılar anlamına gelmektedir. Dolayısıyla yumuşak keratinlerde sülfür miktarı daha azdır. Keratin doku; kuşlarda, sürüngenlerde ve memelilerde bulunmaktadır. İnsan ve hayvan derisinin stratum korneum epidermisinin temel yapı parçasını oluşturan keratinler; boynuz, toynak, saç, tüy ve tırnak gibi ekzoiskelet yapılarında da bulunmaktadır (Kakkar ve ark., 2014).



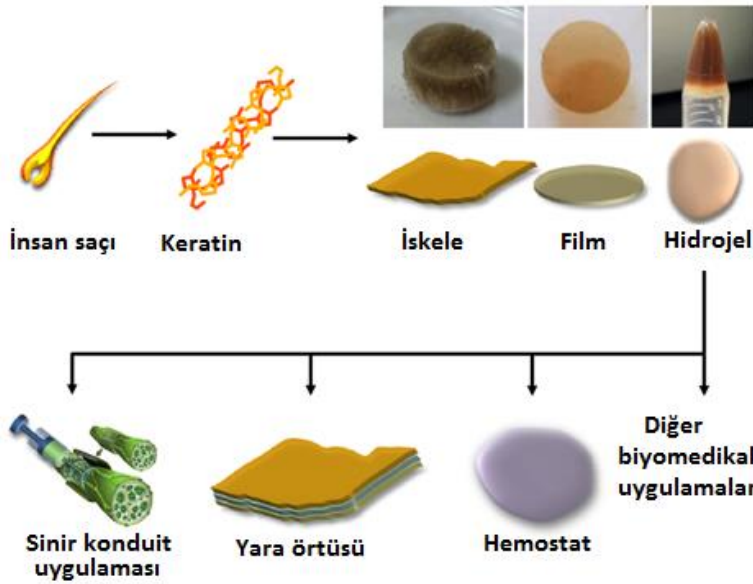
Şekil 1.15. Memeli, kuş ve sürüngenlerin çeşitli dokularında oluşan keratin tipleri (Weiss ve Kirchner, 2011)

Keratinler karakteristik X ışını kırınım modeli (α ya da β kırınım modeli) verebilirler (Zoccola ve ark., 2009). Memelilerin tümünde α tip keratinler vardır. Ancak kuşlar ve sürüngenler α ve β tip keratinlerin her ikisini de üretebilirler. Yün lifleri kendi doğal hallerinde α keratin içerirken germe esnasında β tabakalı yapılara dönüşmektedirler (Şekil 1.15) (Zhang ve ark., 2013).

Sanayi devrimiyle birlikte insanlar ortalama yaşam sürelerini arttırmak için çok sayıda faydalı teknolojiler geliştirmişlerdir. Teknolojinin gelişmesi beraberinde önemli çevresel problemleri de getirmiştir. Son yıllarda bu çevresel problemleri araştırmak ve çözüm önerileri sunmak adına çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bunlardan bir tanesi evsel, sanayi, hayvansal veya bitkisel organik atıklardan farklı alanlarda kullanılmak üzere sürdürülebilir malzemeler ve/veya kompozitler üretmektir (Park ve ark., 2013). Sürdürülebilir malzemeler için talep arttıkça özellikle kümes ve/veya küçükbaş hayvancılığı, kesimhaneler (mezbahe) ve tekstil sanayiinde dünya çapında yılda 5.000.000 tondan daha fazla oluşan yün, tüy, tavuk gagası, boynuz, toynak ve tırnak gibi atıklarda bol miktarda bulunan keratin ve/veya yan ürünlerinin yenilenebilir bir kaynak olarak kabul edilmeye başlandığı görülmektedir (Zoccola ve ark., 2009). Ayrıca bay/bayan kuaförlerinde dünya genelinde her yıl 300.000 tondan fazla keratin proteinince zengin saçlar atılmaktadır. Özellikle insan saç keratin ekstraktından elde edilen biyomalzemelerin canlı sistemlerde kullanılan uygun bir materyal olarak kullanımına yönelik çalışmalar

dikkat çekicidir (Park ve ark., 2013). Birçok doğal kaynaklı biyomolekül gibi keratinler de temel biyolojik aktivite ve biyouyumluluk özellik gösterirler (Zoccola ve ark., 2009).

Canlı sistemlerde iyi tolere edilen keratinin, biyomalzemelerin çeşitli potansiyel biyomedikal uygulamalarını stimüle ettiği hayvan modellerinde yapılan deneyler ile test edilmiştir. Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda keratinlerin hücre adezyonunu destekleyen tip I α keratinlerde bulunan LDV (lözin-aspartik asit-valin) ve EDS (glutamik asit-aspartik asit-serin) peptin domainleri gibi bağlayıcı motiflerinin varlığı saptanmıştır (Burnett ve ark., 2013). Glutamik asit ve sistein yün keratininde bulunan iki majör amino asittir. Örneğin, Glutamik asit mental aktivite ve beyin foknsiyonunu arttıran insan vücudunda hücrel metabolizmada görevli önemli bir amino asittir. Sistein ise beyaz kan hücrelerinin aktivitesini hızlandırarak zararlı etkilere karşı vücuda direnç sağlamaktadır (Zhang ve ark., 2013). Tüm bu yapısal ve fiziksel özellikleri nedeniyle keratinler; yara iyileşmesinde, ilaç sanayisinde, doku mühendisliğinde ve medikal aletlerin uygulamalarında yer alan biyomalzemelerin gelişimine katkı sağlamaktadır. DMİ'lerin üretiminde doğal veya sentetik biyomalzemeler kullanılmaktadır. Kullanılan her iki tür biyomalzemelerin bazı avantajları ve dezavantajlarından daha önce bahsedilmiştir. Özellikle, bu proteinlere (kollajen, jelatin, ipek, vb.) erişimin sınırlı olması, klinik uygulamalar için protein temelli iskelelerin geniş bir yelpazede üretimini engelleyen faktörler arasındadır. Güncel protein üretim teknolojileri protein temelli iskele üretimi taleplerinin gerisinde kalmaktadır. Organik kimya ve peptit sentezi gibi kullanılan iki en önemli protein üretim metodu maksimum 50 amino asitlik peptitlerin üretimini sağlayabilmektedir. Rekombinant protein teknolojisi ise endüstriyel ölçekte hala maliyeti yüksek metotlar arasında yer almaktadır. Diğer taraftan, çeşitli hayvansal kaynaklardan ekstrakte edilen proteinler immün intolerans ve hastalıkların türler arası taşınma riski gibi sorunları da beraberinde getirmektedir. İnsan saç keratinleri kolayca ulaşılabilir olmaları, insan kaynaklı olmaları, otogreft olarak kullanılabilimleri, kolayca ekstrakte edilmeleri, yenilenebilir bir kaynak olmaları ve uygun biyokimyasal özellikleri nedeniyle bahsedilen zorlukların üstesinden gelebilecek potansiyel malzemeler olarak ortaya çıkmışlardır. Günümüzde, klinik kullanımlar için keratin temelli ürünler sınırlı sayıda olmasına rağmen, bu malzemenin çeşitliliğinin kanıtlanması için önemli sayıda çalışmalar yapılmıştır. İnsan saç keratinlerinden kaplamalar, filmler, süngerler, lifler ve jeller üretilmiştir. Ayrıca, bu matrikslerin çeşitli potansiyel uygulamaları üzerine fonksiyonel çalışmalar yapılmıştır (S. Wang ve ark., 2015).



Şekil 1.16. İnsan saçı keratin temelli biyomalzemelerin biyomedikal uygulamaları (Lee ve ark., 2014)

Keratinler destek materyali olarak kullanılan 2 boyutlu membran, nanolif, üç boyutlu iskele, film ve hidrojel formda biyomalzeme yapımında kullanılmaktadır (Şekil 1.16). İnsan saçından ve/veya hayvansal dokulardan (yün, tüy vb.) izole edilebilen keratin, doğal proteinler ve polisakkaritlerle belirli oranlarda karıştırılarak 2 boyutlu filmleri ve/veya membranları üretilebilmekte ve üretilen bu filmler ve/veya membranlar deri hasarı onarımı için kullanılabilmektedir (Xu ve ark., 2013). Ayrıca yapılan çalışmalar neticesinde keratinin diğer malzemelerle (doğal proteinler ve polisakkaritler) oluşturulan kompozitlerinin istenilen özellikte malzeme üretiminde daha iyi olduğu düşünülmektedir (S. Wang ve ark., 2015). Ancak ekstraksiyonu için sınırlı sayıda metot bulunması ve elde edilen ekstraktın suda çözünmemesi gibi olumsuz faktörler sebebiyle geçmişte keratinin rejeneratif tıp alanında biyomalzeme olarak kullanımı ile ilgili çalışmalar kollajen kadar ilgi çekici olmamıştır. Fakat son on yıldır geliştirilen yeni metotlarla çeşitli hayvansal dokulardan veya insan saçından ekstrakte edilen veya modifiye edilen keratinin doku mühendisliği yaklaşımı çerçevesinde hücrelerin üzerinde çoğalıp farklılaştığı destek materyali olarak kullanımıyla ilgili çalışmaların sayısının arttığı görülmektedir (Reichl ve ark., 2011). Tüy, yün veya insan saçından elde edilen biyobozunur malzemelerin geliştirilmesi için keratinin suda çözülebilen fraksiyonları (türevleri) kadar iyi mekaniksel özelliklerini arttırıcı ve stabilitesini sağlamakla görevli olan disülfid bağının da belli oranda var olması gerekmektedir. Ancak ekstraksiyon sırasında kullanılan indirgen veya yükseltgen ajanların kullanımı ile yapıdaki disülfid bağlarının yıkımı sonrasında oluşan

keratin polipeptit zincirleri diyaliz gibi saflaştırma işlemleri sırasında agregasyona uğramakta ve sistein kalıntıları (-SH grupları) tekrar okside olarak (disülfid bağ oluşumu) beyaz, opak bir jel oluşmaktadır. Dolayısıyla yapılan bazı çalışmalarda elde edilen keratin ekstrakt diyaliz öncesinde iyodoasetamit, iyodoasetik asit, veya bromosüksinik asit gibi serbest tiyol gruplarını bloke edici ajanlarla kısmen modifiye edilmektedir (Schrooyen ve ark., 2000). Ayrıca literatürde hayvansal kaynaklardan ve insan saçından keratin ekstraksiyonu için üre, tiyoüre, SDS ve 2-merkaptetanöl gibi indirgen ajanların farklı oranda ve derişimde karışımını içeren Shindai çözeltisi bulunmaktadır. Bu yöntem de yine disülfid bağların indirgenerek -SH gruplarının oluşumunu sağlamaktadır (Tanabe ve ark., 2004). Shindai yöntemi iyi verimlerde ve nispeten daha az zarar görmüş keratin ekstraksiyonu için standart bir yöntem olmasına karşın, 2-merkaptetanölün, pahalı ve toksik bir kimyasal madde olması nedeniyle endüstriyel olarak uygun değildir. Dolayısıyla, araştırmacılar daha az toksik, ucuz ve basit ekstraksiyon yöntemleri geliştirmeye çalışmışlardır.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Thirupathi Kumara Raja ve ark. (2013), yara iyileşmesi ve hemostazında büyük uygulama alanı bulunan protein temelli yapıştırıcı bir malzeme hazırlamışlar ve karakterize etmişlerdir. Jelatin-keratin yapıştırıcı ismini verdikleri bu malzemeyi, jelatin-keratin konjugatlarını kinon parçaları ile modifiye edip kafeik asit ile aktif hale getirdikten sonra okside ederek üretmişlerdir. Maksimum yapışma gücü *in vitro* ortamda 16.6 kPa ve *in vivo* ortamda 1,67 MPa olarak ölçülmüştür. Diğer geleneksel cerrahi yapıştırıcılarla karşılaştırıldığında elde ettikleri bu yapıştırıcının yara iyileştirme etkinliğinin % 30'dan fazla olduğu tespit edilmiştir. Konjugatlar arasındaki molekül içi etkileşimler, hücre tutunması ve yara iyileşmesine katkıda bulunan üç boyutlu bir ağ yapısı kazandırmıştır. Yapılan biyouyumluluk çalışmaları ile bu malzemenin klinik uygulamalar için uygun olduğu kanıtlanmıştır.

Y. Wang ve ark. (2016) gerçekleştirdikleri çalışmada keratinin, jelatin ve kollajene göre hücre proliferasyonuna etkisini karşılaştırmalı olarak değerlendirmişlerdir. Bunun için kollajen, jelatin ve keratinin aynı miktar poli(hidroksibutirat-ko-hidroksivalerat) (PHBV) ile elektro eğirme yöntemi kullanılarak nanolif örgü üretilmiştir. Elde edilen nanolif iskelelerin karakterizasyonu için SEM, FTIR ve X-ışını foto elektron spektroskopisi (XPS) kullanılmıştır. Hücre canlılığı ve proliferasyonu sırasıyla MTT ve BrDU testleriyle belirlenmiştir. Buna göre aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark olmamakla birlikte, her üç proteinin de hücre proliferasyonunu arttırdığı belirlenmiştir.

Xu ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada, insan saç keratininden elde ettikleri iskelelerin deri yaralarının tamiri ve rejenerasyonu için etkinliklerini değerlendirmişlerdir. İnsan saçından keratin ekstraksiyonu için distile suda hazırlanan belli oranlarda Tris-HCl, SDS, üre, tiyoüre ve 2-merkaptöetanol içeren Shindai çözeltisini kullanmışlardır. Dondurma-kurutma yöntemi kullanarak elde ettikleri indirgenmiş keratin ile gözenekli iskeleler üretmişlerdir. İskelelerin hücre proliferasyonuna etkileri, biyobozunurluk ve biyouyumluluk gibi özelliklerini ise yaptıkları *in vivo* çalışmalarla değerlendirmişlerdir. Bunun için sıçanlarda tam kalınlıkta yara modeli oluşturmuş ve keratin iskeleleri deri altına implante etmişlerdir. Sonuç olarak, tam kalınlıktaki yaraların kendi kendine iyileşme süreciyle kıyaslandığında, keratin iskelelerin daha iyi bir deri tamiri ve damarlanma sağladığı görülmüştür. Ayrıca, keratin iskelelerin hasarlı bölgede, daha kalın bir epidermis

oluşturduğu, iyileşme sürecinde oluşan yara kasılmalarının daha az olduğu ve hatta yeni oluşan kıl foliküllerinin gözlemlendiği belirtilmiştir.

S. Wang ve ark. (2015) insan saçı keratini ile üç boyutlu hidrojel üretmişlerdir. Keratinin ekstraksiyonu için indirgen ajan olarak Na₂S (sodyum sülfür) kullanılmıştır. Elde edilen keratin hidrojeller ve kollajen hidrojeller ile L929 fare fibroblastları enkapsüle edilmiş ve 16 gün süre ile kültüre edilmiştir. Her iki tip hidrojin hüce canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisi karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, 16 günlük kültür boyunca keratin hidrojeller önemli ölçüde daha az büzülme göstermiştir. İlâveten, kemirgenlerde yapılan *in vivo* çalışmalar neticesinde deri altından implante edilen keratin hidrojellerin orta derecede akut konakçı doku tepkisi gösterdiği kaydedilmiştir. Bu nedenle, araştırmacılar tüm bu sonuçlar neticesinde hücre enkapsüle edilmiş keratin hidrojellerin klinik uygulamalarda üç boyutlu kültür sistemleri olarak geliştirilebileceğini vurgulamışlardır.

Guzman ve ark. (2013) ürettikleri keratoz iskeleleri kullanarak osteoindüktif faktör olarak bilinen kemik morfogenetik faktör 2'nin (BMP-2) iletimi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Bunun için önce insan saçı peroksit gibi yükseltgeyici çeşitli kimyasallar ile yükseltgenmiş. Daha sonra tris baz ile ekstrakte edilmiştir. Bu şekilde elde edilen yükseltgenmiş keratini 'keratoz' olarak isimlendirmişlerdir. Keratoz biyomalzeme yeni bir taşıyıcı /iskele olarak değerlendirilmiş ve sıçanda kritik ölçüde oluşturulan femoral defektli bölgeye implante edilmiştir. Yapılan çalışmalar neticesinde keratoz biyomalzemenin kemik doku mühendisliğinde kullanılabilir özellikte iyi bir BMP-2 taşıyıcı matriks olabileceği vurgulanmıştır.

Zhao ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, elektro eğrilmiş keratin-PCL kompozit nanolifsi malzeme üzerine kemik dokunun doğal yapısında büyük ölçüde var olan kalsiyum fosfat (CaP) minerallerinin homojen şekilde kaplanması için yeni bir metot geliştirilmiştir. Keratin insan saçından Na₂S'ün sulu çözeltisi kullanılarak 40 °C'ta 4 saat süreyle ekstrakte edilmiş ve liyofilize edilerek toz forma getirilmiştir. Elde edilen CaP-keratin-PCL kompozit biyomalzeme üzerine iAMKH'ler ekilmiş ve hücre canlılığı ve proliferasyonu ölçülmüştür. Sonuç olarak, oluşturulan kompozit biyoiskelenin hücre proliferasyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar, kompozit biyomalzemenin kemik doku mühendisliği için potansiyel bir aday olduğunu vurgulamışlardır.

Balaji ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada keratin hayvan boynuzundan SDS, üre ve 2-merkaptoetanolün belli oranlarda suda hazırlanmış ekstraksiyon çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Kollajen ise sığır aşil tendonundan izole edilmiştir. Toz formdaki ekstraktlardan kollajen/keratin iskeleler hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Elde edilen

kompozit iskelelerin gözeneklilik ve mekaniksel kuvvet açısından daha iyi olduğu saptanmıştır. Fibroblast ve miyosit hücre hatları ile yapılan *in vitro* çalışma sonucunda ise gözenekli keratin kollajen hibrit iskelelerin doku mühendisliği uygulamaları için umut vaat edici bir aday olabileceği kanıtlanmıştır.

K. Wang ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada yünden keratin ekstraksiyonu için yeni bir metot önerilmiştir. Kesimhanelerden temin edilen yün parçaları, aseton/etanol içeren karışımda dezenfekte edilmiş, kurutulmuş ve küçük parçalara kesilmiştir. Küçük yün parçaları belirli derişimde üre, L-sistein ve NaOH (sodyum hidroksit) (pH 10.5) içeren ekstraksiyon çözeltisinde dinamik koşullarda 75 °C'ta 5 saat boyunca bekletilmiştir. Elde edilen keratin ekstrakt X-ışını difraksiyon (XRD) ve ¹³C NMR (Nükleer manyetik rezonans) analizi ile karakterize edilmiş ve yün keratini ekstraktındaki α heliks yapı içeriğinin doğal yüne göre daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca, S-S çapraz bağlarının azaldığı ve yaklaşık % 62'sinin parçalandığı yapılan raman spektroskopisi analizi neticesinde belirlenmiştir.

Ji ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada keratinin ördek tüylerinden ekstraksiyonu için imidazol iyonik sıvı, Na₂SO₃ (sodyum sülfite) ve su içeren bir ekstraksiyon çözeltisi kullanılmıştır. Tüyler dezenfekte edilip küçük parçalara ayrıldıktan sonra bu ekstraksiyon çözeltisinde farklı sıcaklık ve sürelerde bekletilerek keratin ekstraksiyonu sağlanmıştır. Ayrıca kullanılan imidazol iyonik sıvı ile atık tüylerden keratinin hızlı bir şekilde yüksek verimlerde ekstrakte edilebileceğini; güçlü asit veya alkali çözeltiler gibi geleneksel metotlar ile karşılaştırıldığında uçucu olmadıkları için tekrar geri kazanılabilen doğa dostu yöntemler olduğu vurgulanmıştır. İlâveten, önerilen yöntemde keratinde bulunan S-S disülfite bağlarını kırabildiği, tekrar geri kazanılabildiği, keratinden kolayca arındırılabilirdiği ve ekstrakte edilen keratinin kalitesine zarar vermediği gibi gerekçelerle Na₂SO₃ kullandıklarını belirtmişlerdir.

