

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KORNEA DEFİKTLERİNİN TEDAVİSİ İÇİN HİDROJEL TEMELLİ
DOKU YAPIŞTIRICILARININ SENTEZİ**

AYŞEGÜL TANRİVERDİ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ AYÇA BAL ÖZTÜRK

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİMDALİ

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Fevziye Figen KAYMAZ

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Abdullah OLGUN

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Dr. Öğr. Üyesi Ayça BAL ÖZTÜRK
Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri (İlk isim jüri başkanına, ikinci isim danışmana aittir)

Prof. Dr. Fevziye Figen KAYMAZ İstinye Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ayça BAL ÖZTÜRK İstinye Üniversitesi

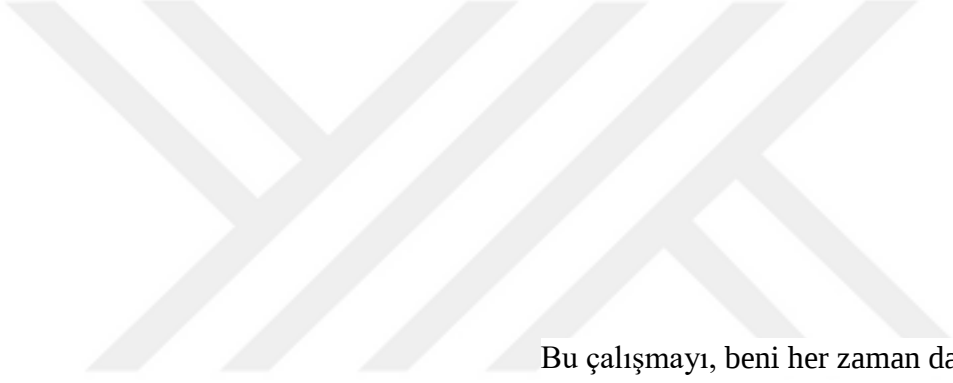
Dr. Öğr. Üyesi Emine ALARÇİN Marmara Üniversitesi

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum, “*Kornea Defektlerinin Tedavisi İçin Hidrojel Temelli Doku Yapıştırıcılarının Sentezi*” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ayşegül Tanrıverdi

İTHAF



Bu çalışmayı, beni her zaman daha iyi olmaya
ve kariyerimi başarılı bir şekilde
gerçekleştirmeye teşvik eden koşulsuz
destekleri için tüm aileme büyük bir sevgiyle
ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni her zaman yüreklendiren, hiçbir zaman bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, her zaman desteğini üzerimde hissettiğim tez dönemim boyunca da üstümden ilgisini ve emeğini hiç eksik etmeyen, benim için hoca öğrenci ilişkisini kırıp yeni bir boyuta getiren ve bilime her zaman teşvik eden, iş disiplinine ve çalışkanlığına hayran olduğum sevgili danışman hocam, Dr. Öğr. Üyesi Ayça BAL ÖZTÜRK'e

Tez çalışmam boyunca hem benimle birlikte yorulup hem de aldığım her sonuçta mutluluğumu benimle paylaşan, yardımlarını hiç esirgemeyen, deneyimleri ile bana ışık tutan canım lab çalışma arkadaşlarım Burçin İZBUDAK, Elif YÜCE, Omid NEJATİ ve Mustafa DÖNMEZ'e,

Bölüme geldiğim günden bugüne kadar bana destek olan, kendime güvenmemi ve bu alanda gelişmemi sağlayan, her zaman yanımda olan, bana her daim yol gösteren saygıdeğer İVEK Vakfı Yönetim Kurulu Üyelerimize, Genel Müdürümüz Tayfun GÜMÜŞ'e, çalışma arkadaşlarım Sibel KALKAN ve Büşra ULUCUTSOY'a,

Hayatımın baş kahramanları, bugünlere gelmemi sağlayan, hayallerimin sonsuz destekçileri, benim sınırlarımı daraltmak yerine her zaman sınırlarımın ötesine gitmem için elinden ne geliyorsa yapan, en önemlisi de beni ben yapan sevgili annem Fatma TANRIVERDİ, babam Hasan TANRIVERDİ, kardeşlerim Derya, Necla ve Mine'ye, sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	II
ETİK BEYANI	III
İTHAF	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	XI
ÖZET.....	XIII
ABSTRACT	XIV
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Doku Mühendisliği.....	3
2.2. Kornea Doku Mühendisliği.....	5
2.2.1. Kornea Dokusunun Yapısı ve Özellikleri	7
2.2.2. Kornea Doku İskelelerinde Aranan Özellikler.....	11
2.3. Doku Yapıştırıcıları.....	11
2.3.1. Doku Yapıştırıcılarının Yapısı ve Özellikleri	12
2.3.2. Doku Yapıştırıcısı Olarak Kullanılan Biyomalzemeler	13
2.3.2.1. Sentetik İçerikli Oküler Yapıştırıcılar.....	14
2.3.2.1.1. Siyanoakrilat Esaslı Oküler Yapıştırıcılar.....	15
2.3.2.1.2. Polietilen Glikol (PEG) Esaslı Oküler Yapıştırıcılar	17
2.3.2.1.3. Dendrimer Esaslı Oküler Yapıştırıcılar	19
2.3.2.2. Doğal İçerikli Oküler Yapıştırıcılar	19
2.4. Hidrojeller.....	22
2.4.1. İpek Fibroin Bazlı Hidrojeller	26
2.4.2. Jelatin ve GelMA Bazlı Hidrojeller.....	27
3. MATERYAL VE METOD.....	29
3.1. Kimyasal Malzemeler	29
3.2. Sarf Malzemeler	29

3.3. Hücre Hatları	30
3.4. Kullanılan Cihazlar	30
3.5. İpek Fibroin İzolasyonu	30
3.6. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Hazırlanması	31
3.7. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Yapısal Karakterizasyonu	31
3.8. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Şişme ve Degradasyon Testleri	32
3.9. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Mekaniksel Dayanım Testleri	32
3.10. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Patlama Basıncı Testleri	32
3.10.1. In vitro Patlama Basıncı Testi	32
3.10.2. Ex vivo Patlama Basıncı Testi.....	33
3.11. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Biyouyumluluk Testleri	33
3.11.1. Hücrelerin Stoktan Çıkartılması.....	33
3.11.2. Hücrelerin Pasajlanması	34
3.11.3. Hücrelerin Stoklanması	34
3.11.4. Hücrelerin Sayımı.....	34
3.11.5. MTT Testi.....	35
3.12. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Hücre Adezyonu Testleri	36
3.12.1. DAPI Actin Analizi	36
3.12.2. PrestoBlue Analizi.....	37
4. BULGULAR	38
4.1. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Yapısal Karakterizasyon Sonuçları	38
4.2. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Şişme ve Degradasyon Testi Sonuçları..	39
4.3. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Mekaniksel Dayanım Testi Sonuçları ...	40
4.4. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Patlama Basıncı Testi Sonuçları.....	41
4.5. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Biyouyumluluk Testleri	42
4.6. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Hücre Adezyonu Sonuçları	42
4.6.1. DAPI/Actin Testi Sonuçları	42
4.6.2. PrestoBlue Testi Sonuçları	43
5. TARTIŞMA	44

5.1. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının FTIR Analizi Sonuçları	44
5.2. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Şişme ve Degradasyon Testi Sonuçları .	44
5.3. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Mekanik Dayanım Testi Sonuçları.....	46
5.4. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Patlama Basıncı Testi Sonuçları.....	46
5.5. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Biyouyumluluk Sonuçları	47
5.6. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Hücre Adezyonu Test Sonuçları	48
6. SONUÇ	49
KAYNAKÇA	50
EKLER	61
EK – 1: İNTİHAL RAPORU	62
EK – 2: ÖZGEÇMİŞ	63