Derkus ve ark. (2016) eşsiz biyolojik özelliklerinden dolayı kollajenin tıp, ilaç ve biyomedikal mühendisliği alanlarında kullanılan en yararlı ve umut vaat eden biyomalzemelerden biri olarak kabul edildiğini belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada alternatif bir kaynak olarak denizanası kollajeni kullanmışlardır. *Rhizostoma pulmo* türü denizanasından kollajen izole edip gerekli tüm karakterizasyonlarını yaptıktan sonra aptasensör uygulamaları için çalışmalar yapmışlardır. Denizanası kollajeni kullanılarak tasarlanan aptasensör, nöroklirik çalışmalarda belirlenen dikkat çekici yüksek dedeksiyon limitleri göstermiştir. İlâveten, sonuçlar ELISA testleriyle kıyaslanarak doğrulama yapılmıştır. Elde edilen aptasensörün, trombin seviyesiyle belirlenen çeşitli hastalıkların

linik tanısında kullanılabileceği vurgulanmıştır. Sonuç olarak, deniz kaynaklı kollajenin, memeli kollajenine alternatif olarak biyomühendislik uygulamalarında kullanılabileceği belirtilmiştir.



BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Malzemeler

Keratin kaynağı olarak kullanılan boyasız ve işlem görmemiş insan saç, kuaför/berber gibi saç bakım merkezlerinden temin edilmiştir. Saç materyallerinin temininden önce, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan gerekli izinler (Karar Numarası: 2016-04-11) alınmıştır.

Deniz kaynaklı kollajen izolasyonu için kullanılan *Rhizostoma pulmo* denizanası türü Çanakkale Boğazı'ndan temin edilmiştir.

İzole edilen denizanası kollajenini kıyaslamak ve karakterizasyonu için standart olarak kullanılan tip I memeli kollajeni, Wistar Albino tür sıçanların kuyruklarından izole edilmiştir. Sıçan kuyrukları Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilen deneyler sonucu ortaya çıkan hayvansal atıklarından temin edilmiştir.

Denizanası kollajeni ve insan saç keratin ekstraksiyon ve karakterizasyonu için kullanılan kimyasal ve plastik sarfların tamamı Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Denizanası kollajeni ve keratin ekstraktların saflaştırma işlemi için diyaliz tubing selüloz membran (MWCO: 14000Da, Sigma Aldrich, D9527) kullanılmıştır.

Üretilen iskelelerin mekaniksel dayanımlarını arttırmak amacıyla N-hidroksi süksinimit (NHS) (Sigma Aldrich) ve N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit hidroklorür (EDC) (Merck) gibi kimyasallar ile çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan iAMKH'ler (Merck-Millipore, lot no: QVP1303200) yurt dışından temin edilmiştir. Temin edilen kök hücrelerin çoklu soy farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi için adipogenezis (Gibco, A10064-01), kondrogenezis (Gibco, A10064-01) ve osteogenezis (Gibco, A10066-01) kitleri kullanılarak indüksiyon çalışmaları yapılmıştır. Osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmanın histokimyasal karakterizasyonu için sırasıyla Alizarin Red S (Sigma Aldrich, A5533), Safranin O (Sigma Aldrich, S8884) ve Alcian Blue 8gX (Sigma Aldrich, A3157) ve Oil Red O (Sigma Aldrich, A0625) boya kullanılmıştır.

Kök hücreler özel bir besiyerinde (Merck-Millipore Human Mesenchymal –LS Supplemnet Kit, Lot: 2395792), steril doku kültür kaplarında (Corning, NY, ABD)

çoğaltılıp kültüre edilmiştir. Hücreleri pasajlama işleminde tripsin/EDTA çözeltisi (Sigma Aldrich) kullanılmıştır.

İskeleler üzerindeki hücre canlılık ve çoğalma düzeyleri MTT test kiti (Sigma Aldrich) ile belirlenmiştir.

3.1.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Deneylerde kullanılan Tip I ve Tip III kalitesindeki saf su, Merck-Millipore marka Milli Q model saf su sistemi kullanılarak temin edilmiştir.

Ekstraksiyon için kullanılan çözeltilerin ve tamponların hazırlanmasında Elma marka S 30H model ultrasonik banyo kullanılmıştır.

Ekstrakte edilen proteinlerin karakterizasyonları için gerekli tüm spektrofotometrik ölçümler Shimadzu marka UV mini-1240 model spektrofotometre cihazı ile yapılmıştır.

İskeleler üzerine ekilen hücrelerin canlılık ve çoğalma düzeyleri spektroskopik olarak mikro plaka okuyucu (Thermo-Scientific, Multiskan™ with mdrop™ plate) kullanılarak ölçülmüştür.

Gözenekli DMİ'lerin üretimi için liyofilizasyon (dondurma-kurutma) işlemi yapılmıştır. Bu amaçla Telstar (Spain) marka LyoQuest model liyofilizatör kullanılmıştır.

Keratin/kollajen kompozit iskelelerin hazırlanması sırasında düzgün homojen bir karışım elde etmek amacıyla vorteks (IKA Genius 4) kullanılmıştır.

Tüm deneysel aşamalar sırasında gerekli tartımlar Mettler Toledo marka hassas terazide yapılmıştır.

SDS-PAGE sırasında proteinlerin 100 °C'ta belirli sürelerde denatürasyonu için Jeiotech marka blok ısıtıcı kullanılmıştır. Maksimum 100 °C'ye kadar ısıtma kapasitesi olan cihaz dinamik koşullarda istenilen sıcaklıklarda karıştırma işlemi için de kullanılmıştır.

Tamponların ve diğer çözeltilerin pH'sını ayarlamak için Mettler Toledo marka pH metre kullanılmıştır.

Ekstraksiyon çalışmaları sırasında elde edilen verileri etkileyen birçok parametrenin (sıcaklık, derişim, çeşitli kimyasallar vb.) aynı anda hızlı ve karşılaştırmalı olarak incelenmesi için çoklu manyetik karıştırıcı (Jeiotech) kullanılmıştır.

Ekstrakte edilen proteinlerin karakterizasyonu için belirli bir pH'da elektriksel bir alanda ve iyonize ortamda moleköl büyüklüğüne göre ayrılması ve saflığının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan bir teknik olan SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Bunun için

Thermo (Dual-Gel Vertical Electrophoresis Systems (P8DS, MA, USA)) marka jel sistemi kullanılmıştır.

Proteinlerin ekstraksiyonu sırasında çözünmeyen parçaları veya safsızlıkları uzaklaştırmak için düşük devirlerde (Hettich EBA20, 145 Germany) ve yüksek devirlerde (Hettich Micro120, Germany) santrifüj işlemi yapılmıştır.

Hücre kültürü çalışmaları Class II A-2 laminar akışlı kabinde (Telstar) yapılmıştır. Ayrıca hücreler %5 CO₂ , % 95 hava ve % 90 bağıl nem ve 37 °C'de sıcaklık sağlayan inkübatörde (Panasonic) kültüre edilmiştir. Histokimya çalışmaları ve hücrelerin mikroskopik gözlemi için invert faz-kontrast (Zeiss, Primovert, Almanya) ve ışık mikroskobu (Zeiss, Axio Scope A1, Almanya) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

Bu tez çalışmasında insan saçından keratin ve *Rhizostoma pulmo* türü denizanasından kollajen izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Literatürde var olan yöntemler ile kıyaslanarak yapılan optimizasyon çalışmaları neticesinde, keratin ekstraksiyonu için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Ayrıca standart olarak kullanılan memeli tip I kollajeni sıçan kuyruğundan izole edilmiştir. Elde edilen suda çözülebilir özellikte olan toz şeklinde keratin ve kollajen ekstraktlar biyokimyasal olarak (Lowry protein tayini, SDS-PAGE, sülfür ve hidroksiprolin tayini) karakterize edilmiştir. Belli oranlarda suda çözülerek elde edilen protein çözeltiler özel kalıplara alındıktan sonra dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak üç boyutlu gözenekli kollajen ve kollajen/keratin kompozit DMİ'ler üretilmiştir. İskeleler mekaniksel dayanımlarını arttırmak amacıyla çapraz bağlanmıştır. Üretilen DMİ'ler SEM, FTIR ve TGA cihazları ile fizikokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Satın alınan iMKH'lerin kondrojenik, osteojenik ve kondrojenik olmak üzere çoklu soy farklılaşma çalışmaları yapılmıştır. Farklılaşma düzeyi histokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Üretilen biyoiskeleler üzerine iMKH'ler ekilmiş ve 14 gün boyunca kültüre edilmiştir. Biyomalzeme üzerindeki canlılık ve çoğalma düzeyleri 3, 7 ve 14.günler için MTT testi ile belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar, insan saçından keratin ekstraksiyonu, denizanasından kollajen izolasyonu, sıçan kuyruğundan kollajen izolasyonu, proteinlerin biyokimyasal olarak karakterizasyonu, DMİ'lerin üretimi, iskelelerin fizikokimyasal karakterizasyonu, SEM analizi ve hücre kültürü çalışmaları şeklinde gruplandırılmıştır.

3.2.1. İnsan Saçından Keratin Ekstraksiyonu

İnsan saçından keratin ekstraksiyonu için yıkama, dezenfeksiyon ve delipidizasyon gibi işlemler uygulanmıştır. Ön hazırlık aşamasına tabi tutulan saç numuneleri çeşitli ekstraksiyon çözeltileri ile muamele edilerek optimum izolasyon yöntemi belirlenmeye çalışılmıştır. İnsan saçından keratin ekstraksiyonu için” yapılan tüm deneysel çalışmalar aşağıda sıralanmıştır.

3.2.1.1. Yıkama, Dezenfeksiyon ve Delipidizasyon İşlemi

Rastgele seçilip laboratuvara getirilen saçlar sıcak su ve deterjanla (% 1 (w/v) SDS) 30 dk. boyunca yıkanarak iyice durulanmıştır. Yıkanıp kurutulan saçlar dezenfeksiyon işlemi için % 99,9'luk etanol ile 30 dk. daha muamele edildikten sonra oda sıcaklığında kurutulmuş ve küçük parçalara kesilmiştir. Harici lipidleri uzaklaştırmak amacıyla, küçük parçalara kesilen saçlar (2:1) (v\ v) kloroform:metanol içeren çözelti ile 16 saat boyunca delipidize edilmiştir. Delipidizasyon işleminden sonra saçlar tekrar oda sıcaklığında kurutulmuştur.

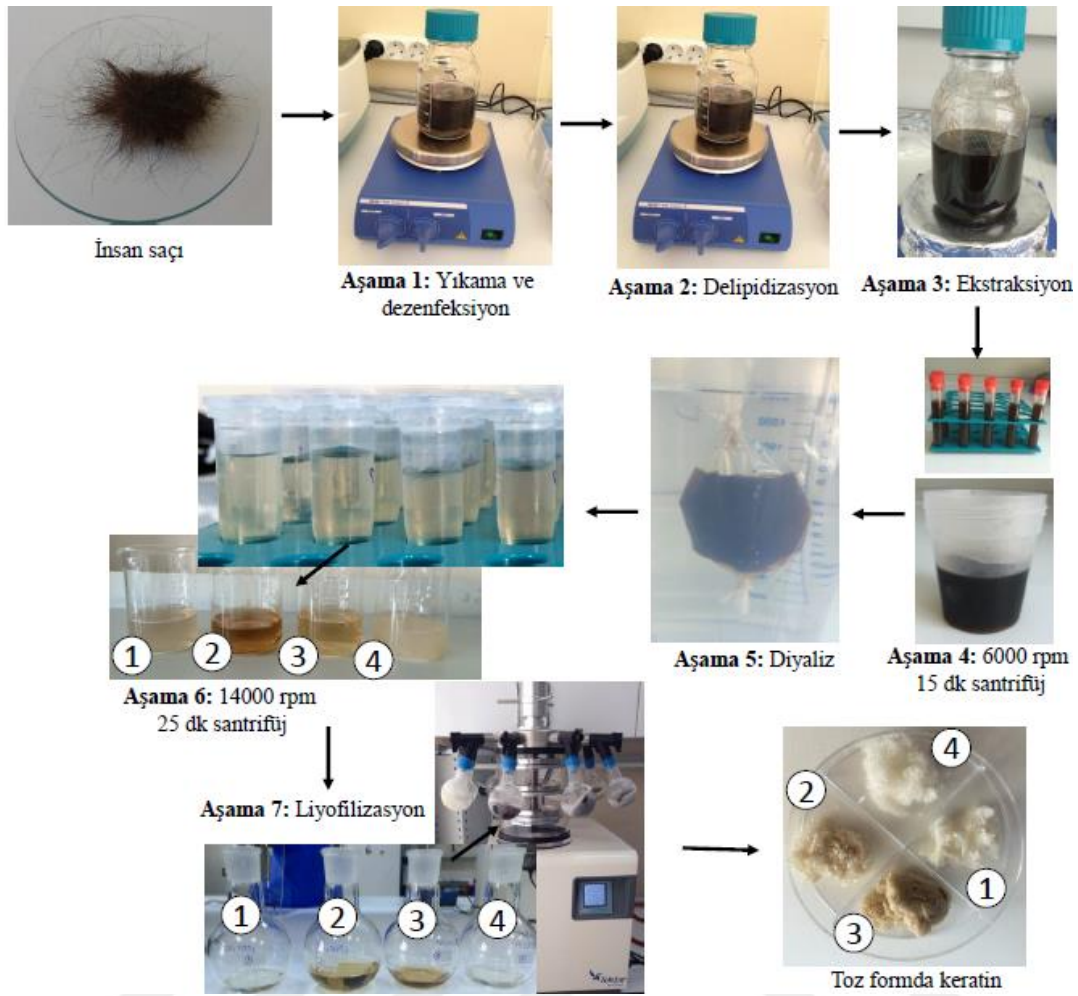
3.2.1.2. Ekstraksiyon İşlemi

Ekstraksiyon işleminin optimizasyon çalışmaları için 4 ayrı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerde kullanılan ekstraksiyon çözeltilerinin içeriği ve süreleri haricinde yapılan diğer işlemler aynı olup çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Ekstraksiyon yöntemleri

Yöntem no	Saç miktarı	Ekstraksiyon çözeltisi	Süre	Sıcaklık	Kaynak
1. yöntem	5g	0,1 M Na ₂ S ve % 5 (w/v) NaOH'in sulu çözeltisi (100 ml)	2 saat	40-50 °C	(Wrzeńska-Tosik ve Adamiec, 2007) makalesinden modifiye edilmiştir.
2. yöntem	5g	%5(w/v) NaOH ve %5(w/v) Na ₂ SO ₃ 'in sulu çözeltisi (100 ml)	45 dakika	40-50 °C	-
3.yöntem	5g	%5(w/v) NaOH'in sulu çözeltisi (100 ml)	1 saat	40-50 °C	-
4.yöntem	5g	8 M üre, 0.26 M SDS ve 1.66 M 2-merkaptoetanol'ün sulu çözeltisi (100 ml)	16 saat	40-50 °C	(Reichl ve ark., 2011; Tanabe ve ark., 2004) makalelerinden modifiye edilmiştir.

Çizelge 3.1'e göre yapılan ekstraksiyon işlemleri dinamik koşullar altında (ısıtıcılı magnetik karıştırıcı ile) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen keratin ekstraktlar oda sıcaklığına getirildikten sonra çözünmeyen saç parçalarından uzaklaştırılması için gazlı bezden süzölmüştür. Süzöntü daha sonra 6000 rpm 15 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Ekstraktın içeriğinde var olan aşırı alkali ortam, SDS, üre, 2-merkaptoetanol gibi safsızlıklardan arındırmak ve ekstraktın pH'sını 7,2-7,4 'e ayarlamak için, elde edilen süpernatant oda sıcaklığında 2-5 gün süreyle distile suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz suyu her gün değiştirilmiştir. Diyaliz sonunda oluşan protein agregatlarını ayırmak için 14000 rpm 25 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Berrak protein çözeltiler cam balonlara konularak -40 °C'ta dondurulmuştur. Toz formda keratin elde etmek için bir gece boyunca liyofilize edilmiştir. Elde edilen toz keratin -26 °C'ta saklanmıştır. İnsan saçından keratin ekstraksiyonunu gösteren genel şema Şekil 3.1'de verilmiştir. Şemada verilen numaralandırmada çizelge 3.1'de bahsi geçen ekstraksiyon yöntemleri belirtilmiştir.



Şekil 3.1. İnsan saçından keratin ekstraksiyonunun şematik gösterimi

3.2.2. Denizanasından Kollajen İzolasyonu

Rhizostoma pulmo türü denizanasından kollajen izolasyonu Derkus ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada önerilen prosedür takip edilerek yapılmıştır. Bu prosedüre göre, çok tuzlu bir koruma çözeltisinde laboratuvara getirilen denizaneleri saf suyla birkaç tur yıkanmıştır. Yıkanan denizanası parçaları % 99,99'luk etanol ile 4-6 saat boyunca muamele edilmiştir. Bu şekilde dehidrate edildikten sonra oda şartlarında bir gece bekletilerek kurutulmuştur. Kollajen olmayan yapılardan arındırmak amacıyla, 1 g örnek 0,1 M NaOH içeren sulu çözeltide dinamik ortamda 4°C'ta 2 gün boyunca bekletilmiştir. Bu işlem, alkali çözelti günde bir kez değiştirilerek yapılmıştır. Daha sonra, kollajen tabakalar pH 7,2-7,4 oluncaya kadar saf su ile yıkanmıştır. Tabakalar, -40 °C'ta dondurulmuş ve liyofilize edilerek daha sonra kullanılmak üzere -86 °C'ta saklanmıştır. Kollajen tabakalar (yaklaşık 1g) 0,5 M 100 ml asetik asit çözeltisinde 4°C'ta su-buz banyosu üzerinde 2 dk. homojenize edilmiştir. Atelokollajen elde etmek amacıyla, homojenizat içerisine 100 mg pepsin (600–1200 U/mg) ilave edilerek 3 gün boyunca

4°C'ta karıştırılmıştır. Soğuk ortamda gerçekleşen reaksiyon nedeniyle protein çözelti hafif jelleşebilmektedir. 37-40 °C 'ta hazırlanan sıcak su banyosunda hafif ısıtıldıktan sonra çözünmeyen kollajen parçalarını uzaklaştırmak amacıyla elde edilen vizkoz protein çözelti 3400 g'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Enzim inaktivasyonu için, santrifüj sonrası süpernatantlar toplanıp 0,02 M Na₂HPO₄ (pH: 8,8) içeren tampona karşı 4 °C'ta 3 gün boyunca diyaliz edilmiştir. (Bu işlem sonunda soğuk nedeniyle protein çözelti jelleşmişse bahsi geçen ısıtma işlemi tekrarlanabilir). Çöken protein agregatların ayrılması amacıyla, diyalizat 10,000 g'de 2 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar cam balonlara konulup -40 °C'ta dondurulmuş ve 24 saat süreyle liyofilize edilerek toz formda suda çözülebilir özellikte atelokollajen elde edilmiştir. Toz formdaki kollajen -26 °C'ta saklanmıştır. Denizanasından kollajen izolasyonunu gösteren genel şema Şekil 3.2'de verilmiştir.

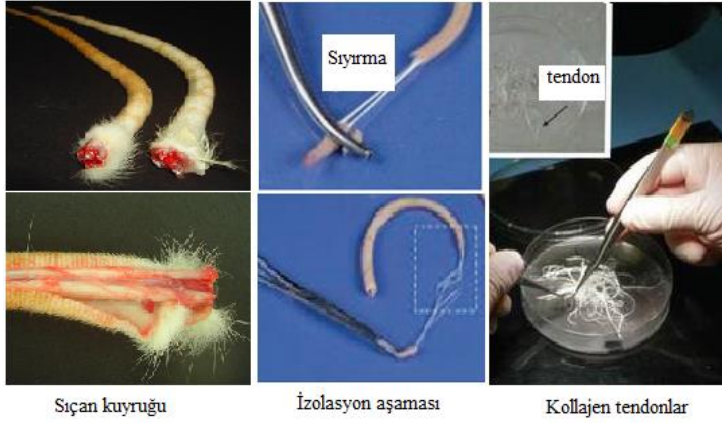


Şekil 3.2. Denizanasından kollajen izolasyonunun şematik gösterimi (Derkus ve ark., 2016)

3.2.3. Sıçan Kuyruğundan Kollajen Tip I İzolasyonu

Soğuk zincirle laboratuvara getirilen sıçan kuyrukları suyla yıkanıp temizlendikten sonra % 80'lik etil alkolde bir süre bekletilerek sterilize edilmiştir. Sterilize edilen kuyruklar tekrar distile suya batırılıp fazla suyu alındıktan sonra 24 saat -26 °C'ta dondurulmuştur. Ertesi gün donmuş sıçan kuyruklarının buzu çözüldükten sonra tekrar % 80'lik alkolde bir müddet bekletilmiştir. Alkolle muamele edildikten sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. İzolasyon için öncelikle pens, makas, bistüri gibi

cerrahi aletler yardımıyla kuyruğun dış derisi alınıp atılmıştır. Daha sonra beyaz filament şeklindeki kollajen tendonlar tutulup çekilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Sıçan kuyruğundan kollajen tendon izolasyonu (Gil ve del Río, 2012; Rajan ve ark., 2006)

Alınan kollajen tendonlar tekrar etil alkolle birkaç tur yıkandıktan sonra oda şartlarında kurutulmuş ve kullanılmayan kısım -26°C 'ta saklanmıştır. Elde edilen uzun kollajen tendonlardan 500 mg tartılmış ve küçük parçalara kesilerek 50 ml 0,5 M asetik asit içinde oda sıcaklığında karıştırılmaya başlanmıştır. Karıştırma işlemine kollajen tendonlar tamamen çözünene kadar devam edilmiştir. Reaksiyon sırasında çözelti jelleşebilmektedir. Bunun için viskoz çözelti birkaç dakika $37-40^{\circ}\text{C}$ 'ta sıcak su banyosunda bekletilebilir. Elde edilen süspansiyon iki defa gazlı bezden süzölmüştür. Süzüntü, asitliği dengelemek amacıyla 0,1 M asetik aside karşı 24 saat boyunca diyaliz edilmiştir. Diyalizat cam balona alınmış ve -26°C 'ta dondurularak bir gece boyunca liyofilize edilmiştir. Elde edilen toz şeklinde asitte çözünmüş tip I kollajen daha sonra kullanılmak üzere -26°C 'ta saklanmıştır.