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Kornea doku mühendisliğinde kullanılan hücre tipleri.....	10
Tablo 2.2: Kornea doku mühendisliği için doğal hidrojel formülasyonlarındaki güncel çalışmaların özeti.	23



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Doku Mühendisliği Teknikleri	4
Şekil 2.2: (A) Kornea yapısı ve bir oküler yapıştırıcının kornea üzerine uygulanışı: (i) gözün ve (ii) korneanın anatomisi. (B) İdeal bir oküler yapıştırıcının sahip olması gereken biyolojik, kimyasal, fiziksel ve pratik özellikler	6
Şekil 2.3: Kornea Dokusunun Yapısı	7
Şekil 2.4: Sentetik hidrojel oluşturan polimerlerin yapısı	14
Şekil 2.5: Doğal olarak türetilmiş polimerlerin yapısı.....	21
Şekil 3.1: İpek fibroin sentez adımları.....	31
Şekil 4.1: %7,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarının FTIR analizi sonuçları.....	38
Şekil 4.2: %15 ipek fibroin doku yapıştırıcılarının FTIR analizi sonuçları..	38
Şekil 4.3: %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarının FTIR analizi sonuçları	39
Şekil 4.4: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının şişme testi sonuçları.	39
Şekil 4.5: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının degradasyon testi sonuçları.	40
Şekil 4.6: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının mekanik dayanım testi sonuçları.....	40
Şekil 4.7: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının in vitro patlama basıncı testi sonuçları..41	
Şekil 4.8: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının ex vivo patlama basıncı testi sonuçları..41	
Şekil 4.9: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının MTT testi sonuçları..	42
Şekil 4.10: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının DAPI/Aktin testi sonuçları.....	42
Şekil 4.11: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının PrestoBlue testi sonuçları.....	43

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

2B	: İki boyutlu
3B	: Üç boyutlu
BFY	: Bağlı floresan yoğunluk
BSA	: Sığır serum albumin
CEnCs	: Kornea endotel hücreleri
CEpCs	: Kornea epitel hücreleri
CFs	: Kornea fibroblast hücreleri
CKs	: Kornea keratosit hücreleri
Col	: Kolajen
CPCs	: Kardiyak progenitör hücreleri
CSCs	: Kornea stromal hücreler
DAPI	: 4' 6, 6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye Eagle ortas
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ECM	: Ekstraselüler matris
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
GAG	: Glikozaminoglikan
GelMA	: Metakrile Jelatin
HA	: Hiyalüronik asit
HEMA	: Poli (2-hidroksietil metakrilat)
ICP-MS	: İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi
IF	: İpek fibroin
LESCs	: Limbal epitel kök hücreleri
LiBr	: Lityum bromür
LSSCs	: Limbal stromal kök hücreler
MSCs	: Mezenkimal kök hücreler
MTT	: Metiltiazoldifeniltetrazolyum bromür
PAA	: Poli(akrilik asit)
PAG	: Poli(aldehit guluronat)
PBS	: Fosfat tuz tamponu
PCL	: Poli-ε-kaprolakton
PEG	: Polietilen glikol
PEO	: Poli etilen oksit
PFA	: Paraformaldehit
PGA	: Poliglikolik asit
PHEMA	: Poli(hidroksietil metakrilat)
PLA	: Polilaktik asit
PLGA	: Poli(laktik-ko-glikolik asit)

PLLA	: Poli-L-laktik asit
PVA	: Polivinil alkol
PVAc	: Polivinil asetat
RGD	: Arjinin-glisin-aspartik asit
RNA	: Ribonükleik asit
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SPA	: N-süksinimidil propiyonat
Ultraviyole	: UV



ÖZET

Tanrıverdi, A. (2022). Kornea Defektlerinin Tedavisi için Hidrojel Temelli Doku Yapıştırıcılarının Sentezi. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Doku Mühendisliği ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Tez çalışması kapsamında kornea defektlerinin onarımında kullanılmak üzere ipek fibroin temelli doku yapıştırıcıları geliştirilmiştir. İpek kozalarından ipek fibroin izole edilerek 3 farklı konsantrasyonda (ağırlıkça %7,5, %15, %22,5) ve üç farklı ışıma süresi (1 dk, 2 dk, 4 dk) uygulanarak doku yapıştırıcıları hazırlanmıştır. Hazırlanan doku yapıştırıcıları FTIR analizi ile yapısal olarak karakterize edilmiştir. Doku yapıştırıcılarının şişme analizleri PBS ortamında, degradasyon analizleri PBS ve yapay gözyaşı ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, mekaniksel dayanım testleri ve *in vitro* ve *ex vivo* patlama basıncı testleri gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen doku yapıştırıcılarının kornea fibroblast hücreleri ile biyouyumluluk testleri yapılmış ve biyouyumlu olduğu kanıtlanan doku yapıştırıcılarının üzerine kornea fibroblast hücreleri ekilerek DAPI/Aktin analizi ile hücre adezyon davranışları ve hücre morfolojileri incelenmiştir. Ek olarak, PrestoBlue analizi ile doku yapıştırıcılarının üzerine ekilen hücrelerin çoğalma davranışları belirlenmiştir. Geliştirilen doku yapıştırıcılarının kornea yaralanmalarının onarımında kullanılmak üzere potansiyel bir materyal olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kornea doku mühendisliği, Kornea rejenerasyonu, Doku yapıştırıcı, Hidrojel, İpek fibroin

ABSTRACT

Tanrıverdi, A. (2022). Synthesis Of Hydrogel-Based Tissue Adhesives for The Treatment of Corneal Defects. Istinje University, Institute of Health Science, Department of Stem Cell and Tissue Engineering, Master Thesis. Istanbul.

Within the scope of the thesis study, silk fibroin-based tissue adhesives have been developed to be used in the repair of corneal defects. Tissue adhesives were prepared by isolating silk fibroin from silk cocoons and applying three different concentrations (7.5 wt%, 15 wt%, 22.5 wt%) and three different irradiation times (1 min, 2 min, 4 min). The prepared tissue adhesives were structurally characterized by FTIR analysis. Swelling analyzes of tissue adhesives were performed in PBS, degradation analyzes were performed in PBS and artificial tears. Afterwards, mechanical strength tests and *in vitro* and *ex vivo* burst pressure tests were performed. The biocompatibility tests of the developed tissue adhesives with corneal fibroblast cells were performed and the cell adhesion behaviors and cell morphologies were examined by DAPI/Actin analysis by seeding corneal fibroblast cells on the tissue adhesives that were proven to be biocompatible. In addition, the proliferation behavior of cells seeded on tissue adhesives was determined by PrestoBlue analysis. It was concluded that the developed tissue adhesives are a potential material to be used in the repair of corneal injuries.

Key Words: Cornea tissue engineering, Corneal regeneration, Tissue adhesives, Hydrogel, Silk fibroin

1. GİRİŞ

Kornea defektleri dünya genelinde görme bozukluğunun yaygın nedenleri arasındadır. Yılda 1,5 milyondan fazla yeni kornea körlüğü vakası rapor edilmekte ve yalnızca %5 'i tedavi edilmektedir (Gain ve ark.,2016; Islam ve ark.,2018). Kornea yaralanmaları ve enfeksiyonları doku ve görme kaybına yol açabileceği gibi kornea stromal inflamasyonun şiddetli veya ilerleyici durumlarında da, stromal matris gözün yapı bütünlüğünü bozmaktadır (Ljubimov ve ark.,2015). Hidrojel temelli doku yapıştırıcıları, yapıları ve fiziksel özellikleri nedeniyle yumuşak ve sert doku mühendisliği uygulamaları için dikkate değer bir potansiyele sahiptir. Mikro-yapı üzerinde hassas kontrol, gelişmiş mekanik özellikler ve uygun biyobozunma hızları, *in vivo* terapötik ajanların kontrollünü sağlamak için hidrojel temelli yapıları yararlı alternatifler haline getirmektedir. Kornea rekonstrüksiyonu için biyoyumlu ve şeffaf biyoadeziflere ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle acil durumlarda, yapıştırıcı biyomalzemeler, kornea stromal kaybının tedavisi için umut verici bir yaklaşım olarak görülmektedir. Genel olarak, kornea yerine kullanılan biyomalzemelerde, doğal korneaya benzer fiziksel, yapısal ve fizyobiyojik özellikleri kullanmak gerekir. Kornea onarımı ve rejenerasyonu için ideal bir biyomalzeme (i) biyoyumluluk ve biyolojik bozunabilirlik, (ii) mekanik stabilite ve uygun sertlik, (iii) yüksek şeffaflık, (iv) doğal dokuya yüksek yapışma, (v) hücre desteği ve doku rejenerasyonu yeteneği (vi) uygulama ve kullanım kolaylığına sahip olmalıdır (Chen ve ark., 2018).

Doku yapıştırıcısı olarak kullanılan biyomalzemeler iki sınıfa ayrılmaktadır: (i) sentetik yapıştırıcılar (örn. siyanoakrilatlar ve polietilen glikol (PEG)-bazlı yapıştırıcılar) ve (ii) doğal olarak elde edilen yapıştırıcılardır (örn. fibrin, polisakkarit, kolajen bazlı yapıştırıcılar vb.) (Park ve ark., 2011). Doğal biyopolimerler mükemmel biyoyumluluk eğilimindedir, ancak genellikle düşük mekanik stabilite ve yapışma sağlamaktadır. Sentetik biyopolimerler ise istenilen özelliklerin özelleştirilmesi sağlanabilirken, yeterli doku yenilenmesi ve biyoentegrasyon elde edilemeyebilmektedir (Chen ve ark., 2018).

Günümüzde kornea ile uzun süreli entegrasyon için uygun bir yapıştırıcı tasarlanmamıştır, ancak kornea insizyonlarını kapatabilecek yapıştırıcıların geliştirilmesine yönelik önemli araştırmalar yapılmıştır. OcuSeal (Beaver-Visitec International, MA, ABD), Avrupa'da kornea kesiklerinin kapatılmasında kullanılan

PEG bazlı bir yapıştırıcıdır. Ancak bu sistemin bazı olumsuz etkileri mevcuttur. Sistemin ultraviyole (UV) ışık altında çapraz bağlanması nedeniyle kornea veya retina fotokimyasal sitotoksositeye veya DNA hasarına neden olabilmektedir. Oküler rejenerasyon uygulamaları için kolajen, fibrin, jelatin, aljinat ve kitosan temelli doğal yapıştırıcılar geliştirilmiştir. Ancak, hem rejeneratif hem de yapışkan özellikleri birleştiren ve kornea dokusunun doğal iyileşmesini uygun şekilde taklit edebilen hiçbir hidrojel biyoyapıştırıcı sistemi mevcut değildir. Ek olarak, günümüzde geliştirilen biyomalzemelerin çoğu; kornea dokusuna yüksek yapışma ve uzun süre tutunabilme, uygun optik özellikler (saydamlık) ve doğal kornea ile tam olarak bütünleşmek için gereken miktarda esneklik, sertlik ve mukavemet özelliklerinden yoksundur (Vats ve ark., 2003).

Tüm bunların ışığında tez çalışmasının amacı kornea defektlerinin onarımında kullanılmak üzere ipek fibroin temelli ışık altında çapraz bağlanabilen hidrojel doku yapıştırıcıları geliştirilmiştir. Doku yapıştırıcıları şişme analizi, degradasyon analizi, mekaniksel dayanım testi, *in vitro* ve *ex vivo* patlama basıncı testleri, kornea fibroblast hücreleri kullanılarak biyouyumluluk (MTT) ve adezyon tesleri (DAPI/Aktin ve PrestoBlue) ile karakterize edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Doku Mühendisliği

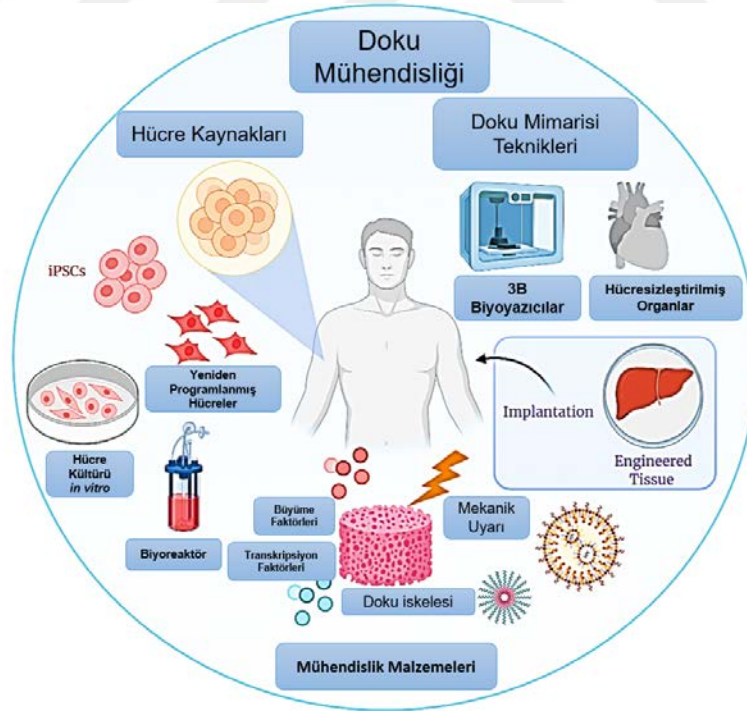
İlk kez 1980'lerin sonunda ortaya çıkan 'doku mühendisliği', biyolojik problemlerin çözüme kavuşturulması amacıyla mühendislik beceri ve yeteneklerini de kullanarak yeni gelişen interdisipliner bir alan olarak tanımlanmaktadır. Genetik mühendisliği, cerrahi bilimler, malzeme bilimi, hücre biyolojisi, fizik, kimya mühendisliği, biyomühendislik, bilgisayar bilimi ve daha pek çok farklı alandan bilim insanını birbirine bağlamaktadır (Jindal ve ark., 2014). Rejeneratif tıpta önemli bir alan olan doku mühendisliği, doğal dokuların anatomik ve işlevsel özelliklerini taklit eden biyolojik çözümler geliştirerek hasar görmüş veya hastalıklı dokuların normal işlevini eski haline (rejenerasyon sağlamak) getirmektedir (Lee ve ark., 2018). Doku mühendisliği, hasarlı veya fonksiyonunu tamamen kaybetmiş doku veya organları; biyomalzemeler ve farklı tipteki hücreler kullanarak (öregün kök hücreler) *in vitro* ortamda üretmek üzere çalışılan bir alandır. Klasik hücre temelli doku mühendisliği, rezorbe olabilen doku iskelelerinin hücreler ve/veya büyüme faktörleriyle birlikte dokuya uygulanmasıyla, dokunun büyümesini uyarmayı ve yönlendirmeyi içeren bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımda iyi sonuçların elde edilmesi doku mühendisliğinin üç temel bileşeni olan hücreler, doku iskeleleri ve hücre sinyallerinin birlikte uyumlu bir şekilde kullanılmasıyla mümkün olmaktadır (Rosa ve ark., 2012).

Doku mühendisliği için her birinin kendi avantajları ve dezavantajları olan çeşitli hücre kaynakları vardır. Hücreleri elde etmek için en iyi yöntemlerden biri de otolog hücrelerin doğrudan hastadan alınması ve ardından *in vitro* ortamında çoğaltılmasıdır. Bu yöntem, transplantasyon sonrası bir bağışıklık tepkisine sebep olmadığı için tercih edilse de, birtakım sınırlamalar içerdiğinden çok yaygın kullanılamamaktadır. Hastalıklı durumlarda veya yaşlı bir hastada otolog hücreler transplantasyon için uygun olmayabilir (Heath, 2000).