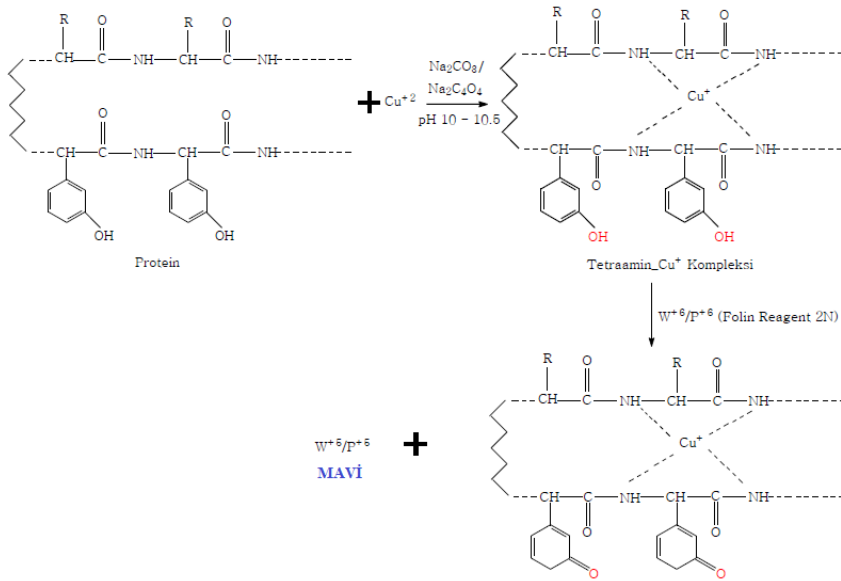
Pepsinde sindirilmiş tip I kollajen elde etmek amacıyla, 100 mg pepsin (600–1200 U/mg) içeren 100 ml 0,01 N HCl çözeltisi hazırlanmıştır. 1g toz şeklindeki asitte çözünmüş kollajen bu enzim çözeltisine ilave edilip oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Enzim inaktivasyonu için, 0,02 M Na_2HPO_4 (pH: 8,8) içeren tampona karşı 4°C 'ta 3 gün boyunca diyaliz edilmiştir. Elde edilen protein çözeltisi cam balonlara alınıp dondurulduktan sonra liyofilize edilerek toz forma getirilmiştir. Daha sonra kullanılmak üzere -26°C 'ta saklanmıştır.

3.2.4. İnsan Saç Keratini ve Denizanası Kollajeninin Biyokimyasal Analizi

İzole edilen denizanası kollajeni ve saç keratininin biyokimyasal karakterizasyonu için Lowry protein tayini ve SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Ayrıca kollajen ve keratin için sırasıyla hidroksiprolin ve serbest sülfidril grup tayini gibi spesifik karakterizasyonlar da yapılmıştır.

3.2.4.1. Lowry Protein Tayini

İnsan saç keratini ve denizanası atelokollajeninin protein içeriği Lowry metodu ile belirlenmiştir. Bunun için öncelikle standart kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Keratin için BSA (Sığır serum albümin) ve denizanası kollajeni için ise izole edilen pepsinde çözünmüş sıçan kuyruğu tip I kollajeni, standart protein olarak kullanılmıştır. Protein tayin metodu, Lowry ve ark. (1951) tarafından önerilen prosedüre göre yapılmıştır. Bu yöntem, Fosfomolibdik/fosfotungustik asit çözeltisinin (Folin-Ciocalteu reaktifi) alkali koşullarda proteinlerdeki fenolik amino asitlerle verdiği reaksiyona dayanmaktadır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Lowry protein tayin metodu için muhtemel reaksiyon mekanizması

Reaksiyon için öncelikle A reaktifi (100 ml saf suda hazırlanmış 0,571 g NaOH ve 2,86 g Na₂SO₃ içeren çözelti), B reaktifi (100 ml saf suda hazırlanmış 1,4232 g CuSO₄.5(H₂O)) ve C reaktifinin (100 ml saf suda hazırlanmış 1.34 g NaK(COO)₂ (CHOH)₂.4H₂O içeren çözelti) sırasıyla 100:1:1 oranlarında karıştırılmasıyla elde edilen Lowry çözeltisi ve Folin-Ciocalteu reaktifi (5 mL 2N Folin Ciocalteu's Fenol Reaktifi ve 6 ml ultra saf su) hazırlanmıştır. Bu iki çözeltinin taze hazırlanmasına dikkat edilmelidir.

BSA standart stok çözeltisi 1mg/ml konsantrasyonda ultra saf suda hazırlanmış ve 0,02-0,2 mg/ml olacak şekilde dilüsyonlar hazırlanmıştır. Sıçan kuyruğu tip I kollajen standart stok çözeltisi ise 1 mg/ml konsantrasyonda 0,1 M asetik asitte hazırlanmış ve 0,01-0,3 mg/ml olacak şekilde dilüsyonlar hazırlanmıştır. Reaksiyon için öncelikle 0,5 ml protein çözeltisi 0,7 ml Lowry çözeltisi ile karıştırılarak iyice vortekslenmiştir. Karışım 20 dk. karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra 0,1 ml Folin-Ciocalteu reaktifi (sarı renkte) eklenmiş ve yine karanlıkta 30 dk. daha bekletilmiştir. Reaksiyon tamamlandığında çözeltilerin mavi renkte olduğu görülmüştür. UV-VIS spektrofotometre kullanılarak standart çözeltilerin absorbanları 650 nm’de ölçülmüştür. Denizanası kollajeni ve insan saç keratini diyalizatlarındaki konsantrasyonları baz alan % verim hesapları, kalibrasyon grafikleri ve denklem 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Lowry sonucuna göre \% verim hesabı: } [(OD650 / \text{eğim}) \times (\text{seyreltme faktörü}) \times \text{toplam diyalizat hacmi (ml)}] / [(\text{ham malzeme miktarı (mg)}) \times 100] \quad (3.1)$$

Liyofilize edilen denizanası kollajeni ve insan saç keratininin kuru ağırlıkları baz alınarak % verim hesapları denklem 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Kuru ağırlığa göre \% verim: } [(\text{proteinlerin kuru ağırlığı (mg)}) / \text{ham malzeme miktarı (mg)}] \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.4.2. SDS-PAGE Analizi

Proteinlerin moleküler büyüklüğünü analiz etmek ve proteinlere ait polimer zincirlerinin karakteristik bandlarını belirlemek için SDS-PAGE analizi yapılmıştır. SDS-PAGE analizi en çok kullanılan metotlardan biri olan Laemmli (1970) metoduna göre yapılmıştır. Bu metoda göre 4 farklı yöntem ile ekstrakte edilen keratin ve BSA için % 12,5’luk ayırma jeli ve % 4’lük yükleme jeli hazırlanmıştır. Denizanası atelokollajeni ve sıçan kuyruğu tip I kollajeni için ise % 10’luk ayırma jeli ve 4’lük yükleme jeli hazırlanmıştır. Jel hazırlama prosedürü çizelge 3.2’de verilmiştir.

Öncelikle jel sistemi içerisinde yer alan jel tankı düz bir şekilde ayarlanmıştır. Ayırma jeli içeriği hazırlanmış ve jelin kalınlığını belirleyen açıklıktan düzgün bir şekilde uygulanmıştır. Hemen üzerine jelin hava almaması ve düzgün polimerleşmesi için % 99,9 izopropil alkol ilave edilmiş ve yaklaşık bir saat beklenmiştir. 1 saat sonunda jelin üzerindeki alkol dökülmüş ve hazırlanan ayırma jeli overlay ile 2 defa yıkanıp filtre

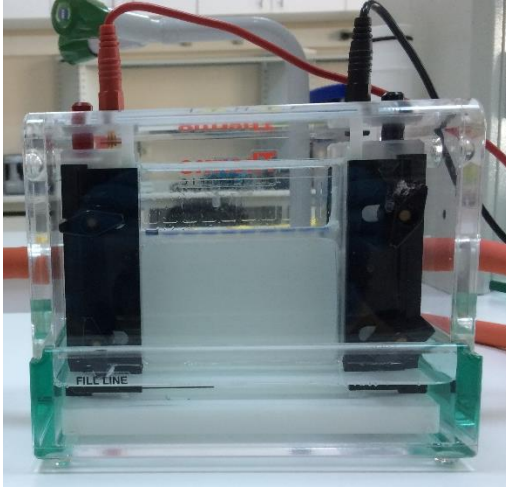
kağıdıyla iyice kurulanmıştır. Daha sonra yüklemi jeli hazırlanarak düzgün bir şekilde uygulanmış ve kuyucuk açmak için kullanılan tarağı ayırma jeliyle yaklaşık 1 cm mesafe kalana kadar tank açıklığından içeri sokulmuştur. Jelin donması için yaklaşık 30 dk. beklenmiş, bu süre sonunda yürütme tamponu tankın ve jelin içine gelecek şekilde belli bir seviyeye kadar ilave edilmiştir. Jelin iyice ıslandığından emin olunduktan sonra tarak çıkarılarak kuyucukların oluşumu sağlanmıştır. Bekleme süresinde uygulanacak olan protein çözeltiler hazırlanmıştır. Keratin çözeltisi (her 4 yöntem için)(10 mg/ml), denizanası kollajeni çözeltisi (10 mg/ml) ve BSA çözeltisi (0,2 mg/ml) ultra saf suda hazırlanmıştır. Sıçan kuyruğu tip I kollajen çözeltisi ise (10 mg/ml) 0,1 M asetik asitte hazırlanmıştır.



Çizelge 3.2. SDS-PAGE jel hazırlama çözeltileri ve prosedürü (jel kalınlığı 0,75 mm)

Kullanılan çözeltiler	% 10'luk 10 ml yürütme jeli	% 12,5'luk 10 ml yürütme jeli
Akrilamid çözeltisi (% 30 (w/v) akrilamid ve % 0,8 (w/v) bisakrilamidin sudaki çözeltisi. Elde edilen çözelti 4 °C'ta karanlık şişede 3 ay saklanabilir)	3,3 ml	4,2 ml
4x ayırma jeli tamponu (1,5 M Tris-hidroklorür (Tris-HCl)'ün sudaki çözeltisi (pH 8.8). Elde edilen çözelti 4 °C'ta 3 ay saklanabilir.)	2,5 ml	2,5 ml
% 10 SDS (% 10 (w/v) SDS'in sudaki çözeltisi. Elde edilen çözelti oda sıcaklığında karanlık şişede 6 ay saklanabilir)	0,1 ml	0,1 ml
Ultra saf su	4 ml	3,2 ml
Amonyum per sülfat (APS) (% 10 (w/v) APS'nin sudaki çözeltisi. Taze hazırlanmalıdır.)	50 µl	50 µl
TEMED (Ticari olarak satın alınmıştır.)	3,3 µl	3,3 µl
% 4 'lük 10 ml yükleme jeli		
Akrilamid çözeltisi		1,33 ml
4x yükleme jeli tamponu (0.5 M Tris-Cl'ün sudaki çözeltisi (pH 6,8). Elde edilen çözelti 4 °C'ta 3 ay saklanabilir.)		2,5 ml
% 10 SDS		0,1 ml
Ultra saf su		6 ml
APS		50 µl
TEMED		5 µl
Diğer çözeltiler		
Elektroforez tamponu (0,025 M Tris, 0.192 M glisin, % 0.1 SDS'in sudaki çözeltisi (pH 8.3). Elde edilen çözelti oda sıcaklığında 1 ay saklanabilir. Kullanılan tampon süzülerek tekrar kullanılabilir. pH kontrol edilmelidir.		
2X numune hazırlama tamponu (0.125 M Tris-HCl, % 4 SDS, % 20 (v/v) gliserol, 0.2 M 2-merkaptotanol, % 0,02(w/v) bromofenol blue'nun sudaki çözeltisi (pH 6.8). Elde edilen tampon ışıktan korunmalıdır. Porsiyonlanarak -26 °C'ta 6 aya kadar saklanabilir.		
Ayırma jeli overlay (0.375 M Tris-HCl, % 0,1 SDS'in sudaki çözeltisi (pH 8.8). Elde edilen çözelti 4 °C'ta 3 ay saklanabilir.)		

Proteinler yüklenmeden önce numune tamponu ile 1:1 oranında seyreltilmiş ve iyice vortekslelendikten sonra blok ısıtıcıda 100 °C'ta 5 dk. süreyle denatüre edilmiştir. Tarak çıkarıldıktan sonra her bir kuyucuğa protein marker (Biolabs, P7712S, Color Prestained Protein Standard, 11–245 kDa) ve diğer protein çözeltilerden 5'er µl yüklenmiştir. Sonuç olarak, BSA 0,5 µg ve diğer proteinler 25'er µg olmak üzere her bir kuyucuğa yükleme yapılmıştır. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra yürütme işlemi 10 °C'ta ve 15 mA'e sabitlenen güç kaynağı ile yaklaşık 60-90 dk. süreyle yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. SDS-PAGE analizi

Yürütme sonunda jel, çeşme suyu altında alınmış ve Coomassie Brilliant Blue R250 boyaması yapılarak bantların belirgin hale gelmesi sağlanmıştır. Boyama prosedüründe kullanılan çözeltilerin içeriği çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Coomasie Blue R250 boyama çözeltileri

Coomasie Blue boyama çözeltisi (100 ml)
% 0,025 (w/v) Coomasie Brilliant Blue R250 ve % 40 (v/v) metanol oda sıcaklığında iyice karıştırılır. Karışım süzülür. Süzüntü üzerine (%7 (v/v)) asetik asit eklenir ve üzeri ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan boya 6 ay oda sıcaklığında saklanabilir.
Boya geri alma I çözeltisi (100 ml)
% 40 (v/v) metanol ve %7 (v/v) asetik asit karıştırılır. Üzeri ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlanır. Karışım oda sıcaklığında saklanabilir.
Boya geri alma II çözeltisi (100 ml)
% 5 (v/v) metanol ve %7 (v/v) asetik asit karıştırılır. Üzeri ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlanır. Karışım oda sıcaklığında saklanabilir.

Jel, hazırlanan boya içerisinde hafifçe karıştırılarak yaklaşık 1 saat boyanmıştır. Daha sonra jel boya geri alma I çözeltisi içinde yine dinamik ortamda 30 dk. boyunca bekletilmiştir. Son olarak jel boya geri alma II çözeltisinde arka planın rengi iyice açılıp bantlar belirgin hale gelene dek bekletilmiştir. Elde edilen jelin görüntüsü Biorad görüntüleme cihazı ile alınmıştır. Jel İstenildiği takdirde, boya geri alma II çözeltisinde saklanabilir.

3.2.4.3. Hidroksiprolin Tayini

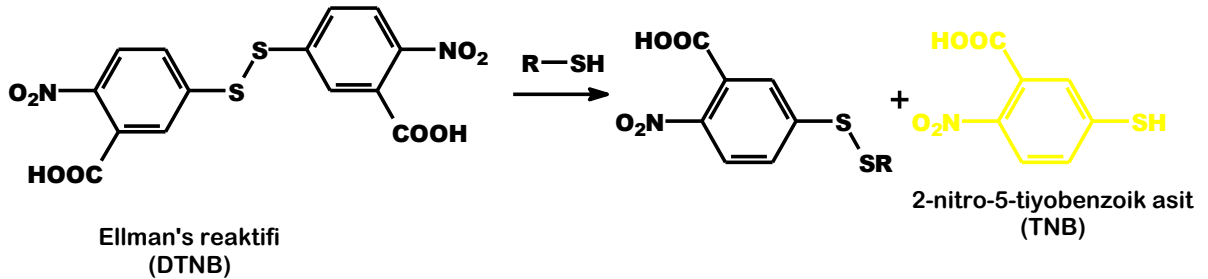
Kollajenin önemli bileşenlerinden biri olan hidroksiprolin amino asit kompozisyonunun yaklaşık % 13,5'ünü oluşturmaktadır. Bu açıdan, dehidrate edilmiş ve kurutulmuş ham denizanası ve izole edilen denizanası kollajeninde hidroksiprolin tayini yapılmıştır. Analiz için ticari olarak satın alınmış hidroksiprolin ölçüm kiti (Sigma-Aldrich) kullanılmış ve tüm işlemler üretici firmanın prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, denizanası kollajeni ve ham denizanasından 5'er mg tartılarak 100 µL 12 M HCl ve 100 µL ultra saf su içeren asitli çözeltide 120°C'ta 3 saat boyunca hidroliz edilmiştir. Bu işlem sonunda kömürleşen partiküllerin arındırılması için süspansiyon 14000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatandan 2 µL alınıp 96 kuyucuklu kültür plastiğine koyulduktan sonra 60°C'a ayarlanmış etüvde iyice kurutulmuştur. Tüm örnekler kit içeriğinde var olan 0,4 µg hidroksiprolin standardı ile spike yapılmıştır. Bu işlem ölçümün güvenilir olması açısından önem taşımaktadır. Örneklerin ve standardın bulunduğu her bir kuyucuğa kloramin T/ oksidasyon tampon karışımı eklendikten sonra oda koşullarında 5 dk. bekletilmiştir. Daha sonra üzerine 4-(Dimetilamino)benzaldehit (DMAB) eklenip 60 °C'ta 90 dk. daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda çözeltilerin absorbansı 560 nm'de mikro plaka okuyucuda ölçülmüştür. Hidroksiprolin miktarı denklem 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Örnekteki hidroksiprolin miktarı} = \frac{A_{560}(\text{örnek})}{A_{560}(\text{spike yapılmış kontrol})} - A_{560}(\text{örnek}) \times 0.4 \mu\text{g} \quad (3.3)$$

3.2.4.4. Serbest Sülfidril Grubu İçerik Analizi

Keratinlerin sistein içeriği diğer proteinlere göre daha fazladır (toplam amino asit rezidülerinin % 6-17'si) ve bu da daha fazla molekül içi disülfid bağ oluşumuna sebep olmaktadır. Sistein disülfid bağları ekstraksiyon sırasında parçalanarak sistein tiyol (indirgenmiş keratin) grupları oluşmaktadır. Dolayısıyla keratin ekstraktaki sülfidril gruplarının varlığını spektrofotometrik olarak analiz etmek için Ellman's reaktifi (5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)) kullanılmıştır. Analiz, Silva ve ark. (2014) tarafından önerilen prosedüre göre yapılmıştır. Öncelikle ticari olarak satın alınan L-sistein standardı kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Bunun için ultra saf suda hazırlanmış 0,1 M NaH₂PO₄ (sodyum fosfat mono bazik) ve 1mM etilendiamintetra asetik asit (EDTA) içeren reaksiyon tamponu (pH 8,0) hazırlanmıştır. Ellman's reaktif (Sigma-Aldrich) çözeltisi (4 mg/ml) reaksiyon tamponunda çözülerek hazırlanmıştır. L-sistein standart

çözeltileri 0,1-0,8 mM konsantrasyonlarında olacak şekilde reaksiyon tamponu içinde hazırlanmıştır. 250 µl protein çözelti, 2,5 ml reaksiyon tamponu ve 50 µl Ellman's reaktif çözeltisi içeren karışım iyice vortekslenmiş ve 15 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonunda oluşan kompleks sarı renklidir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Ellman's reaksiyonu

Derişim arttıkça rengin şiddeti de artmıştır. İnkübasyon sonunda, çözeltilerin absorbanı UV-VIS spektrofotometrede 412 nm'de ölçülmüş ve kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

Keratindeki serbest sülfidril grup içeriğinin belirlenmesi için belli miktarda katı/toz keratin reaksiyon tamponunda çözülmüştür (kalibrasyon grafiğinin üst limitini aşmayacak şekilde absorbanı vermesine dikkat edilmeli) ve aynı prosedür takip edilmiştir. Serbest sülfidril grup içeriği kalibrasyon grafiği ve denklem 3.4 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{mM serbest SH grupları /g keratin} = [(\text{OD}_{412} / \text{eğim}) \times (\text{seyreltme faktörü} \times \text{toplam hacim})] / \text{keratin ağırlığı (g)} \quad (3.4)$$

3.2.5. Kollajen ve Kollajen-Keratin Biyokompozit DMİ'lerin Üretimi

Üç boyutlu gözenekli DMİ'ler liyofilizasyon işlemi kullanılarak üretilmiştir. Bunun için öncelikle 2. yöntemle göre elde edilen keratin fragmanları ve atelokollajenin % 3 (w/v) konsantrasyonunda sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Elde edilen kollajen ve keratin çözeltiler 1:1 (v/v) oranında karıştırılmıştır. Kollajen çözelti (% 3 w/v) ve keratin-kollajen karışımı (% 3 w/v) özel kalıplara döküldükten sonra -26 °C'ta bir gece bekletilerek dondurulmuştur. Daha sonra liyofilize edilerek üç boyutlu gözenekli iskeleler elde edilmiştir. İskeleler, sağlamlıklarını arttırmak amacıyla N-hidroksisüksinimit (NHS) ve N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimit hidroklorür (EDC) gibi kimyasallar kullanılarak çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlama işlemi, Buttafoco ve ark. (2006) tarafından yapılan

çalışmadaki prosedür modifiye edilerek uygulanmıştır. Öncelikle prosedür için gerekli çözeltiler hazırlanmıştır. Bunun için 0,05 M 2-morfolinoetansülfonik asit (MES) tamponu ultra saf suda çözünmüş ve pH'sı 5,5'a ayarlanmıştır. Daha sonra sulu tampon çözeltisi ve % 99,99 etanol sırasıyla 1:9 oranında karıştırılmıştır. Her bir iskele (6 mg) için yaklaşık 1ml MES tamponu hazırlanmıştır. Çapraz bağlama çözeltisi (her bir iskele için) 6,72 mg NHS ve 27,6 mg EDC tartılıp 1 ml MES tamponunda çözülerek hazırlanmıştır. Gerekli tüm çözeltiler hazırlandıktan sonra iskeleler % 99,9'luk etanolde yarım saat bekletilmiştir. Daha sonra iskeleler üzerindeki alkol atılıp yerine hazırlanan çapraz bağlama çözeltisinden 1'er ml ilave edilip oda sıcaklığında hafif çalkalanarak 7 saat boyunca inkübe edilmiştir. 7 saat sonunda iskeleler çapraz bağlayıcıdan arındırmak amacıyla ultra saf suda oda sıcaklığında 24 saat boyunca yıkanmıştır. Yıkanan iskeleler tekrar dondurulduktan sonra liyofilize edilmiştir. Çapraz bağlanan ve bağlanmayan iskelelerin yüksekliği 4 mm ve çapı ise 10 mm olarak ölçülmüştür (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Doku mühendisliği iskeleleri

3.2.6. İskelelerin Fizikokimyasal Analizi

Üretilen biyoiskelelerin fizikokimyasal karakterizasyonu için FTIR (Shimadzu IRAffinity-1, Japan) ve termal analizler (Shimadzu DTA60, Japan) yapılmıştır. FTIR analizi için 600-4000 cm^{-1} aralığında taramalar yapılarak spektrumlar elde edilmiştir. TGA analizi inert azot gazı altında 10°C/1 dk. hızla 600 °C'a kadar ısıtılarak yapılmıştır. Böylelikle iskelelere ait bozunma eğrilerini gösteren termogramlar elde edilmiştir.

3.2.7. İskelelerin Gözenekliliğinin Belirlenmesi

İskelelerin gözenekliliği sıvı yer değiştirme metoduna (Erten ve ark., 2016) göre belirlenmiştir. Bu metoda göre öncelikle bir mezür içine belli bir hacimde (V1) hekzan

çözeltisi koyulmuştur. Daha sonra kuru formdaki çapraz bağlı iskele bu sıvının içine yerleştirilip oda sıcaklığında 5 dk. bekletilmiştir ve toplam hacim V2 olarak kaydedilmiştir. Hekzan emdirilmiş iskele alındıktan sonra mezürde kalan sıvının hacmi ise V3 olarak kaydedilmiştir. İskele gözenekliliğinin yüzdesi denklem 3.5 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ gözeneklilik} = (V1-V3)/(V2-V3) \times 100 \quad (3.5)$$

3.2.8. Kök Hücrelerin Kültüre Edilmesi ve Farklılaşma Testlerinin Yapılması

iAMKH'ler -196°C'ta dondurulmuş halde hücre kültürü laboratuvarına aracı firma tarafından transfer edilmiştir. İçerisinde 1×10^6 hücre içeren 1 adet vial 37°C'a ayarlanmış su banyosu içerisine alınmış ve küçük bir buz kristali kalana kadar bekletilmiştir. Bu işlemi takiben vial kapağı %70'lik izopropil alkol ile silinmiş ve laminar akış sağlanan bir kabin içerisine alınmıştır. Önceden hazırlanmış ve 37°C'a ısıtılmış ve içeriğinde rhFGF-b (5 ng/ml), Askorbik Asit (50 µg/ml), L-Glutamin (7,5 mM), hidrokortizon hemisüksinat (1.0 µg/ml), rh İnsülin (5 µg/ml) ve Fötal Sığır Serum (2%) bulunan kök hücre çoğaltma vasatı içerisine yavaşça (ozmotik basıncı dengelemek ve şok etkisini bertaraf etmek için) damlatılmıştır ve 300 g'de 2-3 dk. boyunca santrifüj edilerek kriyo-prezervatif olarak kullanılan dimetilsülfoksitin (DMSO) uzaklaştırılması sağlanmıştır. Çöktürülen hücre pelleti daha sonra 5000 hücre/cm² olacak şekilde T75 doku kültürü kaplarına ekilmiş ve % 5 CO₂, 37°C sıcaklık ve % 80-90 bağıl nem sağlayan bir inkübatöre alınmıştır. Besi yeri her 2-3 günde bir tazeleme ile değiştirilmiş ve hücreler invert faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmiştir. Yeterli bolluğa (% 80) ulaşan hücreler PBS (sodyum klorür içeren fosfat tamponu) (pH 7,4) içerisinde hazırlanmış % 0,25 Trypsin ve 0,53 mM EDTA çözeltisi (steril filtreden geçirildi) ile muamele edilerek doku kültürü plastiğine yapışan kök hücrelerin besiyeri yerine geçmesi sağlanmıştır (tripsinizasyon). Tripsinizasyon işlemi takiben hücreler pasajlanmıştır. Kök hücrelerin (P3-P5) *in vitro* çoklu-soy farklılaşma kapasitelerini belirlemek amacıyla adipojenik, osteojenik ve kondrojenik indüksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.1. Adipogenez

Yeterli bolluğa (% 60-80) ulaşmış kök hücreler tripsinizasyon işlemiyle kaldırılmış ve 6-kuyucuklu doku kültür kaplarına 1×10^4 hücre/cm² yoğunluğunda ekilerek inkübatöre alınmıştır. 24 saat sonra kök hücre çoğaltma vasatı, adipogenez vasatı ile değiştirilerek

indüksiyon yapılmıştır. İndüksiyon her 3-4 günde bir tekrarlanmıştır. İndüksiyonun 14. gününe gelindiğinde fiksasyon öncesinde hücreler invert faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmiştir. Histolojik değerlendirme amacıyla hücreler steril PBS ile birkaç tur yıkanmış ve % 4'lük paraformaldehit çözeltisi ile 30 dk. süreyle fikse edilmiştir. Daha sonra fiksatif atılmış ve tamamen ortamdan uzaklaşması için en az 3 kez saf su ile yıkanmıştır. Bu işlemi takiben hücreler 5 dk. süreyle oda koşullarında % 60'lık izopropil alkol ile yıkanmıştır. Süre sonunda hücrelerin tamamen kuruması için beklenmiş (oda koşullarında) ve üzerine tamamen doku kültürü plastiğini kaplayacak şekilde Oil Red O çalışma çözeltisi eklenmiştir. Boyama oda koşullarında 10 dk. süreyle yapılmıştır. Süre sonunda boya atılmış ve hücreler saf su ile defalarca yıkanmıştır (boya gelmeye kadar). İşlemler sonunda boyanan hücreler invert faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmiştir.

Boyama çözeltilerinin hazırlanışı:

- i. Oil Red O stok çözeltisi: 0,35 gram Oil Red O 100 ml izopropil alkol içerisinde çözülmüş ve 0,2 µm gözenek çapına sahip filtreden geçirilmiştir.
- ii. Oil Red O çalışma çözeltisi: 6 ml Oil Red O stok çözeltisi 4 ml saf su ile karıştırılarak filtreden geçirilmiş ve oda koşullarında 20 dk. süreyle dinlenmeye bırakılmıştır.

3.2.8.2. Osteogenez

Yeterli bolluğa (% 60-80) ulaşmış kök hücreler tripsinizasyon işlemiyle kaldırılmış ve 6-kuyucuklu doku kültür kaplarına 5×10^3 hücre/cm² yoğunluğunda ekilerek inkübatöre alınmıştır. 24 saat sonra kök hücre çoğaltma vasatı, osteogenez indüksiyon vasatı ile değiştirilmiştir. İndüksiyon her 3-4 günde bir tekrarlanmıştır. İndüksiyonun 21. gününe gelindiğinde fiksasyon öncesinde hücreler invert faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmiştir. Histolojik değerlendirme amacıyla hücreler steril PBS ile birkaç tur yıkanmış ve % 4'lük paraformaldehit çözeltisi ile 30 dk. süreyle fikse edilmiştir. Daha sonra fiksatif atılmış ve tamamen ortamdan uzaklaşması için en az 3 kez saf su ile yıkanmıştır. Bu işlemin ardından hücreler saf su içerisinde hazırlanmış % 2'lik Alizarin Red S ile 30 dk. süreyle oda koşullarında boyanmıştır. Süre sonunda boya atılmış ve hücreler saf su ile defalarca yıkanmıştır (boya gelmeye kadar). İşlemler sonunda boyanan hücreler invert faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmiştir.

3.2.8.3. Kondrojeniz

Yeterli bolluğa (% 60-80) ulaşmış kök hücreler tripsinizasyon işlemiyle kaldırılmış ve 6-kuyucuklu doku kültür kaplarına 1.6×10^7 hücre/cm² yoğunluğunda ekilerek inkübatöre alınmıştır. 24 saat sonra kök hücre çoğaltma vasatı, kondrojeniz indüksiyon vasatı ile değiştirilmiştir. İndüksiyon her 2-3 günde bir tekrarlanmıştır. İndüksiyonun 28. gününe gelindiğinde fiksasyon sonrasında kondrojenik pellet makroskopik olarak görüntülenmiştir. Histolojik değerlendirme amacıyla doku kültürü plastiğinde oluşan kondrojenik pellet steril PBS ile birkaç tur yıkanmış ve % 4'lük paraformaldehit çözeltisi ile 24 saat süreyle fikse edilmiştir. Daha sonra fiksatif atılmış ve saf su ile defalarca yıkanmıştır. Bu işleminin ardından pellet etil alkohol serilerinden (% 50, % 70, % 80, % 95, % 100) geçirilerek dehidrate edilmiş ve parafine gömme yapılmıştır. Mikrotom ile alınan kesitler daha sonra ksilen ile deparafinize edilmiş ve tekrar hidrate edilmiştir. Hidrate edilmiş slaytlar hem Safranin O hem de Alcian Blue 8gx ile boyanmıştır. Safranin O boyamasında, hidrate edilmiş slaytlar saf su içerisinde hazırlanmış %1'lik Safranin O çözeltisi ile 30 dk. süreyle oda koşullarında bekletilmiştir. Süre sonunda boya atılmış ve hücreler saf su ile defalarca yıkanmıştır (boya gelmeye kadar). İşlemler sonunda boyanan hücreler ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir. Alcian Blue 8gx boyamasında ise hidrate edilmiş slaytlar % 3'lük asetik asit çözeltisi ile 3 dk. süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra % 1'lik Alcian Blue 8gx çözeltisi (% 3'lük (w/v) asetik asit içerisinde hazırlanmış, pH 2,5) ile 30 dk. süreyle oda koşullarında boyama gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda boya atılmış ve hücreler saf su ile defalarca yıkanmıştır (boya gelmeye kadar). İşlemler sonunda boyanan hücreler ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir.

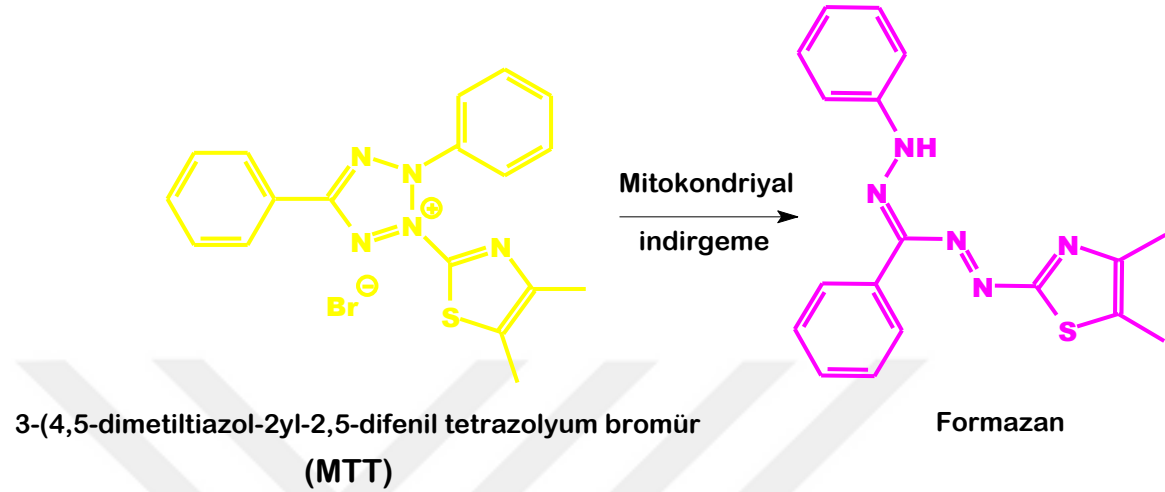
3.2.9. Keratin ve Keratin-Kollajen DMİ'ler Üzerine Hücre Ekilmesi

İskeleler laminar akışlı kabinde UV ışık (254 nm) altında 2 saat boyunca steril edilerek 48 kuyucuklu doku kültür kaplarına alınmıştır. Pasaj 6'ya kadar çoğaltılmış hücreler 150,000 hücre/iskele yoğunluğunda ekilmiştir. İskeleler üzerine kök hücre çoğaltma vasatı ilave edilmiş ve inkübatöre (% 5 CO₂, % 95 hava ve % 90 bağıl nem içeren 37 °C sıcaklığa ayarlı) konulmuştur. Kullanılmış vasat 2-3 günde bir tazesiyle değiştirilerek inkübasyona 14 gün boyunca devam edilmiştir.

3.2.10. İskele Üzerine Ekilen Hücrelerin Canlılık Düzeylerinin Belirlenmesi

Hücre canlılığı ve çoğalma düzeylerini belirlemek için MTT testi kullanılmıştır. Bu yöntem metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı kolorimetrik bir yöntemdir. Proliferasyona

uğrayan hücrelerin artan dehidrogenaz enzim aktivitesi ile sarı renkli tetrazolyumu kullanarak mor renkli formazan kristallerini üretmesi sonucu görülen renk değişiminin spektrofotometrik olarak 570 nm dalga boyunda absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. MTT reaksiyonu

MTT testi için öncelikle iskele üzerindeki vasat tamamen atılıp serumdan arındırmak amacıyla bir kez steril PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra iskeleler başka bir steril 48 kuyucuklu kültür kabına alınarak her bir iskele üzerine 270 µl serumsuz vasat ve 30 µl MTT reaktifi içeren çözelti ilave edilmiştir. Daha sonra kültür kabı %5 CO₂, % 95 hava ve % 90 bağıl nem içeren 37 °C sıcaklığa ayarlı inkübatöre yerleştirilerek yaklaşık 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda iskele üzerindeki çözelti tamamen atılmıştır. Her bir iskele üzerine test kiti içinde bulunan MTT solventten (0,1 M HCl içinde hazırlanan susuz izopropanol) 300 µl ilave edilmiştir. Elde edilen mor renkli çözeltinin 570 nm’de absorbansı ölçülmüştür. Bu işlemler kültürün 3, 7 ve 14. gününde tekrarlanmıştır.

3.2.11. Taramalı Elektron Mikroskop Analizi

Gözenekli DMİ’lerin mikromimarisi ve hücrel davranışı alan emüsyon taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM JFM 7100F EDS, JEOL, Japan) ile incelenmiştir. Hücreli iskelelerin mikroskobik görüntülenmesi için öncelikle kültür ortamındaki vasat tamamen atılmıştır ve iskeleler bir tur PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra iskeleler PBS içinde hazırlanan % 2,5 glutaraldehit ile en az bir gece fikse edilmiştir. Fiksasyonu uzaklaştırmak için iskeleler ultra saf su ile yıkanmış, % 50, % 70, % 80, % 90, % 95 ve % 100’lük etanol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Hücreli ve çapraz bağlı hücresiz iskeleler 60 saniye süreyle Au-Pd ile kaplanmıştır. İletken örneklerin görüntüleri 10 kV’de farklı büyütmelelerde ve yüksek vakum altında alınmıştır.

3.2.12. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Orijin Pro 8SR0 (v.0724, OriginLab Corporation, MA, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. Bütün değişkenlerin $\pm$ standart hatalarını belirlemek için Microsoft Office Professional Plus 2016 Excel programı kullanılmıştır. İstatistiksel farklılıklar ANOVA (one-way analysis of variance) ve Tukey’s test ile belirlenmiştir. $p \leq 0,05$ durumunda farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edilmiştir.



BÖLÜM 4

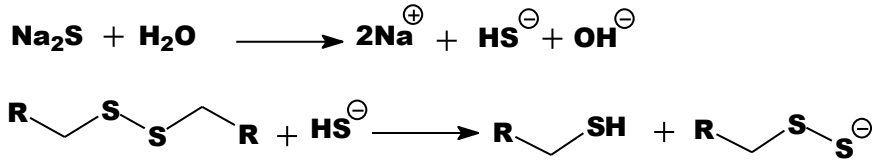
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. İnsan Saçından Keratinin Ekstraksiyon Metodunun Optimizasyon Çalışmaları

Son on yıldır saç, boynuz, tüy ve yün gibi kaynaklardan keratin ekstraksiyonu için birçok farklı metot uygulanmaktadır. Son zamanlarda ise insan saçından keratin ekstraksiyonu için modifiye edilmiş metotlar sıklıkla kullanılmaktadır. Saçta bulunan sert keratinler, yapısında bulunan sistin, yüksek miktarda disülfid bağları ve hidrofobik amino asitler nedeniyle çözünmez moleküllerdir. Dolayısıyla saç keratinini ekstrakte etmek ve çözülebilir hale getirmek için sert koşullar gerekmektedir. Ayrıca elde edilen keratin moleküllerinin stabilizasyonu için modifiye edilmeleri de söz konusudur. Şekil 3.1’de gösterildiği gibi keratin ekstraksiyonu yıkama ve dezenfeksiyon, delipidizasyon, ekstraksiyon, saflaştırma basamağı (süzme, santrifüj ve diyaliz) ve liyofilizasyon gibi temel işlemler içermektedir. Çeşitli kimyasallar, enzimler, yüksek basınç gerektiren fizikokimyasal yöntemler, sıcaklık gibi etmenler veya bunların farklı kombinasyonları literatürde var olan bazı etkili ekstraksiyon yöntemleridir (de Guzman ve ark., 2013; Xu ve ark., 2013; K. Wang ve ark., 2016). Bu işlemler için temel olarak yükseltgeme veya indirgeme reaksiyonları kullanılmaktadır. Ancak yenilenebilir bir kaynak olarak çeşitli amaçlar için kullanılabilen keratin ekstraksiyonu için geliştirilen yöntemlerin pahalı ve toksik olmaları nedeniyle bilim insanları, çevre dostu ve ucuz olan yeni yöntemler araştırmışlardır. Bu bağlamda gerçekleştirilen tez çalışmasında keratin ekstraksiyonu için indirgen yöntemler üzerinde durulmuş ve ekstraksiyon metodunun optimizasyon çalışmaları için Çizelge 3.1’de belirtilen dört ayrı yöntem denenmiştir. Ekstraksiyon işlemi belirtilen miktarlarda ve sıcaklıklarda Na_2S ve Na_2SO_3 ’ün tek başlarına kullanıldığı çözeltilerde 1 - 48 saat sürelerde denenmiştir. Fakat ekstraksiyon için etkili olmadıkları görülmüş ve tez kapsamına dahil edilmemiştir. 1. ve 2. yöntemlerde kullanılan NaOH ’in ekstraksiyona etkisini belirlemek için aynı oranda NaOH ’in tek başına kullanıldığı 3. yöntem de ayrıca denenmiş ve ekstraksiyon verimleri karşılaştırılmıştır.