Üç boyutlu (3B) yapı iskeleleri, hastadan veya başka bir vericiden alınan hücrelerin biyoyumlu scaffoldlar üzerinde geliştirilerek yeni dokuların oluşturulmasına olanak sağlar. Bir yapı iskelesinin birincil işlevi doku iletimidir ve bu nedenle hücre bağlanmasına, yapı iskelesi üzerine veya içine, hücre çoğalmasına ve hücre farklılaşmasına izin vermelidir. Ayrıca hücrelerin fenotiplerini

koruyabilecekleri ve gerekli proteinleri ve molekülleri sentezleyebilecekleri bir ortam sağlanmalıdır. İskeleler için gerekli olan özellikler arasında yüksek gözeneklilik, yüksek yüzey alanı, yapısal mukavemet, özel 3B şekil ve gerekirse biyobozunur malzemeler olmalıdır. İskeleleri imal etmek için kullanılan teknikler, malzemenin özelliklerine ve amaçlanan uygulamasına bağlıdır. İskeleler polimerler, metaller, seramikler veya kompozitlerden oluşabilir. Uygulanacak dokunun özelliklerine çok yakın bir malzeme seçmek önemlidir (Vats ve ark., 2003).

Hücre dışı matris, doku ve organlardaki yerleşik hücreler tarafından üretilir ve çeşitli biyoaktif moleküllerin içeriği nedeniyle çevreleyen hücrelere biyofiziksel ve biyokimyasal destek sağlamak için çevreleyen ortama salgılanır. Son zamanlarda, hücre dışı matris, doku mühendisliği için umut verici bir yaklaşım olarak kullanılmıştır. Gelişmekte olan çalışmalar, hücre dışı matris yapı iskelelerinin uygun bir rejeneratif mikro ortam oluşturabildiğini, dokuya özgü yeniden yapılanmayı teşvik edebildiğini ve cilt, kemik, sinir, kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, küçük dokuların onarımı ve fonksiyonel rekonstrüksiyonu için endüktif bir şablon olarak hareket edebildiğini göstermektedir (Chen ve ark., 2018).



Şekil 2.1: Doku mühendisliği teknikleri (Anonim, 2020).

Sonuç olarak, doku mühendisliği uygulamaları bir çok alandaki bilim insanları ve mühendislerin işbirlikçi yaklaşımları ile ilerlemeye devam edecektir.

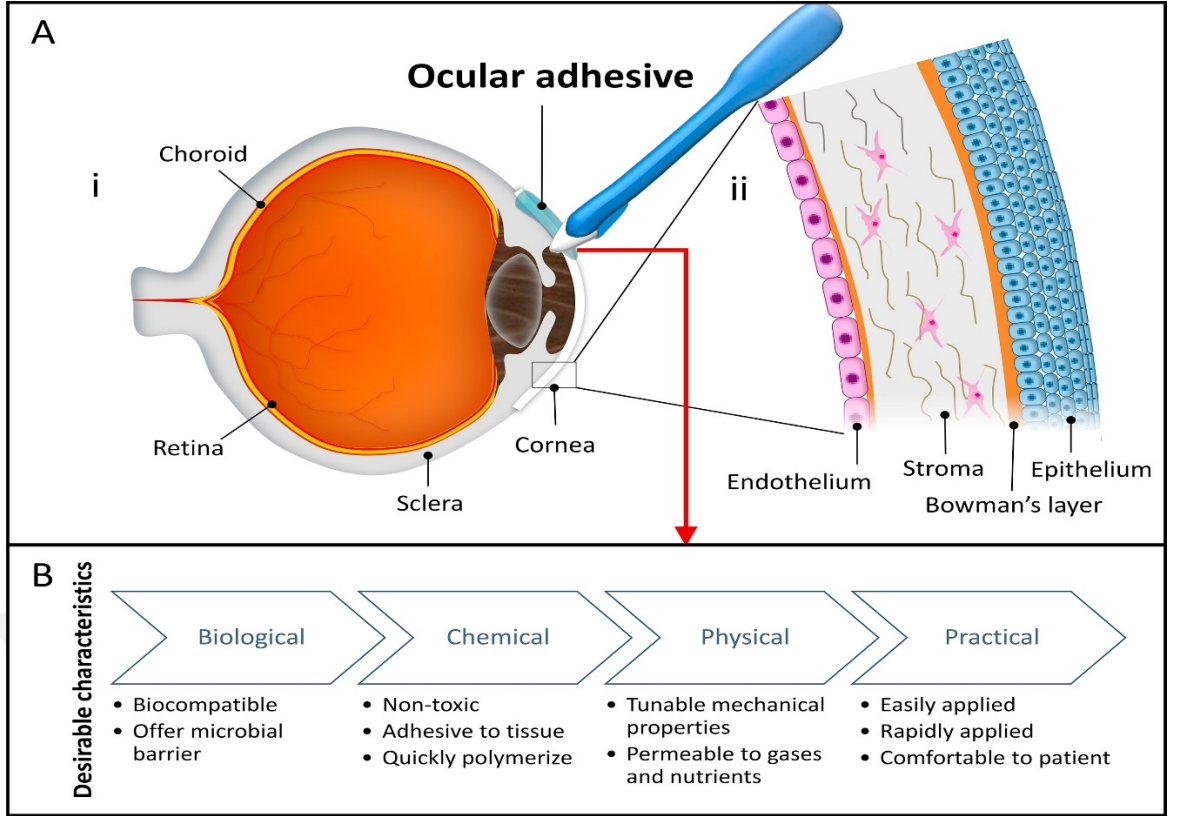
2.2. Kornea Doku Mühendisliği

Korneanın gözdeki en önemli işlevleri arasında göz içindeki yapıları korumak, ve ışık ışınlarını minimum saçılma ve optik bozulma ile retinaya odaklamak yer alır. Kornea, yapısal bir bariyer görevi gören ve gözü enfeksiyonlara karşı koruyan konveks biçimli, saydam, şeffaf ve avasküler bir dokudur (Sridher, 2018).

Hastalıklı veya yaralı kornealar için doku mühendisliği genel olarak büyük bir umut vaat etmektedir. Doku mühendisliği yöntemleriyle bir kornea oluşturulacaksa, başarılı ve uygun kültür tekniklerine ihtiyaç duyulur (Ruberti ve ark., 2008). Korneanın doku mühendisliği, başta bağışıklık reddi ve donör kornea eksikliği olmak üzere kornea transplantasyonunun mevcut dezavantajlarının üstesinden gelmek için tıbbi tedavide bir paradigma değişikliğini temsil eder. Organ naklinde bir hastanın tedavisi için bir donöre ihtiyaç vardır. Doku mühendisliği ise tek bir donörden birçok rejenere organ veya dokunun üretilebildiği bir yaklaşımdır. Bu nedenle, hastalığın tıbbi tedavisinde bir ilerleme olarak kabul edilir (Nishida, 2003).

Dünya çapında tahminen 10 milyon insan kornea görme kaybından muzdariptir ve yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 40.000 kornea nakli yapılmaktadır (Whitcher ve ark., 2001). Artan kornea nakli ihtiyacının cevabı iki ana yaklaşımla sınırlıdır: allojenik ve sentetik materyaller. Kornea hastalıkları ve limbal kök hücre eksikliğinden (örn., oküler yanıklar) kaynaklanan körlük durumunda, otolog limbal kök hücre nakli, neovaskülarizasyonu, kronik inflamasyonu ve stromal skar oluşumunu önlemek için kornea rejenerasyonu için etkili bir tedavi seçeneği olarak sunulmuştur (Ghezzi ve ark., 2015).