Yöntem 1 Wrześniewska-Tosik ve Adamiec (2007) yaptıkları çalışmada kullandıkları yöntem modifiye edilerek saç keratini ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Yöntemde kullanılan Na_2S ’ün sudaki çözünürlüğü neticesinde hidrosülfür ve hidroksit iyonları oluşmaktadır. Bu iyonlar disülfid bağlarının kırılmasını sağlamaktadır. NaOH ilavesiyle birlikte oluşan hidroksit iyonları ile bu etki daha da artmaktadır. Yüksek alkali

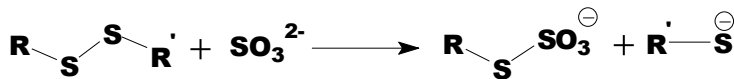
ortam ile hidrojen bağları parçalanmakta ve protein fraksiyonlara ayrılmaktadır (Şekil 4.1) (Poole ve ark., 2011).



Şekil 4.1. Yöntem 1’de keratin ekstraksiyon reaksiyonu

İlaveten yüksek pH nedeniyle (pH 12-14) peptit zincirleri kırılarak çeşitli amino asitler de zarar görebilmektedir. Bu durum ise 40 kDa’nın altındaki fraksiyonların kaybolmasına sebebiyet verebilmektedir. Ayrıca reaksiyon sonucunda oluşan yüksek derecede reaktif olan sülfidril grupları diyaliz sırasında tekrar okside olup (disülfid bağlarının tekrar oluşumu) keratin fraksiyonlarının balçık şeklinde çökmesine neden olmaktadır. Suda çözünmeyen bu protein parçacıkları daha sonra santrifüjle uzaklaştırılmıştır. Ekstraksiyon veriminde azalma meydana gelmesi nedeniyle, kullanılan bu yöntemle elde edilen keratin ekstrakttaki sülfidril gruplarının diyalizden önce modifiye edilmesi (karboksimetilasyon vb. işlemlerle) gerekmektedir (Lee ve ark., 2014).

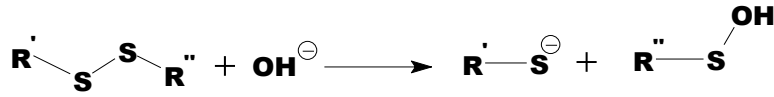
Yöntem 2 Na_2SO_3 ve NaOH ‘ın birlikte kullanımını içermektedir. Na_2SO_3 keratinde bulunan disülfid bağını parçalayabilmekte ve keratinin çözünmesini hızlandırmaktadır. Şekil 4.2’ye göre gerçekleşen reaksiyon sonucu disülfid bağı açılmakta ve S-sülfonatlar ($\text{S}-\text{SO}_3^-$) oluşmaktadır.



Şekil 4.2. Na_2SO_3 ’in disülfid bağını kırması

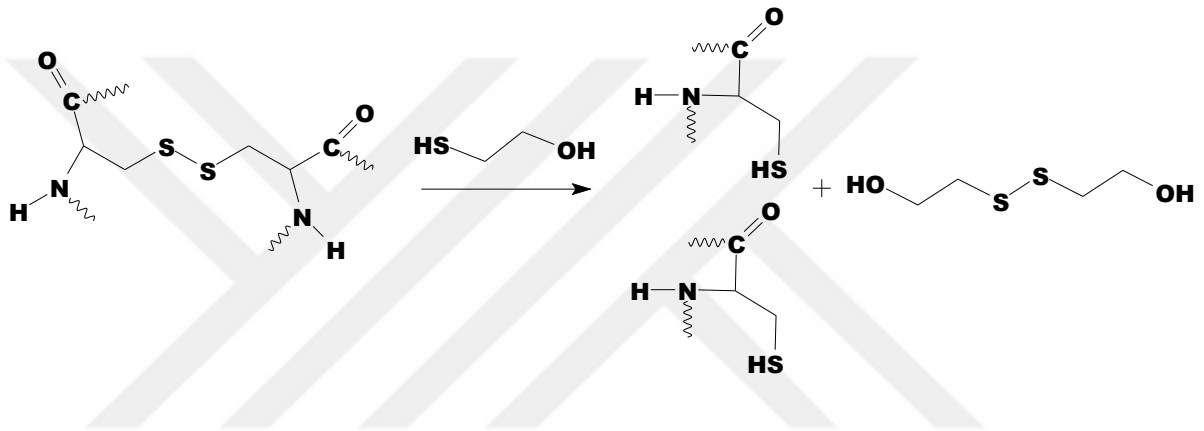
Ancak zayıf alkali bir tuz olması sebebiyle önerilen ekstraksiyon şartlarında tek başına yeterli olmadığı görülmüştür. Dolayısıyla ekstraksiyon verimini arttırmak amacıyla ortama NaOH ilave edilmiştir. Oluşan hidroksit iyonları keratinde bulunan hidrojen bağları gibi güçlü molekül içi bağları yıkarak ekstraksiyonu hızlandırmıştır (Ji ve ark., 2014).

Yöntem 3’de NaOH’ın sulu çözeltisi (pH 12-14) kullanılarak belirtilen şartlarda keratin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen alkali reaksiyonda hidroksit iyonları disülfid bağıyla reaksiyona girmiş ve yapıdan tiyolat ($\text{R}'-\text{S}^-$) ayrılarak sülfenik asit ($\text{R}''-\text{SOH}$) açığa çıkmıştır (Şekil 4.3) (Hogg, 2003).



Şekil 4.3. Alkali hidroliz reaksiyonu

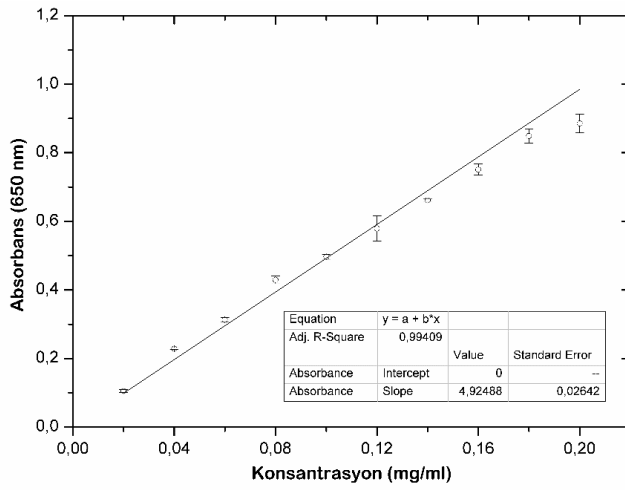
4. yöntemde kullanılan ekstraksiyon çözeltisi Tanabe ve ark. (2004) ve saflaştırma basamakları ise Reichl ve ark. (2011) yaptıkları çalışmalar esas alınarak yapılmıştır. Bu yöntemde kullanılan 2-merkapttoetanol, üre ve SDS içeren ekstraksiyon çözeltisi (pH 7,5-8) ile yapıdaki disülfid ve hidrojen bağları kırılıp tiyolat anyon oluşumu reaksiyonuyla keratini çözülebilir forma getirilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. 2-merkapttoetanol gerçekleşen ile ekstraksiyon reaksiyonu

Literatürde 2-merkapttoetanolla yapılan ekstraksiyon metodu sıklıkla kullanılmaktadır. 2-merkapttoetanol içeren ekstraksiyon çözeltisine SDS ilave edilen (Tanabe ve ark., 2004) ve edilmeyen (Reichl ve ark., 2011) yöntemlerle yapılan ekstraksiyon işlemi neticesinde elde edilen verimler sırasıyla yaklaşık % 72 ve % 60-65'dir. Hızları ise sırasıyla 16 saat ve 72 saattir. Araştırmacılar SDS ilavesinin ekstraksiyon verimi ve hızını arttırdığını vurgulamışlardır. Ayrıca ekstraksiyon sırasında oluşan keratin-SDS kompleksleri ile sülfidril gruplarının diyaliz sırasında tekrar okside olması engellenmiştir (Poole ve ark., 2011).

1. yöntem dışında uygulanan diğer tüm yöntemlerin diyaliz aşaması sırasında çok az bir protein çökmesi görüşmüştür. Diyalizattaki protein içeriği Şekil 4.5'teki kalibrasyon grafiği kullanılarak bulunmuştur.



Şekil 4.5. Lowry metodu ile elde edilen BSA standart kalibrasyon grafiği

İlaveten Lowry yöntemine göre belirlenen diyalizattaki protein konsantrasyonları ve (%) verimler çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Lowry yöntemine göre belirlenen protein konsantrasyonları ve (%) verim

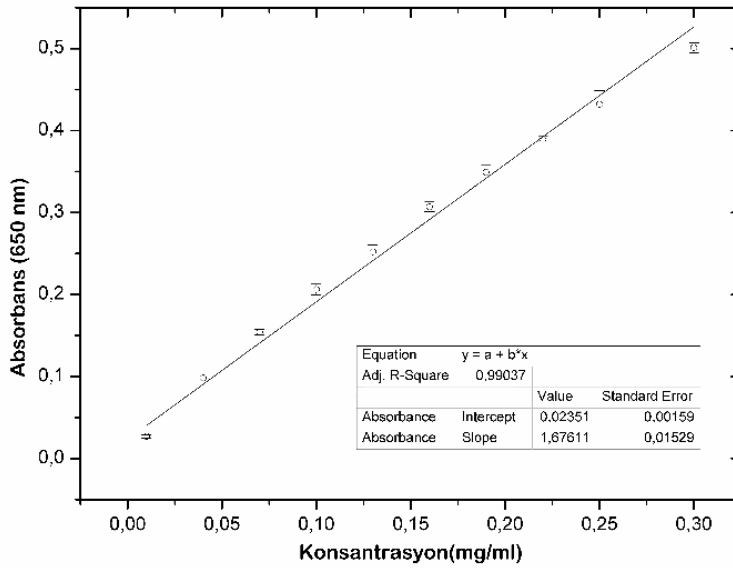
	Diyalizat konsantrasyonu (mg/ml)(n=3)	Verim (%) (n=3) (Lowry)	Verim (%) (kuru ağırlık)
1. yöntem	7,45 ± 0,06	23,84 ± 0,19	23,4
2. yöntem	8,12 ± 0,09	27,72 ± 0,46	27,6
3. yöntem	4,70 ± 0,08	18,81 ± 0,33	20
4. yöntem	9,61 ± 0,1	29,78 ± 0,32	29,74

Yapılan ANOVA testi sonucunda her 4 yöntemle elde edilen keratin ekstraktların miktarları istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Çizelge 4.1 incelendiğinde en yüksek verimin 4. yöntemde ve en düşük verimin 3. yöntemde olduğu görülmektedir. Ayrıca 1. ve 4. yöntemlerle yapılan ekstraksiyon verimlerinin literatür çalışmalarına göre (sırasıyla yaklaşık % 40-52 (Wrześniewska-Tosik ve Adamiec, 2007) ve % 60-65 (Tanabe ve ark., 2004)) daha düşük olduğu görülmektedir. Bunun sebebi kullandığımız diyaliz membranının moleküler cut off (MWCO) değerinin 14000 Da olmasıdır. Ancak, tüm ekstraksiyon (çözücü sistemi ve ekstraksiyon süreleri hariç) ve saflaştırma basamakları her yöntem için aynı olduğu göz önünde bulundurulursa, özellikle önerilen 2. yöntemin ekstraksiyon veriminin literatürde en çok kullanılan yöntemlerden biri olan 4. yönteme göre çok yakın bir değerde olduğu görülmektedir. İlaveten diyalizat konsantrasyonlarına ve kuru ağırlığa göre belirlenen % verimler kıyaslandığında

sonuçların yaklaşık aynı değerde olduğu ve bu nedenle her 4 yöntemle elde edilen proteinlerin saf oldukları düşünülmektedir. Bu bağlamda, süre, kullanılan kimyasalların ucuz ve toksik olmaması ve endüstriyel açıdan uygulanabilir nitelikte olması sebebiyle 2.yöntemin daha tercih edilebilir olacağı düşüncesindeyiz.

4.2. Denizanasından Kollajen İzolasyonu ve Atelokollajen Eldesi

Denizanasından kollajen izolasyonu Derkus ve ark. (2016) çalışmasına göre yapılmıştır. Protein içeriği ve ekstraksiyon verimi gibi sonuçlar bu çalışma ile benzerdir. Diyaliz sonrasında elde edilen diyalizattaki protein içeriği Şekil 4.6’da verilen kalibrasyon grafiğinden elde edilmiştir.



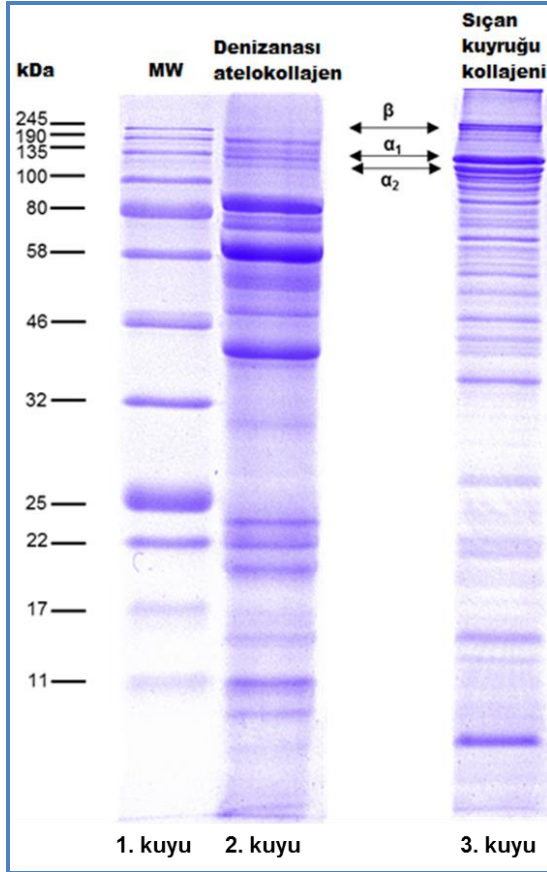
Şekil 4.6. Lowry metodu ile elde edilen sıçan kuyruğu tip I kollajenin standart kalibrasyon grafiği

Diyalizattaki protein içeriği $12,5 \pm 1,00$ mg/ml (n=3) olarak bulunmuştur. Kuru denizanası tabakalarının ağırlığına göre belirlenen izolasyon verimi % 62 ‘dir. Lowry sonucuna göre belirlenen % verim ise yaklaşık % 60 (n=3) olarak bulunmuştur.

4.3. Keratin ve Atelokollajenin Biyokimyasal Karakterizasyonu

Denizanası atelokollajeni ve sıçan kuyruğu tip I kollajeni için elde edilen SDS-PAGE analizi Derkus ve ark. (2016) yaptığı çalışmaya göre yapılmıştır ve elde edilen sonuçlar benzerdir. Her iki proteinin spesifik bantları, hazırlanan % 10’luk ayırma jeli ve % 4’lük yürütme jeli ile görüntülenmiştir (Şekil 4.7). Birinci kuyucuk kullanılan protein marker’ın molekül ağırlığını (MW) göstermektedir. Denizanası atelokollajeni (2. kuyu) ve sıçan

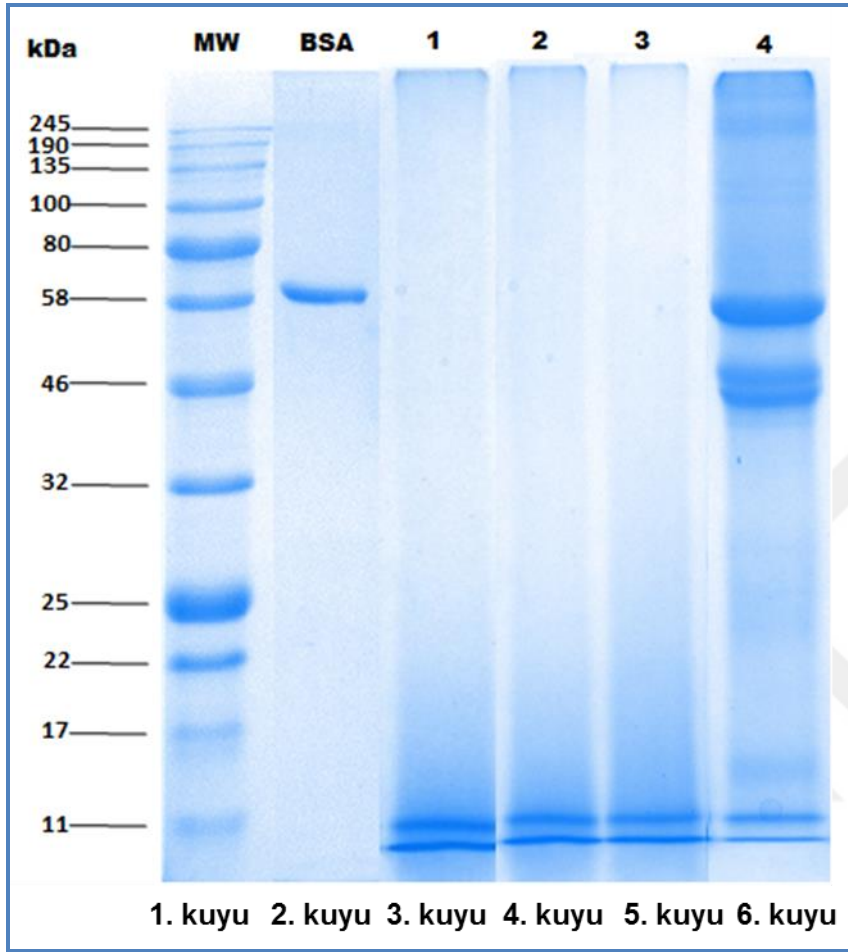
kuyruğu kollajeninde (3. kuyu) görülen 100-190 kDa'daki yoğun bantlar kollajen tip I'de bulunan $\alpha 1$ birimlerinin varlığının göstergesidir. Ayrıca, pepsin ile parçalanma sonucu elde edilen atelokollajen 65 kDa ve 90 kDa civarında iki yoğun bant göstermektedir. Jelde görüntülenen 40 kDa civarındaki bant ise yine tüm denizanası kollajen hidrolizatlarında yaygın olarak görülen bir banttır.



Şekil 4.7. Denizanası ve sıçan kuyruğu tip I kollajeninin SDS-PAGE analizi

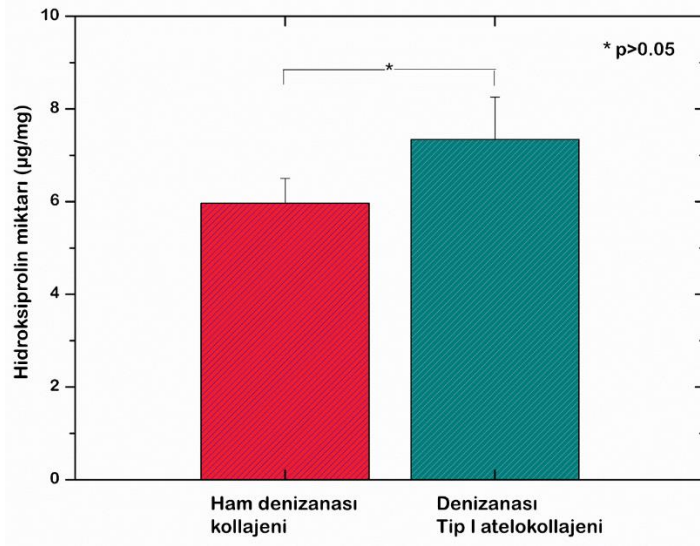
Her 4 yöntemle elde edilen keratin ekstrakt ve negatif kontrol olarak kullanılan BSA'ya ait spesifik bantlar hazırlanan % 12,5'luk ayırma jeli ve % 4'lük yükleme jeli ile görüntülenmiştir (Şekil 4.8). 4. yöntemle elde edilen keratin ekstraktın (6. kuyu) SDS-PAGE analizi sonucuna göre 40-60 kDa mikrofibril bandı, 10-20 kDa 'da matriks proteinleri bandı ve daha yüksek molekül ağırlığında minör komponentlerin oluşturduğu yüksek molekül ağırlığında (100-200 kDa) bir bant görülmektedir. Geniş bir bant olarak ortaya çıkan 40-60 kDa ağırlığındaki bant 45-50 kDa (asidik tip I α keratin) ve 55-60 kDa (nötral-bazik tip II α keratin) olmak üzere ikiye ayrılmıştır (Xu ve ark., 2013). 1, 2 ve 3. yöntemler ile alkali koşullarda (pH 12-14) elde edilen keratin ekstraktların (sırasıyla 3, 4 ve 5. kuyu) SDS-PAGE analizinde bahsi geçen bantlar görülmemekle birlikte keratinin çok

küçük fraksiyonlara ayrıldığı ve jelde sürüklenme meydana geldiği görülmektedir. 12-14 kDa arasındaki belirgin bantlar parçalanma sonucu elde edilen protein fraksiyonlarına aittir (Poole ve ark., 2011).



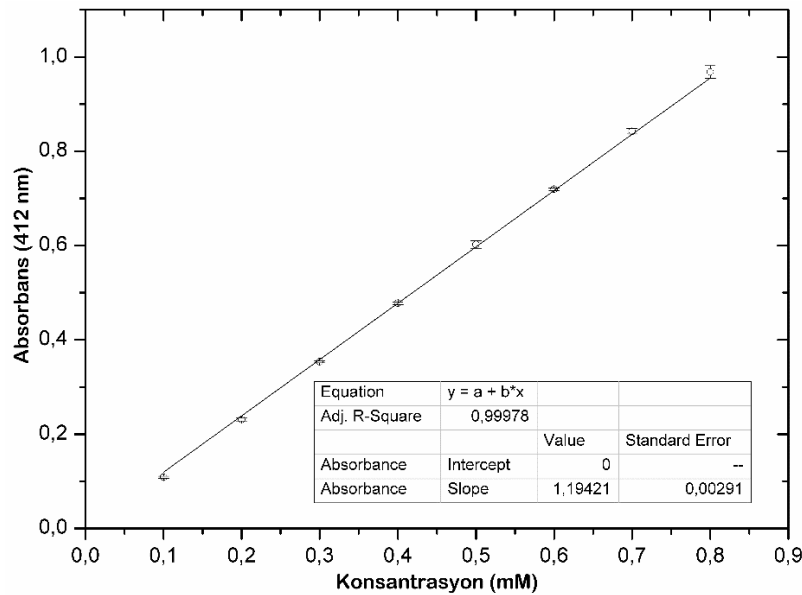
Şekil 4.8.Keratin ekstraktların ve BSA'nın SDS-PAGE analizi

Kollajen dokusunun yaklaşık % 10'unu oluşturan hidroksiprolin, kollajenin moleküler yapısını oluşturan α zincirin sağlamlığında kritik bir rol oynamaktadır. Denizanasındaki hidroksiprolinin miktarı memeli tip I fibriler kollajenine göre nispeten daha az olduğundan denizanası gibi omurgasız hayvanların α zincirleri genellikle daha zayıf olmaktadır (Swatschek ve ark., 2002; Song ve ark., 2006). Hidroksiprolin, kollajen molekülü için önemli bir belirteçtir. Dolayısıyla, izole edilen denizanası tip I atelokollajeni ile dehidrate edilmiş ve kurutulmuş ham denizanasındaki hidroksiprolin içeriği belirlenmiştir. Ham denizanası ve denizanası tip I atelokollajenin hidroksiprolin içeriği sırasıyla $5.97 \pm 0.53 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($n=3$) ve $7.34 \pm 0.91 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($n=3$), olarak bulunmuştur. Yapılan ANOVA testi sonucunda örneklerdeki hidroksiprolin miktarları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$) (Şekil 4.9).



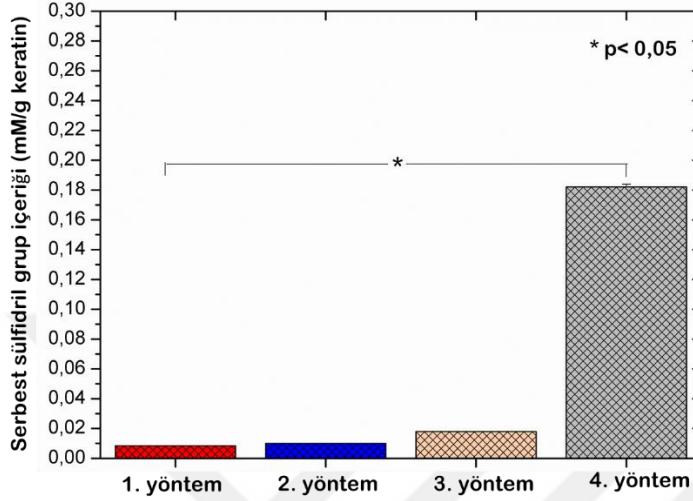
Şekil 4.9. Hidroksiprolin içerik analizi

Keratin karakteristik sistin köklerinden oluşmuştur. Sistin kalıntıları ise sistein amino asitlerinin oksidasyonu ile oluşurlar ve içerdikleri -S-S- çapraz bağları nedeniyle keratine mekaniksel, termal ve kimyasal dayanımlılık kazandırır. Yapısal fibröz bir protein olan keratin bu özelliğiyle diğer proteinlerden ayrılmaktadır. Dolayısıyla her 4 yöntemle ekstrakte edilen indirgenmiş keratinin sistein içeriği serbest sülfidril grupları şeklinde Ellman's metodu ile ölçülmüştür. Serbest sülfidril içeriği Şekil 4.10'daki L-sistein standart kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.10. L-sistein standart kalibrasyon grafiği

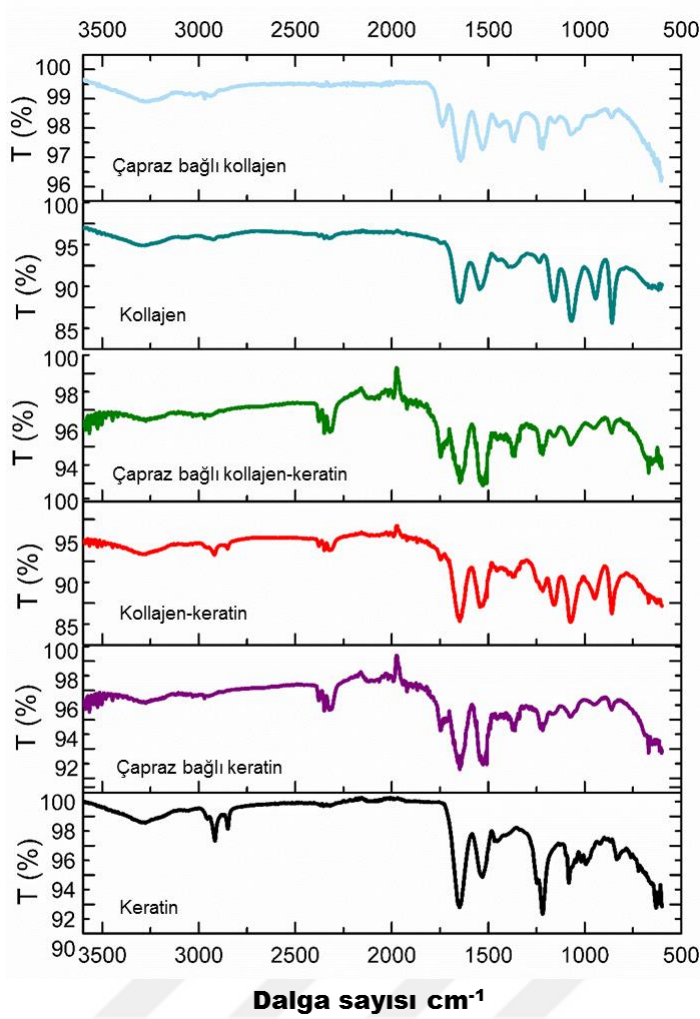
Tüm yöntemlerle elde edilen indirgenmiş keratindeki serbest sülfidril gup içerikleri Şekil 4.11 'de verilmiştir. Yapılan ANOVA testi sonucunda örneklerdeki serbest sülfidril miktarları istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p<0,05$). Ayrıca en fazla miktar 4. yöntem sonunda elde edilmiş olup (0,18 mM / g keratin) Silva ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışma ile benzerdir.



Şekil 4.11. Tüm yöntemlerle elde edilen indirgenmiş keratindeki serbest sülfidril gup içerikleri

4.4. İskelelerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere üretilen çapraz bağlı kollajen ve kollajen-keratin biyoiskelelerin kimyasal yapı karakterizasyonu için elde edilen FTIR spektrumlar Şekil 4.12'de verilmiştir. 2. yöntemle ekstrakte edilen indirgenmiş keratinin FTIR spektrumu incelendiğinde genellikle peptit bağlarından kaynaklanan primer amin, amit I, II ve III olmak üzere dört karakteristik absorpsiyon bandı görülmektedir. 3293 cm^{-1} ve 3401 cm^{-1} pikleri N-H bağlarının gerilme titreşimlerinden kaynaklanan primer amin gruplarına aittir. $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ piki keratindeki amid I titreşiminden (C=O) ileri gelmekle birlikte $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ piki ise β tabakalarda görülen N-H eğilme ve C-H gerilme titreşimlerinin yol açtığı amid II bandına aittir. $1220\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığı C-N ve N-H düzlem eğilmelerinden kaynaklanan amit III titreşimlerini ifade etmektedir. C-S bağından kaynaklanan zayıf 628 cm^{-1} piki ise keratin varlığını güçlü bir şekilde kanıtlamaktadır (Xu ve ark., 2013).



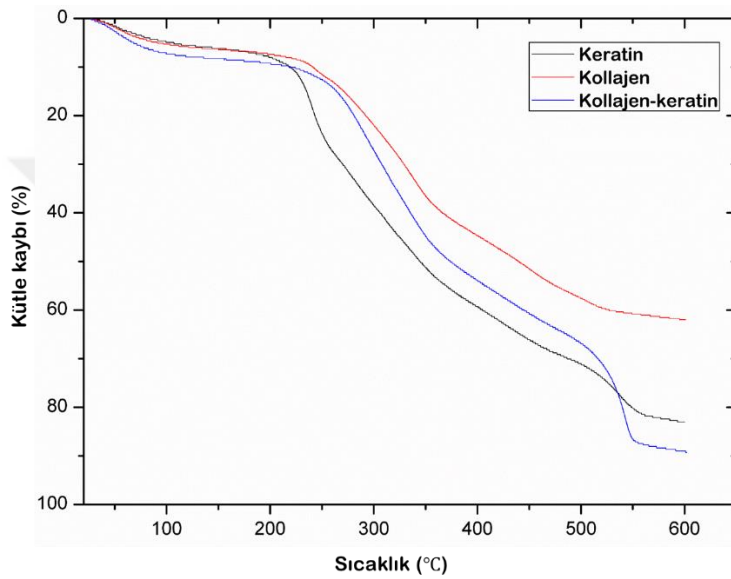
Şekil 4.12. Biyoiskelelerin FTIR spektrumları

Ayrıca, 1365 cm^{-1} 'de görülen yeni bir C-N bandı NHS/EDC ile yapılan çapraz bağlama işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğinin göstergesidir.

Denizanası atelokollajenin FT-IR spektrumu incelendiğinde, N-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanan amit A bandı $3400\text{--}3440\text{ cm}^{-1}$ görülmektedir. Polipeptit omurgasındaki karbonil gruplarının gerilme titreşimlerinden kaynaklanan $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ piki amit I bandını, $1550\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ piki amit II bandını ifade etmektedir. Heliksel yapının varlığını kanıtlayan amit III absorpsiyon bandı ise $1200\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında görülmektedir (Barzideh ve ark., 2014). Çapraz bağlı kollajen iskelenin spektrumu incelendiğinde, $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında görülen alkol ve karboksil piklerinin geçirgenliğinde düşüş gözlenmektedir. 1395 cm^{-1} piki ise çapraz bağdan kaynaklanan C-N bandına aittir.

Çapraz bağlı kollajen-keratin biyokompozit iskelenin spektrumu incelendiğinde ise karboksil veya alkol gruplarının geçirgenliğindeki (% T) düşüşün yine oluşan çapraz bağlardan kaynaklandığı görülmektedir.

Termal kararlılık ekstrem çevre koşullarında biyomalzemelerin uzun süre kullanılabilir olduğunu göstermek amacıyla önemlidir. Özellikle implante edilen rejeneratif malzemelerin vücut sıcaklığında belli bir süre bozunmaması gerekmektedir. Dolayısıyla üretilen iskelelerin termogravimetrik analizleri yapılarak bozunma eğrilerini gösteren termogramlar elde edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Biyoiskelelerin termogravimetrik analizi

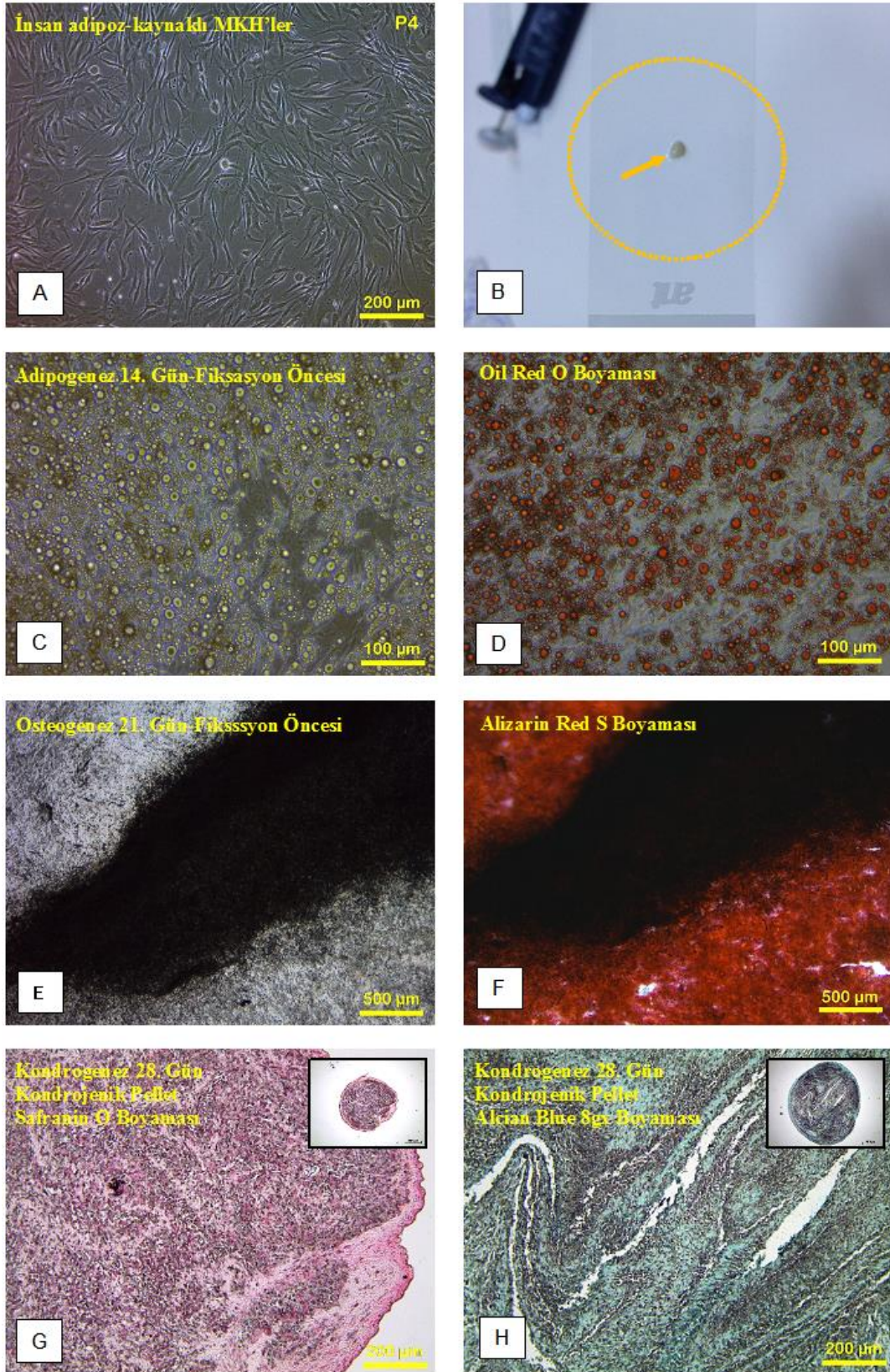
Tüm biyoiskelelerde (keratin, kollajen ve keratin-kollajen) 60-100 °C sıcaklık aralığında görülen kütle kaybı yapılarındaki suyun uzaklaştığı anlamına gelmektedir.

Keratinin termal bozunma sıcaklığı 250-400 °C olup, bu sıcaklık arasında kütlelerinin % 45-50'sini kaybetmektedir. İndirgenmiş saç keratininin endotermik piki yaklaşık 230-250 °C sıcaklıkları arasındadır ve çeşitli ayrışma reaksiyonları sonucu üst üste meydana gelen heliks denatürasyonlarından kaynaklandığı düşünülmektedir (K. Wang ve ark., 2016).

Denizanası atelokollajenin termal bozunma sıcaklığı ise 280-400 °C olup, bu sıcaklık arasında kütlelerinin yaklaşık % 30-35'ini kaybetmektedir. Keratin ve kollajenin 1:1 oranında karışımını içeren biyokompozit iskele ise 280-400 °C'ta kütlelerinin % 40-45'ini kaybetmektedir. Her üç iskelenin termal dayanımları yaklaşık olarak benzer olmakla birlikte keratinin termal dayanıma pozitif katkısının olmadığı görülmektedir.

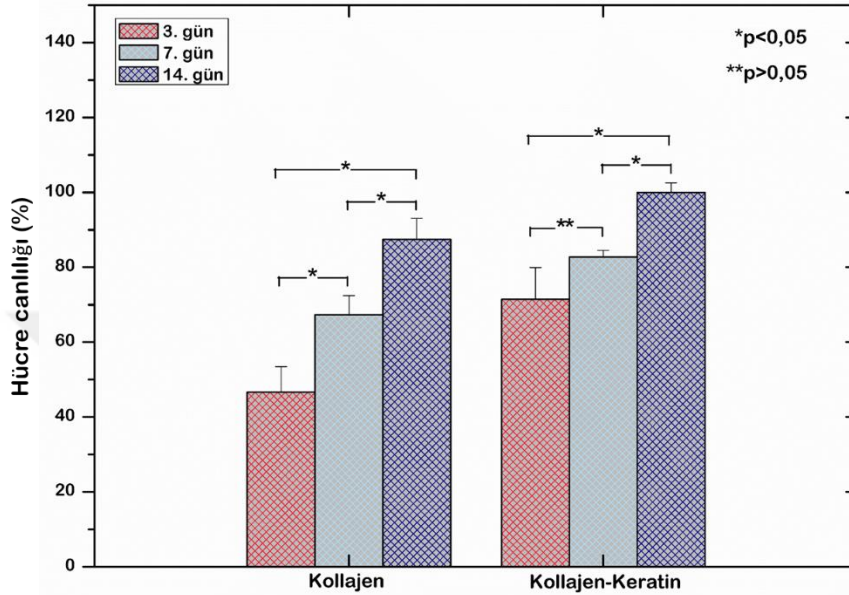
4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

Satın alınan iAMKH'ler özel vasatında pasaj 4'e kadar çoğaltılmıştır. T 75 hücre kültürü plastiğine tutunup fibroblastik morfoloji gösteren kök hücreler ile osteojenik, kondrojenik ve adipojenik soylara farklılaştırma çalışmaları yapılmıştır. Farklılaşma düzeyleri histokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Şekil 4.14 (A) incelendiğinde mezenkimal kök hücrelerin karakteristik iğsi-fibroblastik morfolojileri görülmektedir. Farklılaştırma çalışmalarında optimum indüksiyon koşullarına göre dizayn edilmiş kitler kullanılarak çalışmalar standardize edilmiştir. Kök hücrelerin adipojenik farklılaşması incelendiğinde 14. günün sonunda yağ damlacıklarının petrinin tüm yüzeyine dağılan hücreler tarafından üretildiği görülmektedir (Şekil 4.14 (C)). Ayrıca adipogenezis Oil Red O boyaması ile de karakterize edilmiş ve adiposit ve/veya pre-adiposit hücreleri tarafından üretilen yağ damlacıkları boyanmıştır (Şekil 4.14 (C)). Benzer şekilde osteojenik farklılaşma incelendiğinde 21. gün sonunda oluşan kalsiyum birikmesi görülmekte (Şekil 4.14 (E)) ve osteosit ve/veya osteoblast hücreleri tarafından biriktirilen kalsiyum ise Alizarin Red S ile boyanmaktadır (Şekil 4.14 (F)). Kondrojenik farklılaşma 28. günde tamamlanmış ve petri içerisinde kendiliğinden oluşan kondrojenik pelletten kesitler alınarak glikozaminoglikanlar sırasıyla Safranin O (Şekil 4.14 (G)) ve Alcian Blue 8gx (Şekil 4.14 (H)) ile boyanmıştır. Kondrojenik pellete ait makroskobik görüntü ise Şekil 4.14 (B)'de verilmiştir.