Canlı insan kornealarına olan ihtiyacı ele almak için son yıllarda doku mühendisliğinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Birincil hücrelerle kombinasyon halinde hem sentetik hem de doğal olarak türetilmiş biyomateriyaller, epitelyal, stromal, endotel katmanları ve tam kalınlıktaki kornea dokularından başlayarak kısmi veya tam kalınlıktaki patolojik korneaları yenilemek ve değiştirmek için kullanılmıştır. Tamamen hücre temelli yaklaşımlar, hem kornea dokusu replasmanları için hem de *in vitro* bağlamda uygun alternatifler olabilir (Trujillo-de Santiago ve ark., 2019).



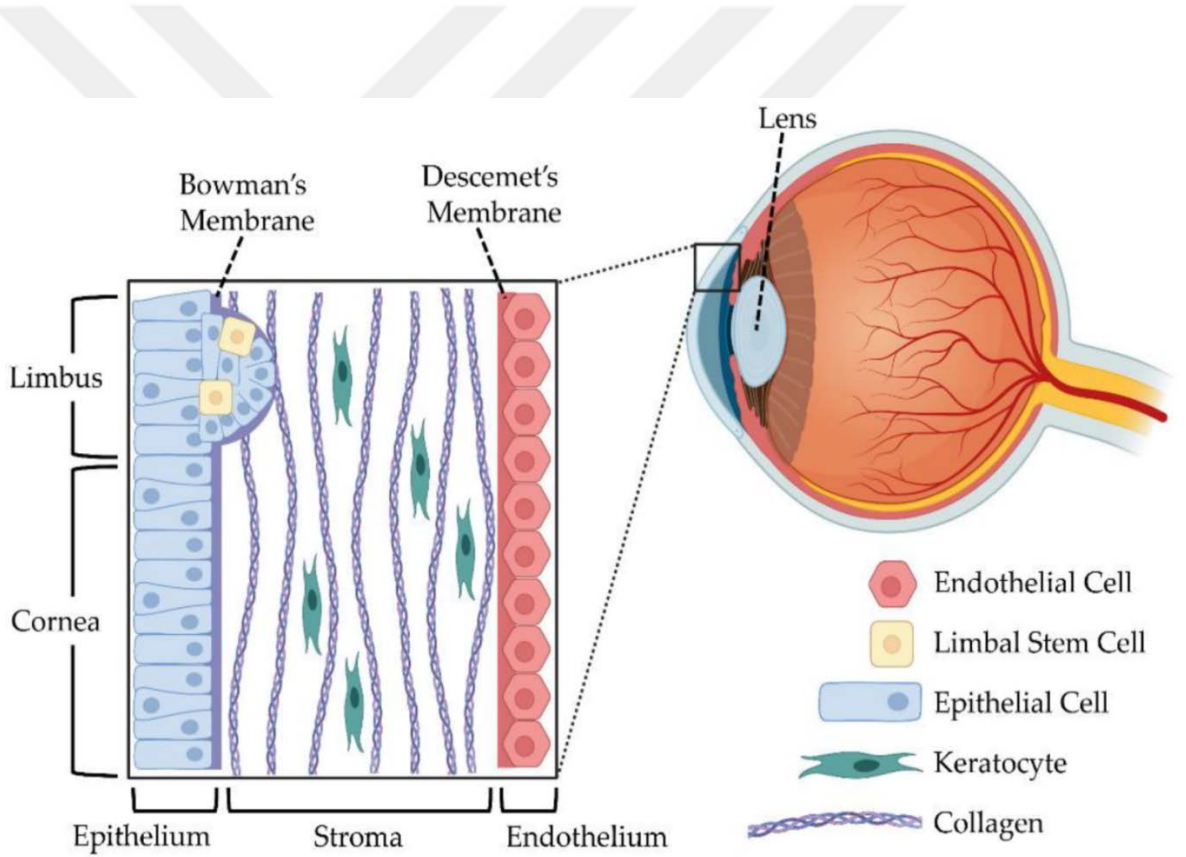
Şekil 2.2: (A) Kornea yapısı ve bir oküler yapıştırıcının kornea üzerine uygulanışı: (i) gözün ve (ii) korneanın anatomisi. (B) İdeal bir oküler yapıştırıcının sahip olması gereken biyolojik, kimyasal, fiziksel ve pratik özellikler (Trujillo-de Santiago ve ark., 2019)

İnsan gözünün mimarisi oldukça karmaşıktır; ışığın geçişine izin vermek için tam olarak organize edilmiş birkaç doku katmanına sahiptir. İdeal bir oküler yapıştırıcı, özel uygulamalarına ve tıbbi müdahalede yer alan anatomik parçalara bağlı olarak bir dizi özelliği karşılamalıdır (Şekil 1.2) (Park ve ark., 2011).

Tahrişe, iltihaplanmaya ve enfeksiyona neden olabileceğinden, son yıllarda oftalmik cerrahide dikiş yerine doku yapıştırıcısı kullanılmaktadır. Doku yapıştırıcıları, yaralı dokuları kapatmak için sütür yardımcısı ve alternatifler olarak geliştirilmiştir. Kullanım kolaylığı ve ameliyat sonrası rahatlığı nedeniyle popülerlik kazanmıştır (Drury ve ark., 2003).

2.2.1. Kornea Dokusunun Yapısı ve Özellikleri

Gözün penceresi olan kornea, son derece şeffaftır ve yapısı benzersiz özel bir avasküler dokudan oluşmaktadır. Kornea kubbe şeklinde bir yapıya sahip olup gözün ön kısmında bulunur. Aşırı basıncı engelleyebilmek ve göz hareketini sürdürebilmek için mekaniksel bir stabiliteye sahiptir (Kong ve ark., 2016). Kornea üç hücre katmanından ve iki zarndan oluşur. Bu katmanların ve zarların her birinin belirli işlevleri vardır. Kornea epitel (en dıştaki hücre tabakası), stroma ve endotel (en içteki hücre tabakası) katmanlarından oluşur. Bowman zarı epitel ve stromayı ayırırken, Descemet zarı stroma ve endotelyumu ayırır; bunlar korneanın iki hücresiz kollajenöz ara yüzüdür (Ghezzi ve ark., 2015).



Şekil 2.3: Kornea dokusunun yapısı (Jameson ve ark., 2021).

Kornea epitel, korneanın en dış tabakası, ışığın göze kırılmasında en önemli rolü olan keratinize olmayan 5-6 sıralı çok katlı yassı hücrelerden oluşur. Epitel hücrelerden oluşan bu hücreler ektoderm kökenlidir. Ayrıca rejenerasyon yeteneği de hızlıdır. Ön yüzü gözyaşı ile kaplanmıştır (Torricelli ve ark., 2013). Epitel, kornea epitel katmanlarında sonlanan sinir uçlarına sahip, oldukça innerve edilmiş bir dokudur (Stepp ve ark., 2013). Kornea epitel tabakası, 4-6 hücre katmanına sahip ve 40-50 µm kalınlığında çok katmanlı bir yapıdan oluşan kornea dokusunun %10'unu oluşturur (Ghezzi ve ark., 2015). Korneada uygun ışık geçirgenliğine ulaşmak için, epitelin, suyun ve tüm çözünür bileşenlerin stroma içine veya dışına transferine izin veren biyolojik bariyerli pürüzsüz bir tabaka sağlaması önemlidir (Kong ve ark., 2016). Bu epitel, üç epitel hücre tipinden oluşur. Bunlar, Bazal Kolumnar hücreler, Kanat hücreler ve Yüzeyel hücrelerdir. Bazal Kolumnar hücreler, tek tabakadan oluşur. Hemidesmozomlarla epitel bazal membranına yapışır. Kanat hücreler, ince kanatları anımsatan uzantılara sahip olup bu hücrelerin 2-3 hücre katmanını oluşturmaktadır. Son olarak poligonal hücrelerden oluşan Yüzey hücreleri, ince ve uzun 2-3 sıradan oluşan bir yapıya sahiptir. Birkaç günde bir yüzey hücreleri kendini yenileyerek gözyaşı döker. Epitel hücreleri, limbus kök hücreleri tarafından her 7-10 günde bir sürekli olarak yenilenir. Yenilenme kapasitesi çok iyi olduğundan epitel hasarında korneada skar oluşmaz (Liliensiek ve ark., 2006; Teixeira ve ark., 2006; Yan ve ark., 2012; Baradaran-Raffi ve ark., 2016; Campbell ve ark., 2019; Fuest ve ark., 2020).

Genel olarak epitel, gözlerin dış yüzeyini temsil eder, iç katmanları yaralanmalardan ve enfeksiyonlardan korur (Yousaf ve ark., 2019). Ek olarak, kornea epiteli, retinayı UV ışığının neden olduğu hasarlardan korumak için bir filtre işlevi görür (Lanza ve ark., 2020). Kornea epitelinin işlevleri, saydam ve düzgün bir opik membran oluşturarak dışarıdan gelebilecek mikroorganizma, yabancı cisim, solüsyon ve ilaçlara karşı bir bariyer kurmaktır (Aydın, 2010).

Kornea stroması, hizalanmış kolajen nanofiberlerden oluşan bir katmandır. Kornea stroması, paralel kollajen fibril katmanları ile karakterize edilen, çap olarak tek tip lokal interfibriller boşluk ile dağılan, korneanın %90'ını oluşturan kolojen açısından zengin avasküler bir yapıya sahip yoğun bir bağ dokusudur (Akter, 2016). Kornea stroması, mezenkimal hücre popülasyonu olan keratosit hücreleri içeren çok sayıda kolajen lamelden oluşur. Kolajen nanoliflerin düzenli yapısı, kornea dokusunun mekanik mukavemetini ve ışık geçirgenliğini sağlamada kritik bir role sahiptir (Wu ve ark., 2018).

Stroma, çoğunlukla aselülerdir (%7-10 keratosit hücreleri) ve kornea kalınlığının %80-85'ini oluşturur (Yousaf ve ark., 2019). Yapısal olarak, stroma hizalanmış kolajen liflerinden oluşur; bu hizalama yapısı korneanın şeffaflığını ve gerilme davranışını korumak için önemlidir (Salehi ve ark., 2020). Stroma dokusu hasar gördüğünde, bu disfonksiyonun etkisi genellikle yara izi bırakır. Keratosit hücreleri, kolajen liflerinin yenilenmesini sağlayarak yapının korunmasından sorumludur. Bununla birlikte, bu skar, göze ışık geçirgenliğinin azalmasına neden olur, çünkü stromal keratosit kök hücre (SKSC) popülasyonu iyileştikçe, 1-3 yıllık uzun bir süre boyunca skar oluşumu oluşur (Akter, 2016). Geniş ölçüde çapraz bağlı kolajen içeren insan stromasının rejenerasyonu, *in vivo* koşullar altında daha zordur (Ahearne ve ark., 2020).

Kornea endotel hücreleri tek sıralı çoğunlukla hekzagonal yapılardır. Descement membranının arka yüzeyinde yer alırlar. 5 µm kalınlıktadırlar. Mitoz ile çoğalmazlar ve nöral krest kökenli hücrelerdir. Poligonal şekilli olup yassı epitel hücrelere sahiptir. Boyutları homojendir. Endotel, korneanın en ince ve en iç tabakası olmasına rağmen, fonksiyonun sürdürülmesi için kritik öneme sahiptir (Akter, 2016). Optimum optik netliği korumak için bağlı dehidrasyonun korunması gereklidir. Hücre sayısı genç bir erişkinde 3500 hücre/mm² iken yaşla beraber hücre kaybı sergiler. Normal bir endotel tabakasında hücrelerin %70-80'i hekzagonal, bu orandaki olumsuz sapmalar pleomorfizm olarak adlanır. Hücreler genellikle uniform olarak dizilidir, %25'lik sapmalar normal kabul edilir, bu orandaki sapmalarda hücreler büyüklü, küçüklü, düzensiz dizilirler ki bu duruma da polimegatizm ismi verilmektedir. Endotel hücre büyüklüğündeki varyasyon polimegatizm, hücre şeklindeki varyasyon ise pleomorfizm olarak adlandırılır (Tavakoli, 2008).

Endotel, kornea saydamlığını korumada çok önemlidir. Yaşla rejenere olma özelliği olmadığı için endotel hücrelerinin yoğunluğu yaşla azalır. Komşu hücreler gelişerek boşluğu doldurur. Cerrahi travmaya bağlı gelişen kornea endotel kaybı da benzer şekilde komşu hücrelerin gelişmesiyle doldurulur. Bu hücrelerde yüksek metabolik aktivite vardır (Aydın, 2010).

Tablo 2.1 Kornea doku mühendisliğinde kullanılan hücre tipleri (Jameson ve ark., 2021).

hücre tipi	Kısaltma	Sağlıklı Fenotip	Ortak Belirteçler
Kornea Epitel Hücreleri	CEpC'ler	 Arnavut kaldırımı yakın paketlenmiş	CK3 CK12 CK15 ALDH3A1 Cx43 Involucrin p63
Kornea Stromal Hücreler	CSC'ler	 dendritik	Keratokan Lumikan α -aktinin α SMA ALDH1A1 ALDH3A1
Kornea Endotel Hücreleri	GenC'ler	 Altigen Yakın Paketli	ZO-1 Na ⁺ /K ⁺ ATPaz
Yağ Dokusu Türetilmiş Kök Hücreler	ASC'ler		Ki67 p63 p40 CK3
Mezenkimal Kök Hücreler	MSC'ler		CD13 CD29 CK3 CK8 CK12
Limbal Epitel Kök Hücreleri veya Kornea Epitel Kök Hücreleri	LESC'ler veya CEpSC'ler		Ki67 p63 p40 CK3 ABCG2 CK19 EFGR İntegrin β 1

Bowman Membran, stromanın yüzeyel kısmını oluşturur. Epitelin altında, aselüler yapıda olup 8-10 μ m kalınlıktadır. Saydam bir tabakaya sahiptir. Yoğun proteoglikanların ve primer olarak tip 1 ve tip 3 kolajen liflerinden meydana gelmiştir.

Bowman membranının kendini rejene etme özelliği olmadığından hasara uğradığında kendini yenileyemez (Aydın,2010).

Descement Membranı ince kolajen fibrillerden oluşan 10 µm kalınlığında kornea endotelinin bazal membranıdır. Kendini rejenere eden bir yapıya sahiptir. Primer olarak tip 4 kollajen ve laminin içerir. Stromadan kolaylıkla ayrılabilir (Eghrari ve ark., 2015).

2.2.2. Kornea Doku İskelelerinde Aranan Özellikler

Doku mühendisliği alanında yapılan çalışmalarda farklı yaklaşımlar geliştirilmektedir. Bu yaklaşımların birinde yeni bir dokunun oluşumu için sadece biyomalzeme kullanılırken, hücre nakli olarak isimlendirilen diğer bir yaklaşımda sadece hücreler kullanılarak tedavi amaçlanmaktadır. Diğer yaklaşımlarda ya biyomalzeme ile biyosinyal bileşenleri birlikte kullanılmakta ya da biyomalzeme, hücre ve biyosinyal bileşenlerinin üçü birlikte kullanıldığı görülür. Yeni doku veya organları oluşturmak için hücre çoğalmasını sağlamak ve gerekli mekanik desteği vermek için biyomalzemelerden 3B doku iskeleleri üretilir (Vacanti ve ark., 1999).