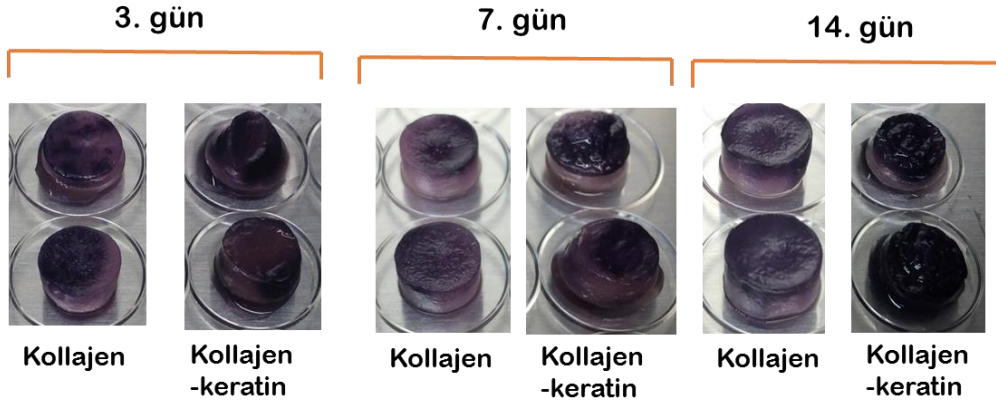
Şekil 4.14. Kök hücrelerin in vitro çoklu-soy farklılaşma kabiliyetlerinin belirlenmesi
Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (A), kondrojenik pellet (B), adipogenezis ve oil red O ile karakterizasyonu (C,D), osteogenezis ve alizarin red S ile karakterizasyonu (E,F), kondrogenezis; safranin O boyaması (G) ve alcian blue 8gx boyaması (H)

Çoklu soy farklılaşması çalışmasından sonra iAMKH'ler hazırlanan iskeleler üzerine ekilmiş ve 14 gün süreyle inkübe edilmiştir. İskeleler üzerindeki hücrelerin çoğalma ve canlılık düzeyleri 3, 7 ve 14. günler sonunda yapılan MTT testi ile belirlenmiştir. Şekil 4.15 'de verilen MTT testi grafiği incelendiğinde tüm biyoiskeleler üzerindeki canlılık düzeylerinin arttığı dolayısıyla herhangi bir sitotoksik etki görülmediği anlaşılmaktadır.



Şekil 4.15. Kollajen ve kollajen-keratin biyoiskeleler üzerinde iAMKH'lerin 3, 7 ve 14. günlerdeki çoğalma ve canlılık düzeyleri

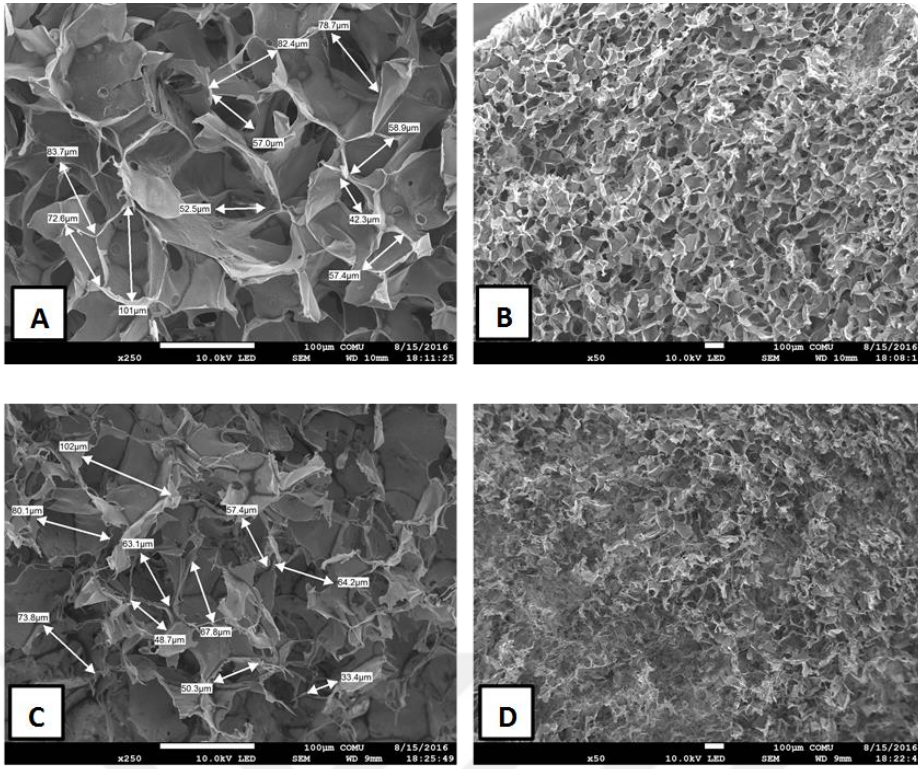
İlaveten grafik incelendiğinde hücrelerin kollajen-keratin biyoiskeleler üzerindeki (3, 7 ve 14. günlerdeki) proliferasyonunun, kollajen iskelelerdekine göre daha fazla olduğu görülmektedir. Keratinin hücre canlılığı üzerindeki pozitif katkısını makroskobik olarak da görüntülemek amacıyla MTT reaktif ile boyanmış iskelelerin fotoğrafları alınmıştır. Reaksiyon sonucunda keratin-kollajen iskelelerde oluşan formazan kristallerinin mor renginin şiddetinin günden güne daha çok arttığı açıkça görülmektedir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. MTT reaktifi ile muamele edilmiş biyoiskelelerin makroskobik görüntüsü

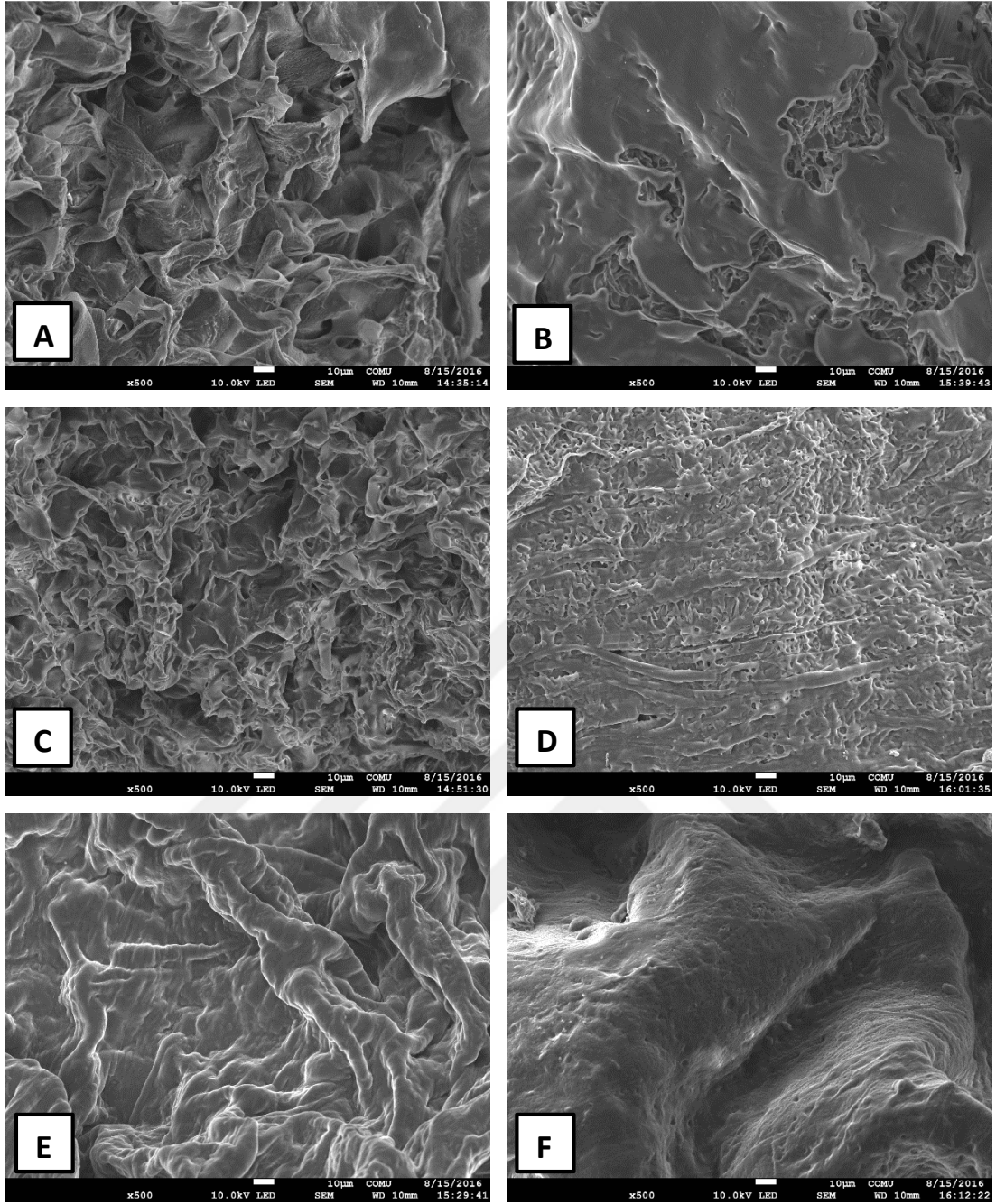
4.6. İskele ve Hücre-iskele Yapılarının Morfolojik Olarak Karakterizasyonu

Doku mühendisliği uygulamaları için üretilen biyoiskelelerin hücre adezyonu ve çoğalmasını tetikleyecek, besinlerin ve metabolik atık ürünlerinin difüzyonuna olanak sağlayacak nitelikte üç boyutlu gözenekli yapıda olmaları önemlidir. Bu nedenle dondurarak kurutma yöntemiyle üretilen DMİ'lerin gözeneklilik oranı ve çapları çeşitli büyütmelerde yapılan SEM analizleri ile belirlenmiştir. Şekil 4.17 incelendiğinde kollajen ve kollajen-keratin biyoiskelelerin üç boyutlu homojen ve gözenekliliği fazla yapılar olduğu görülmektedir. Biyoiskelelerin gözenek çapları x250 büyütmede 10 farklı bölgeden ölçüm alınarak (Şekil 4.17 A ve C) belirlenmiş olup kollajen ve kollajen-keratin için yaklaşık olarak $68,65 \pm 17 \mu\text{m}$ ve $64,08 \pm 17,93 \mu\text{m}$ 'dir. Ayrıca sıvı yerdeğiştirme yöntemi ile yapılan analiz sonucuna göre kollajen iskelelerin gözenekliliği $\% 89,93 \pm 0,83$ (n=3), kollajen-keratin iskelerin gözenekliliği ise $\% 95,14 \pm 0,30$ (n=3) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.17. DMİ'lerin gözenekliliğinin SEM ile belirlenmesi (A) çapraz bağlı kollajen DMİ (x250 büyütme), (B) çapraz bağlı kollajen DMİ (x50 büyütme), (C) çapraz bağlı kollajen-keratin DMİ (x250 büyütme), (D) çapraz bağlı kollajen-keratin DMİ (x50 büyütme)

Hücre adezyonunu ve proliferasyonunu destekleme potansiyellerini araştırmak amacıyla hücre ekilmiş iskelelerin 3, 7 ve 14. günlerde SEM mikrogramları alınmıştır (Şekil 4.18). 3. günde iAMKH'lerin kollajen ve kollajen-keratin iskele yüzeyleri boyunca yayıldığı, 7 ve 14. günde ise her iki iskele yüzeyinde hücre proliferasyonunun arttığı açıkça görülmektedir. Dolayısıyla üretilen tüm iskelelerin hücre büyümesi ve çoğalmasını destekleyen uygun bir HDM gibi davrandığı düşünülmektedir. Ayrıca, Şekil 4.18 (B-F) incelendiğinde kollajen-keratin iskelelerin üzerini kaplayan iAMKH'lerin 3, 7 ve 14. günlerdeki proliferasyon düzeyinin daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum MTT sonuçlarıyla da desteklenmiştir. Keratinde bulunan EDS ve LDV gibi hücre adezyonunu destekleyen peptin domainleri varlığı nedeniyle bu sonuçların elde edildiği düşünülmektedir. İlaveten literatürde keratinle modifiye edilmiş yüzeylerin kök hücre proliferasyonunu daha çok arttırdığı yönünde yapılan bazı çalışmalar mevcuttur.



Şekil 4.18. İskelelerin SEM mikrografileri (A) kollajen DMİ üzerine tutunmuş iAMKH'ler (3.gün), (B) 3. gün kollajen-keratin DMİ, (C) 7. gün kollajen DMİ, (D) 7. gün kollajen-keratin DMİ, (E) 14. gün kollajen DMİ, (F) 14.gün kollajen-keratin DMİ

BÖLÜM 5

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Doku mühendisliği hasar görmüş veya yapısal ya da işlevsel eksikliği olan dokuların onarılması amacıyla üç boyutlu biyomalzemeler, hücreler ve biyolojik moleküllerin bir arada kullanıldığı interdisipliner bir bilim dalıdır. Bu yaklaşım çerçevesinde kullanılan DMİ'lerin seçimi ve dizaynı önemlidir. Üretilen DMİ'lerin yapı, içerik ve uyarıcı etkiler bakımından HDM'yi taklit edebilecek nitelikte ve hücre adezyonunu, çoğalmasını ve farklılaşmasını arttırıcı özellikte olmaları arzu edilmektedir. DMİ'lerin üretimi için doğal (kollajen, kitosan, jelatin, vb.) ve sentetik olmak (PLA, PLLA, PLGA, vb.) üzere iki tip biyomalzeme kullanılmaktadır. Doğal ve sentetik polimer kullanımının bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Dezavantajları arasında biyobozunurluk, işlenme zorluğu, immünojenite gibi özellikler sayılabilmektedir. Araştırmacılar, bu sorunları çözmek için kompozit biyomalzeme kullanımını önermektedir. Bu bağlamda yapılan tez çalışmasında gözenekli kollajen ve kollajen-keratin biyokompozit DMİ'ler üretilmiş ve insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin DMİ'ler üzerinde *in vitro* koşullarda davranışı araştırılmıştır. Kollajen kaynağı olarak *Rhizostoma pulmo* türü denizanası kullanılmış ve tip I kollajen izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Son zamanlarda doğal kaynaklı biyomalzemeler olarak yeterli biyoyumluluk, hücresel etkileşim ve biyobozunurluk özellikleriyle dikkat çeken keratin ise insan saçından ekstrakte edilmiştir. Suda çözülebilir özellikte olan keratin fraksiyonlarının elde edilmesi için literatürde sıklıkla kullanılan üç ayrı yöntem uygulanıp karşılaştırmalar yapılarak yeni bir yöntem (2. yöntem) geliştirilmiştir. Tüm yöntemlerle elde edilen toz formda keratin ekstraktlar ve denizanası atelo kollajeni biyokimyasal (Lowry protein, serbest sülfidril grup, hidroksiprolin ve SDS-PAGE analizi) olarak karakterize edilmiştir. Ekstraksiyon verimleri karşılaştırıldığında 2. yöntemle elde edilen keratin ekstraktın veriminin literatürde sıklıkla kullanılan 4. yöntemle yakın bir değerde olduğu belirlenmiştir. Keratin ekstraktların SDS-PAGE analizine baktığımızda önerilen 2. yöntemin ve diğer yöntemlerin (1, 2 ve 3) alkali şartlarda (pH 12-14) ekstraksiyonu neticesinde proteinlerin 12-14 kDa ağırlığındaki polipeptitlere kadar parçalandığı, ancak 4. yöntemde keratin ekstraktların daha büyük moleküler ağırlıkta olduğu görülmüştür. 2. yöntemle elde edilen fraksiyonlar ile denizanası atelokollajeni % 3 (w/v) konsantrasyonunda çözülmüştür. Kollajen ve keratin çözeltileri 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak hazırlanan karışım özel kalıplara alınmış, dondurulmuş ve 24 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Elde edilen biyoiskeleler, mekaniksel dayanımlarını arttırmak

amacıyla çeşitli kimyasal ajanlarla çapraz bağlanmıştır. FTIR ve termogravimetri gibi fizikokimyasal analizler ile çapraz bağlamanın ve mekaniksel dayanımın etkinliği araştırılmıştır. Üretilen kollajen ve kollajen-keratin iskelelerin mekaniksel dayanımlarının *in vitro* çalışmalar için uygun sağlamlıkta olduğu görülmüştür. FT-IR spektrumlarında proteinlere ait karakteristik bağlar ve çapraz bağlama sonucunda yapıya katılan diğer bağlar görülmüştür. Bu durum da homojen kompozit iskelelerin üretildiğini ve çapraz bağlamanın etkin bir şekilde yapıldığını göstermektedir. Çapraz bağlama sonucunda elde edilen iskelelerin fizyolojik tampon ortamında dağılmadan dayanıklı halde kalması ve içerisine bir miktar tampon alarak şişmesi önemlidir. Bu durum da yeterli miktarda çapraz bağlama ve gözeneklilik ile sağlanmaktadır. Hazırlanan iskelelerin sıvı yer değiştirme yöntemi ile gözeneklilik (%) oranları belirlendiğinde kollajen-keratinin, kollajen iskelelere göre daha gözenekli olduğu saptanmıştır. Ayrıca iskelelerin mikromimarisini incelemek amacıyla yapılan SEM analizi sonucunda belirlenen gözenek çaplarının hücrelerin tutunması ve çoğalması için uygun olduğu görülmüştür.