Doku iskeleleri, doku mühendisliğinin temel bileşenlerinden biridir. Hücreler ve polimerik matriksten oluşan sistemlerdir. Hücre büyümesini ve gelişmesini sağlamak amacıyla doğal veya sentetik polimerler kullanılır (Nishida ve ark., 2004; Liu ve ark., 2006; Torbet ve ark., 2007).

Doku mühendisliği çalışmaları kapsamında, yüksek kaliteli iskeleleri inşa etmek için gerekli başlıca özellikler vardır. Kullanılacak olan iskelelerin malzemeleri biyolojik olarak uyumlu ve kontrol edilebilir bir biyobozunurluğa sahip olması gerekmektedir. Bunun yanında parçalanma hızının doku oluşum hızı ile uyumlu olması önemlidir. Yapıyı korumak için belirli bir seviyede mekanik mukavemet gerekmektedir. Ara bağlantıları sağlayabilmek adına yüksek gözeneklilik ve uygun gözenek boyutu için dahili gözenekli yapılar gereklidir. Besinlerin ve metabolik atıkların daha kolay taşınabilmesi adına geniş bir yüzey alanı olmalıdır. Hücrelerin yapışmasını, gelişmesini ve işlevini artıran bir yüzey kimyasına sahip olmalı ve istenilen şekil ve boyutta üretilebilir olmalıdır (Freyman ve ark., 2001).

Doku mühendisliğinde kornea yaralanmalarını ve hastalıklarını tedavi etmek için, allojenik kornea greftlerinin eksikliklerini azaltmayı amaçlayan kornea mühendisliği alanında alternatif tedavi stratejileri olarak doğal malzemeler üzerinden gidilmektedir (Ghezzi ve ark., 2015; Soh ve ark., 2017; Mahdavi ve ark., 2020). Bu uygulamalar için araştırılan yaygın doğal malzemeler arasında ipek fibroin, aljinat, jelatin, kolajen, kitosan, selüloz, hyaluronik asit (HA) ve hücresizleştirilmiş kornealar bulunur (Jameson ve ark., 2021).

2.3. Doku Yapıştırıcıları

Doku yapıştırıcılarının oküler cerrahide kullanımı 1963'te önerilmiştir (Chan ve ark., 2004). Oküler, özellikle kornea yaralarının mikrocerrahi ile dikilmesi, genellikle ameliyat sonrası astigmatizma dahil olmak üzere çok sayıda dezavantajla ilişkilidir ve cerrahın yüksek düzeyde becerisi gerekir. Sütürler ayrıca inflamasyonu tetikleyebilmekte, vaskülarizasyona yol açabilmekte ve diğer problemlerin yanı sıra mikrobiyal enfeksiyon riskini artırabilmektedir (Acheson ve ark., 1991; Chan ve ark., 2004; Bhatic, 2006; Grinstaff, 2007; Oshika ve ark., 2007).

Oküler yapıştırıcılar, sütürlere umut verici alternatiflerdir. Yapıştırıcılar, oftalmolojide yaklaşık elli yıldır kullanılmaktadır (Refojo ve ark., 1968). Bu malzemeler tipik olarak oküler yara bölgesine sıvı olarak uygulanan ve dokuları bağlamak ve tutmak için kimyasal veya fiziksel olarak çapraz bağlanan polimerlerdir. Oküler yapıştırıcılar sadece hastanın ve cerrahın sütürlerin dezavantajlarını yaşamasını engellemekle kalmaz, aynı zamanda başka türlü kolayca elde edilemeyen önemli işlevsellikler de sunabilir. Bu önemli ilave işlevselliklerden bazıları, örneğin yapışkan biyomekanik özelliklerini eşleştirme fizibilitesi gibi hastaya büyük fayda sağlayabilir. Doğal dokununkine benzer, böylece yara iyileşmesi doku hareketini sınırlamadan veya işlevini etkilemeden ilerler. Ayrıca, yapışkan malzeme, enfeksiyon ve iltihabı önleyen ve/veya doku yenilenmesini destekleyen farmakolojik veya biyolojik bileşiklerle işlevselleştirilebilir (Webster ve ark., 1968).

2.3.1. Doku Yapıştırıcılarının Yapısı ve Özellikleri

Oküler uygulamalar için kullanılacak doku yapıştırıcılarının doğal korneaya benzer fiziksel, yapısal ve fizyobiyojik özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler;

- Biyolojik olarak; biyoyouumlu mikrobiyel bariyer oluşturabilme
- Kimyasal olarak; toksik olmama, dokuya iyi yapışma, hızlı polimerizasyon
- Fiziksel olarak; ayarlanabilir mekanik özellikler, gaz ve besin maddelerine karşı geçirgenlik
- Pratik olarak; kolay ve hızlı uygulanabilir, hasta için rahatlatıcılık

Kornea onarımı ve rejenerasyonu için ideal bir biyomateryalin; biyoyouumlu, biyobozunur, mekaniksel olarak dayanıklı, uygun oranda sert, yüksek oranda şeffaf, doğal dokuya yüksek oranda yapışma, hücre desteği ve endojen doku rejenerasyonu gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir (188).

2.3.2. Doku Yapıştırıcısı Olarak Kullanılan Biyomalzemeler

Tarihsel olarak, ticari siyanoakrilat bazlı çok amaçlı yapıştırıcılar, oftalmik uygulamada kullanılan ilk yapıştırıcılardır (Ferry ve ark., 1971). Bu yapıştırıcılar hızlı ve kolay yara kapatma sağlarlar, ancak göz için sitotoksiktirler , pürüzlü bir dokuya sahiptirler, bir 'bandaj' kontakt lens kullanımını gerektirirler ve merkezi korneaya uygulandığında veya alttaki dokular tarafından muayene edildiğinde iyi görmeyi engellerler. Kolajen bazlı yapıştırıcılar ise, siyanoakrilata çok daha biyoyouumlu bir alternatiftir. Bununla birlikte, düşük mekanik stabiliteye ve yapışma mukavemetine sahiptirler. Biyomalzeme mühendisliğindeki yeni stratejiler, daha gelişmiş oküler yapıştırıcıların oluşumuna yol açmıştır (Ferry ve ark., 1971). Bu yapıştırıcılar, doğal oküler dokunun fiziksel özelliklerine uyması ve yapışma güçlerini ayarlaması için sentetik veya doğal polimerlerden tasarlanabilir. Bu tasarım çok yönlülüğü, doku hareketini ve işlevlerini engellemeden yaraları kapatabilen etkili oküler yapıştırıcıların ve dolgu macunlarının geliştirilmesine olanak tanır.

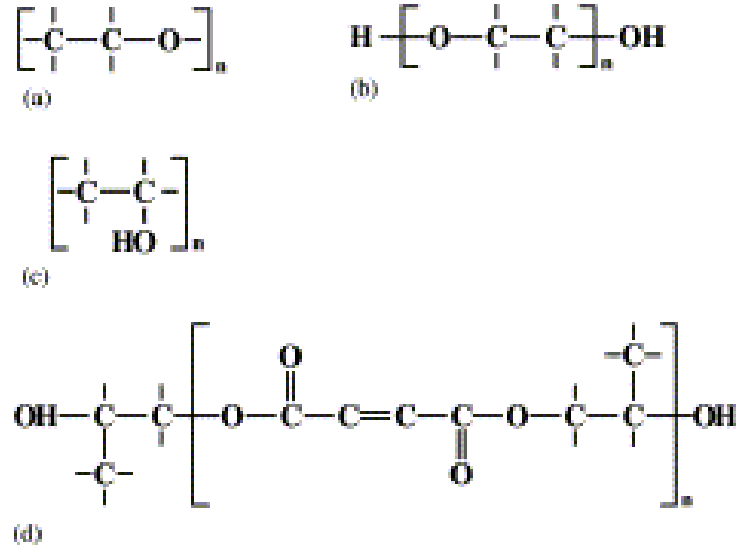
Doku mühendisliği yapı iskeleleri için hidrojel oluşturmak üzere çeşitli sentetik ve doğal olarak türetilmiş malzemeler kullanılabilir. Sentetik malzemeler arasında poli(etilen oksit) (PEO), poli(vinil alkol) (PVA), poli(akrilik asit) (PAA), poli(propilen furmarat-ko-etilen glikol) (P(PF-ko-EG)) ve polipeptitler bulunur. Doğal olarak türetilmiş polimerler arasında agaroz, aljinat, kitosan, kolajen, fibrin, jelatin ve hyaluronik asit (HA) bulunur (Trujillo-de Santiago ve ark., 2019).