Üretilen iskeleler üzerinde iAMKH'lerin *in vitro* proliferasyon kapasitesi belirlenmiştir. Bunun için öncelikle satın alınan kök hücreler standart kültür koşullarında pasaj 4'e kadar çoğaltılmıştır. Pasaj 4'teki iAMKH'lerin çoklu soy farklılaşma çalışması yapılmıştır. iAMKH'lerin kondrojenik, osteojenik ve adipojenik soylara farklılaştığı yapılan histokimyasal analizler ile belirlenmiştir. İskeleler sterilize edildikten sonra üzerlerine belli yoğunlukta iAMKH'ler ekilmiştir. İskeleler üzerindeki hücrelerin 3, 7 ve 14. günlerde canlılık ve proliferasyon düzeyleri yapılan MTT testi ile belirlenmiştir. Kültür boyunca kollajen ve kollajen-keratin iskeleler üzerindeki hücrelerin canlılık ve proliferasyon düzeyleri artmıştır. Dolayısıyla iskelelerin toksik etki göstermediği anlaşılmıştır. Özellikle kollajen-keratin iskelelerdeki hücre proliferasyonunun daha fazla olduğu, dolayısıyla keratin fraksiyonların hücre canlılığı üzerine pozitif katkı sağladığı görülmüştür. Hücre adezyonunu ve proliferasyonunu destekleme potansiyellerini araştırmak amacıyla hücre ekilmiş iskelelerin 3, 7 ve 14. günlerde SEM görüntüleri alınmıştır. SEM mikrografileri incelendiğinde, hücrelerin iskelenin üzerlerini ve porlarını kaplayacak şekilde günden güne çoğaldığı görülmektedir. MTT sonuçlarına benzer şekilde, kollajen-keratin biyokompozit iskelelerde hücre proliferasyonu daha fazladır. Bu durumda keratin fraksiyonlarda bulunan hücre adezyonunu destekleyen EDS ve LDV gibi peptin domainlerinin varlığı ile açıklanabilir. Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar neticesinde yenilenebilir biyomalzemelerden elde edilen biyoiskelelerin doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilecek potansiyel bir aday olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca

Çalışma kapsamında insan saçı ve denizanası gibi atıklar işlenerek rejeneratif tıp ürünleri gibi yararlı malzemeler elde edilmiştir. Jel, film, boncuk ve nano/mikro parçacık formlarına modifiye edilebilen keratin, toksik olmayan doğası ve eşsiz biyobozunurluk özellikleri nedeniyle yeşil kimya, gıda bilimleri, ilaç ve kozmetik sektörü gibi çok çeşitli uygulamalarda kullanılabilmektedir. Dolayısıyla araştırıcılar sa, tüy, yn gibi kaynaklardan keratin ekstraksiyonu için evre dostu ve düşük maliyetli yöntemler geliştirme çabasındadırlar. Bu bağlamda çalışma kapsamında insan saçından keratin ekstraksiyonu için önerilen 2. yöntemde kullanılan kimyasalların ucuz olması, toksik olmaması ve endüstriyel açıdan uygulanabilir nitelikte olması sebebiyle bu yöntemin tercih edilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, hastalık bulaşma riskinin düşük olması, ham materyallerin bolluğu ve diğer alternatif kaynaklara göre yüksek verimlerde ekstraksiyon gibi avantajları sebebiyle kollajen kaynağı olarak denizanası kullanılmıştır. Etkili bir izolasyon işlemi neticesinde elde edilen kollajen pepsin enzimiyle sindirilerek su ve tamponlarda çözülebilen atelokollajen hale getirilmiş ve immünojenite riski en aza indirilmiştir. Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabileceği düşünülen kollajen ve kollajen-keratin biyokompozit iskelelerin yapımında kullanılan keratin kaynağının hastalardan kolaylıkla alınabilen sa olması sebebiyle otogreft uygulamalarını sınırlayan verici doku kaynağı problemini kısmen de olsa ortadan kaldıracılabileceği öngörülmektedir. Araştırmanın sonucunda elde edilen keratin temelli biyoiskelelerin doku mühendisliği uygulamalarında yüksek bir potansiyele sahip olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akbari M., Tamayol A., Bagherifard S., Serex L., Mostafalu P., Faramarzi N., Mohammadi M. H. ve Khademhosseini A. 2016. Textile Technologies and Tissue Engineering: A Path Toward Organ Weaving. *Advanced Healthcare Materials*, 5(7), 751–766.
- Amrollahi P. ve Tayebi L. 2015. Bioreactors for Heart Valve Tissue Engineering: A Review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91, 847–856.
- Anitha A., Sowmya S., Kumar P. T. S., Deepthi S., Chennazhi K. P., Ehrlich H., Tsurkan M. ve Jayakumar R. 2014. Progress in Polymer Science Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 39, 1644–1667.
- Arslan Y. E. 2013. Adipoz Mezenkimal Kök Hücrelerin Damar Düz Kas Hücrelerine Farklılaştırılması ve Damar Doku Mühendisliğinde Kullanılması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Türkiye.
- Arslan Y. E., Hız M. M. ve Sezgin Arslan T. 2015. The Use of Decellularized Animal Tissues in Regenerative Therapies. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21(1), 139–145.
- Athanasίου K. A., Niederauer G. G. ve Agrawal C. M. 1996. Biocompatibility and Clinical Applications of Polylactic Acid / Polyglycolic Acid Copolymers. *Biomaterials*, 17(2), 93–102.
- Badylak S. F. 2004. Extracellular matrix as a scaffold for tissue engineering in veterinary medicine: Applications to soft tissue healing. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 3, 173–181.
- Baksh D., Song L. ve Tuan R. S. 2004. Adult mesenchymal stem cells : characterization , differentiation , and application in cell and gene therapy. *Stem cell reviews*, 8(3), 301–316.
- Balaji S., Kumar R., Sripriya R., Rao U., Mandal A., Kakkar P., Reddy P. N. ve Sehgal P. K. 2012. Characterization of keratin-collagen 3D scaffold for biomedical applications. *Polymers for Advanced Technologies*, 23(3), 500–507.
- Balogh P. ve Engelmann P. 2011. Transdifferentiation and regenerative medicine. *Transdiff and Reg Med*, 7–12.

- Barzideh Z., Latiff A. A., Gan C. Y., Benjakul S. ve Karim A. A. 2014. Isolation and characterisation of collagen from the ribbon jellyfish (*Chrysaora* sp.). *International Journal of Food Science and Technology*, 49(6), 1490–1499.
- Burnett L. R., Rahmany M. B., Richter J. R., Aboushwareb T. A., Eberli D., Ward C. L., Orlando G., Hantgan R. R. ve Van Dyke M. E. 2013. Hemostatic properties and the role of cell receptor recognition in human hair keratin protein hydrogels. *Biomaterials*, 34(11), 2632–2640.
- Buttafoco L., Kolkman N. G., Engbers-Buijtenhuijs P., Poot A. A., Dijkstra P. J., Vermes I. ve Feijen J. 2006. Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 27(5), 724–734.
- Can A. 2008. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turk J Hematol*, 25(2), 57–59.
- Chu C. C. ve Browning A. 1988. The study of thermal and gross morphologic properties of polyglycolic acid upon annealing and degradation treatments. *Journal of biomedical materials research*, 22(8), 699–712.
- Croisier F. ve Jérôme C. 2013. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780–792.
- de Guzman R. C., Saul J. M., Ellenburg M. D., Merrill M. R., Coan H. B., Smith T. L. ve Van Dyke M. E. 2013. Bone regeneration with BMP-2 delivered from keratose scaffolds. *Biomaterials*, 34(6), 1644–1656.
- De la Puente P. ve Ludeña D. 2014. Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Experimental Cell Research*, 322(1), 1–11.
- Derkus B., Arslan Y. E., Bayrac A. T., Kantarcioglu I., Emregul K. C. ve Emregul E. 2016. Development of a novel aptasensor using jellyfish collagen as matrix and thrombin detection in blood samples obtained from patients with various neurodisease. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 228, 725–736.
- Dhandayuthapani B., Yoshida Y., Maekawa T. ve Kumar D. S. 2011. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *International Journal of Polymer Science*, 2011(ii).
- Ding D. ., Shyu W. . ve Lin S. Z. 2011. Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Biology*, 20(8), 507–520.

- Erten E., Arslan Sezgin T., Derkus B. ve Arslan Y. E. 2016. Detergent-free decellularization of bovine costal cartilage for chondrogenic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells in vitro. *RSC Advances*, 6, 94236–94246.
- Fodor W. L. 2003. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: The potential to replace, repair and regenerate. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 102.
- Fortier L. A. 2005. Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery*, 34(5), 415–423.
- Fujii T. ve Li D. 2008. Preparation and properties of protein films and particles from chicken feather. *J. Biol. Macromol*, 8(2), 48–55.
- Gersbach C. A. 2011. Engineered Proteins for Controlling Gene Expression. *Principles of Regenerative Medicine* (Second Edi.). Elsevier Inc.
- Gil V. ve del Río J. A. 2012. Analysis of axonal growth and cell migration in 3D hydrogel cultures of embryonic mouse CNS tissue. *Nature Protocols*, 7(2), 268–280.
- Griffith L. G. 2002. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961, 83–95.
- Gunatillake P. A. 2003. Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering. *European Cells and Materials*, 5, 1–16.
- Ha T. L. B., Quan T. M., Vu D. N. ve Si D. M. 2013. Naturally Derived Biomaterials : Preparation and Application. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering içinde* (ss. 247–274).
- Hacker M. C. ve Mikos A. G. 2011. Synthetic Polymers. *Principles of Regenerative Medicine*. Elsevier Inc.
- Hackett C. H. ve Fortier L. A. 2011. Embryonic Stem Cells and iPS Cells: Sources and Characteristics. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 27(2), 233–242.
- Hogg P. J. 2003. Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(4), 210–214.
- Huang S. ve Fu X. 2010. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *Journal of Controlled Release*, 142(2), 149–159.

- Hui H., Tang Y., Hu M., Zhao X., Greater V. a, Health L. A., System C. ve Angeles L. 2011. Stem Cells : General Features and Characteristics. Stem Cells in Clinic and Research, 1–20.
- Ikada Y. 2006. Challenges in tissue engineering. Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society, 3(10), 589–601.
- Isakson M., de Blacam C., Whelan D., McArdle A., Clover A. J. P., Isakson M., de Blacam C., Whelan D., McArdle A. ve Clover A. J. P. 2015. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. Stem Cells International, 2015(May), 1–12.
- Ishaug S. L., Yaszemski M. J., Bizios R. ve Mikos A. G. 1994. Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers. Journal of Biomedical Materials Research, 28(12), 1445–1453.
- Ji Y., Chen J., Lv J., Li Z., Xing L. ve Ding S. 2014. Extraction of keratin with ionic liquids from poultry feather. Separation and Purification Technology, 132, 577–583.
- Jung S. ve Kleinheinz J. 2014. Adult Mesenchymal Stem Cells in Current Tissue Engineering Concepts. Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine içinde (ss. 103–118).
- Kakkar P., Madhan B. ve Shanmugam G. 2014. Extraction and characterization of keratin from bovine hoof: A potential material for biomedical applications. SpringerPlus, 3(1), 596.
- Kim B. S., Park I. K., Hoshiba T., Jiang H. L., Choi Y.-J., Akaike T. ve Cho C. S. 2011. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. Progress in Polymer Science, 36(2), 238–268.
- Kim I. Y., Seo S. J., Moon H. S., Yoo M. K., Park I. Y., Kim B. C. ve Cho C. S. 2008. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. Biotechnol. Adv., 26(1), 1–21.
- Koh C. J. 2004. Tissue Engineering, Stem Cells, and Cloning: Opportunities for Regenerative Medicine. Journal of the American Society of Nephrology, 15(5), 1113–1125.
- Kundu B., Rajkhowa R., Kundu S. C. ve Wang X. 2013. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. Advanced Drug Delivery Reviews, 65(4), 457–470.

- Laemmli U. K. (1970): 1970. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lee H., Noh K., Lee S. C., Kwon I. K., Han D. W., Lee I. S. ve Hwang Y. S. 2014. Human hair keratin and its-based biomaterials for biomedical applications. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(4), 255–265.
- Liu W. H., Song F. Q., Ren L. N., Guo W. Q., Wang T., Feng Y. X., Tang L. J. ve Li K. 2015. The multiple functional roles of mesenchymal stem cells in participating in treating liver diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(3), 511–520.
- Lorenti A., Biedermann T., Boettcher-Haberzeth S., Reichmann E., Gómez C. M. A., Soto G. J. M. ve Múnera L. M. R. 2012. Wound Healing : From Epidermis Culture to Tissue Engineering. *European Journal of Pediatric Surgery*, 23(5), 42–53.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. ve Randall R. J. 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Lutolf M. P. ve Hubbell J. a. 2005. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature biotechnology*, 23(1), 47–55.
- Ma P. X. 2004. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*, 7(5), 30–40.
- Mallick S. P., Pal K., Rastogi A. ve Srivastava P. 2016. Evaluation of poly(L-lactide) and chitosan composite scaffolds for cartilage tissue regeneration. *Designed Monomers and Polymers*, 19(3), 271–282.
- Mansouri N. ve Bagheri S. 2016. The influence of topography on tissue engineering perspective. *Materials Science and Engineering C*, 61, 906–921.
- O'Brien F. J. 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95.
- Oh S., Oh N., Appleford M. ve Ong J. L. 2006. No Title. *American Journal of Biochemistry and Biotechnologyjournal of Biochemistry and Biotechnology*, 2(2), 49–56.
- Okita K., Ichisaka T. ve Yamanaka S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448(7151), 313–317.

- Oreffo R. O. C., Cooper C., Mason C. ve Clements M. 2005. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem cell reviews*, 1(2), 169–178.
- Parenteau-Bareil R., Gauvin R. ve Berthod F. 2010. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*, 3(3), 1863–1887.
- Park M., Kim B. S., Shin H. K., Park S. J. ve Kim H. Y. 2013. Preparation and characterization of keratin-based biocomposite hydrogels prepared by electron beam irradiation. *Materials Science and Engineering C*, 33(8), 5051–5057.
- Pavia F. F. C., Rigogliuso S., Carrubba V. La, Mannella G. A., Gherzi G. ve Brucato V. 2012. Poly Lactic Acid Based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering. *Chemical Engineering Transactions*, 27, 409–414.
- Polak J. M. ve Bishop A. E. 2006. Stem cells and tissue engineering: Past, present, and future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068(1), 352–366.
- Poole A. J., Lyons R. E. ve Church J. S. 2011. Dissolving Feather Keratin Using Sodium Sulfide for Bio-Polymer Applications. *Journal of Polymers and the Environment*, 19(4), 995–1004.
- Rajan N., Habermehl J., Côté M.-F., Doillon C. J. ve Mantovani D. 2006. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nature protocols*, 1(6), 2753–2758.
- Reichl S., Borrelli M. ve Geerling G. 2011. Keratin films for ocular surface reconstruction. *Biomaterials*, 32(13), 3375–3386.
- Revati R., Majid M. S. A. ve Normahira M. 2015. Biodegradable Poly (Lactic Acid) Scaffold for Tissue Engineering : a Brief Review. *Chemical Engineering Transactions*, 1(1), 16–24.
- Ricapito N. G., Ghobril C., Zhang H., Grinstaff M. W. ve Putnam D. 2016. Synthetic Biomaterials from Metabolically Derived Synthons. *Chemical Reviews*.
- Saltz A. ve Kandam U. 2016. Mesenchymal stem cells and alginate microcarriers for craniofacial bone tissue engineering: A review. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 104(5), 1276–1284.
- Savioli Lopes M., Jardini A. L. ve Maciel Filho R. 2012. Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications. *Procedia Engineering*, 42, 1402–1413.

- Schrooyen P. M. M., Dijkstra P. J., Oberthü R. G., Bantjes A. ve Feijen J. 2000. Partially carboxymethylated feather keratins. 1. Properties in aqueous systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4326–4334.
- Seo S. ve Na K. 2011. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering for chondrogenesis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011(806681), 1–8.
- Silva R., Singh R., Sarker B., Papageorgiou D. G., Juhasz J. a., Roether J. A., Cicha I., Kaschta J., Schubert D. W., Chrissafis K., Detsch R. ve Boccaccini A. R. 2014. Hybrid hydrogels based on keratin and alginate for tissue engineering. *J. Mater. Chem. B*, 2(33), 5441–5451.
- Song E., Yeon Kim S., Chun T., Byun H. J. ve Lee Y. M. 2006. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials*, 27(15), 2951–2961.
- Swatschek D., Schatton W., Kellermann J., MullerMüller W. E. G. ve Kreuter J. 2002. Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 53(1), 107–113.
- Tanabe T., Okitsu N. ve Yamauchi K. 2004. Fabrication and characterization of chemically crosslinked keratin films. *Materials Science and Engineering C*, 24(3), 441–446.
- Thirupathi Kumara Raja S., Thiruselvi T., Sailakshmi G., Ganesh S. ve Gnanamani A. 2013. Rejoining of cut wounds by engineered gelatin-keratin glue. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(8), 4030–4039.
- Wang H. M., Chou Y. T., Wen Z. H., Wang Z. R., Chen C. H. ve Ho M. L. 2013. Novel Biodegradable Porous Scaffold Applied to Skin Regeneration. *PLoS ONE*, 8(6), 2–12.
- Wang K., Li R., Ma J. H., Jian Y. K. ve Che J. N. 2016. Extracting keratin from wool by using L-cysteine. *Green Chem.*, 18(2), 476–481.
- Wang S., Wang Z., Foo S. E. M., Tan N. S., Yuan Y., Lin W., Zhang Z. ve Ng K. W. 2015. Culturing fibroblasts in 3D human hair keratin hydrogels. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(9), 5187–5198.
- Wang Y., Zhang W., Yuan J. ve Shen J. 2016. Differences in cytocompatibility between collagen, gelatin and keratin. *Materials Science and Engineering C*, 59, 30–34.
- Weiss I. M. ve Kirchner H. O. K. 2011. Plasticity of two structural proteins: Alpha-

- collagen and beta-keratin. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(5), 733–743.
- Whelan D., Caplice N. M. ve Clover A. J. P. 2014. Fibrin as a delivery system in wound healing tissue engineering applications. *Journal of Controlled Release*, 196, 1–8.
- Wrześniewska-Tosik K. ve Adamiec J. 2007. Biocomposites with a content of keratin from chicken feathers. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 15(1), 106–112.
- Xu S., Sang L., Zhang Y., Wang X. ve Li X. 2013. Biological evaluation of human hair keratin scaffolds for skin wound repair and regeneration. *Materials Science and Engineering C*, 33(2), 648–655.
- Zhang J., Li Y., Li J., Zhao Z., Liu X., Li Z., Han Y., Hu J. ve Chen A. 2013. Isolation and characterization of biofunctional keratin particles extracted from wool wastes. *Powder Technology*, 246, 356–362.
- Zhao X., Lui Y. S., Choo C. K. C., Sow W. T., Huang C. L., Ng K. W., Tan L. P. ve Loo J. S. C. 2015. Calcium phosphate coated Keratin-PCL scaffolds for potential bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, 49, 746–753.
- Zoccola M., Aluigi A. ve Tonin C. 2009. Characterisation of keratin biomass from butchery and wool industry wastes. *Journal of Molecular Structure*, 938(1–3), 35–40.
- Tissue engineering, (n.d). Retrieved November 11, 2016, from https://en.wikipedia.org/wiki/Tissue_engineering
- Relationship of development to stem cell type, (2011). Retrieved November 15, 2016, from <http://cursoenarm.net/UPTODATE/contents/mobipreview.htm?25/10/25767>

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Tuğba SEZGİN ARSLAN

Doğum Yeri: Gümüşhane, Türkiye

Doğum Tarihi: 17.08.1987

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (2006-2010)

Ankara Üniversitesi, Kimya Bölümü, Çift ana dal (2008-2011)

Yüksek Lisans Öğrenimi: Ankara Üniversitesi, Kimya Bölümü, Organik Kimya
Anabilim Dalı (2011-2013)

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar –SCI-Diğer

Arslan, Y.E., Hız, M.M. and Sezgin Arslan, T., 2015. The Use of Decellularized Animal Tissues in Regenerative Therapies. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 21 (1) : 139-145.

Erten, E., Sezgin Arslan, T., Derkus, B. and Arslan, Y.E., 2016. Detergent-Free Decellularization of Bovine Costal Cartilage for Chondrogenic Differentiation of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells *in Vitro*. Royal Society Chemistry Advances, 6 : 94236–94246.

Sezgin Arslan, T. ve Arslan, Y.E., 2014. Tıp ve Kozmetik Sanayinde Kullanılan Keratin Proteini için Ekstraksiyon Yöntemlerinin Geliştirilmesi. Tescilli ulusal patent, TPE 2014 02104.

b) Bildiriler:

SEZGİN ARSLAN T., ARSLAN, Y.E. and UĞUR, A.L. 'Fabrication Of Human Hair Keratin / Collagen 3D-Scaffolds For Tissue Engineering Applications' ICFAS2016, 22-26 Ağustos, 2016, Poster Sunumu, İstanbul, Türkiye.

c) Projeler:

Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, Teknogirişim Sermayesi Desteği. 2013-2014. Tıp ve Kozmetik Alanında Kullanılan Keratin için Etkin Bir İzolasyon Yönteminin Geliştirilmesi. Proje kodu: 0111.TGSD.2013, proje yöneticisi.

TÜBİTAK, 3501-Kariyer. Kendi Kendini Temizleyen Yağ Itici Cam ve Seramik Yüzeylerin Sentezi. Proje kodu: 114M475, çalışma süresi: 01.10.2014-31.01.2015, bursiyer.

İLETİŞİM

e-posta Adresi : tsezgin16@gmail.com