2.3.2.1. Sentetik İçerikli Oküler Yapıştırıcılar

Sentetik yapıştırıcılar, oftalmoloji de dahil olmak üzere geniş bir sağlık hizmetleri yelpazesinde sıklıkla kullanılan malzemelerdir. Bu malzemeler, kimyasal bileşimler, mekanik özellikler, doku yapışkanlığı ve bozunma kinetiğı gibi belirli oftalmik uygulamalar için gerekli bir dizi özellik için yüksek ayarlanabilirlik özelliğlerine sahiptir. Ayrıca, sentetik yapıştırıcılar, üretim kolaylığı, yüksek saflık ve düşük maliyet açısından ek faydalar sunar. Kullanılan en yaygın yapıştırıcılar sentetik yapıştırıcılardır (Trujillo-de Santiago ve ark., 2019).

Sentetik içerikli hidrojeller, kimyaları ve özellikleri kontrol edilebilir ve tekrarlanabilir olduğı için doku mühendisliğı için ilgi çekicidir. Örneğın, sentetik polimerler, spesifik molekül ağırlıkları, blok yapıları, biyobozunabilir yapıları ve çapraz bağlama noktaları ile yeniden tasarlanabilir şekilde üretilebilir. Bu özellikleri; jel oluşum dinamiklerini, çapraz bağlanma yoğunluğunu ve malzeme mekanik ve bozunma özelliklerini belirler (Cruise ve ark., 1998).

PEO, birçok tıbbi uygulama için FDA onaylıdır ve doku mühendisliğı için yaygın olarak uygulanan sentetik polimerlerden biridir. PEO ve kimyasal olarak benzer poli(etilen glikol) (PEG), polimerin her bir ucunu akrilatlar veya metakrilatlar ile modifiye ederek foto-çapraz bağlanabilen hidrofilik polimerlerdir (Cruise ve ark., 1998; West ve ark., 1999; Mann ve ark., 2001). Hidrojel yapısı modifiye edilmiş PEO veya PEG'in uygun bir foto-başılatıcı varlığında ışığla maruz kalması yoluyla çapraz bağlandığında oluşur (Bryant ve ark., 2001). PEG, PEO ve poli(L-laktik asit) (PLLA) blok kopolimerlerinden termal olarak tersine çevrilebilir hidrojeller oluşturulabilmektedir (Jeong ve ark., 1997). Termal olarak tersine çevrilebilir hidrojellere ek olarak, hidrolitik olarak bozunabilir poli(laktik asit) (PLA) örnek olarak verilebilir (Cascone ve ark., 1995). Oligopeptitlerin enzime özgü bölünme dizilerini içeren blok kopolimerlerin sentezlenmesiyle bozunabilir PEO ve PEG hidrojelleri de oluşturulabilmektedir (West ve ark., 1999; Mann ve ark., 2001).



Şekil 2.4 Sentetik hidrojel oluşturan polimerlerin yapısı : (a) PEO, (b) PEG, (c) PVA (%100 hidrolize) ve (d) PPF.

Özellikle ilaç salım uygulamalarında kullanım için yaygın olarak araştırılan başka bir sentetik hidrofilik polimer PVA'dır. Sulu polimer çözeltilerinin tekrarlanan donma-çözülme döngüleri (Cascone ve ark., 1995). ile fiziksel olarak çapraz bağlanabilir veya hidrojeller oluşturmak için glutaraldehit (Nuttelman ve ark., 2001), süksinil klorür, adipoil klorür ve sebakoil klorür ile kimyasal olarak çapraz bağlanabilmektedir. Ayrıca diğer suda çözünür polimerlerle karıştırılabilmekte ve fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağlanabilmektedir (Cascone ve ark., 1995; Cauch-Rodriguez ve ark., 1996; Cauch-Rodriguez ve ark., 2001).

Poli(propilen fumarat) (PPF), ester bağlantısının hidrolizi ile bozunmaya uğrayan hidrofobik lineer bir polyesterdir (Şekil 1.4). Hidrofilik PEG ile bir blok kopolimer olarak sentezlendiğinde ve kimyasal olarak (Suggs ve ark., 1999) veya UV'ye maruz kalma yoluyla (Procopio ve ark., 2022) çapraz bağlandığında hidrojel yapısı oluşturabilmektedir.

2.3.2.1.1. Siyanoakrilat Esaslı Oküler Yapıştırıcılar

"Süper yapıştırıcılar" olarak da bilinen siyanoakrilat bazlı yapıştırıcılar, biyomedikal uygulamaların yanı sıra çeşitli endüstriyel, tıbbi ve evsel kullanımları olan güçlü, hızlı etkili kullanılan sentetik, çok amaçlı doku yapıştırıcılarıdır (Mehdizadeh ve ark., 2013). Göz ameliyatlarında, göz doktorları tarafından göz yaralarını kapatmak için siyanoakrilat bazlı yapıştırıcılar kullanılır. Klinik oftalmik kullanım için FDA tarafından onaylanmasalar da

(Trott,1997), bu yapıştırıcılar bazı ülkelerde katarakt yara onarımı gibi çeşitli uygulamalar için kullanılır (Shigemitsu ve ark., 1997). Siyanoakrilat bazlı yapıştırıcılar oküler yaraların hızlı, etkili ve kolay tedavisini sunsa da, hastaya rahatsızlık verme, sitotoksosite gibi çeşitli dezavantajları vardır.

Siyanoakrilatlar, a-siyanoakrilik asidin monomerik alkil esterleridir ve bir katalizör yardımıyla alkil siyanoasetat ve formaldehit arasındaki bir yoğunlaştırma reaksiyonu yoluyla kolaylıkla hazırlanabilir (Vauthier ve ark., 2003). Genel olarak, siyanoakrilatlar, bir anyonik veya zwitteriyonik mekanizma yoluyla ilerleyebilen polimerizasyon reaksiyonlarına katılma konusunda yüksek bir eğilime sahiptir. Bu reaksiyonlar, canlı dokularda bulunan alkoller, su veya amino asitlerin nükleofilik saldırısıyla başlar ve daha sonra alkil metakrilat polimerleri oluşturmak üzere ilerler (Leonard ve ark., 1966). Uygun biyomekanik özellikler ve hızlı polimerizasyon (yani 10-60 saniye içinde) ile birlikte bu tür güçlü bağlanma, siyanoakrilatları farklı tıbbi uygulamalar için çekici hale getirmiştir (Rana ve ark., 2013).

Bununla birlikte siyanoakrilat kullanımı; ısı oluşumu, hızlı polimerizasyon ve sitotoksositeye neden olması dolayısıyla oftalmik uygulamalar için kullanımı sınırlıdır. Siyanoakrilatın hızlı polimerizasyon hızı, bu yapıştırıcının hem lehinde hem de aleyhinde çalışan bir özelliktir. Hızlı polimerizasyon, kapama sürecini zaman açısından verimli hale getirirken ve hastanın rahatsızlığını en aza indirirken, aynı zamanda hekim için uygulamasını da zorlaştırmaktadır. Örneğin, kornea perforasyon sızdırmazlığında, doku yüzeyinin nemini kontrol etmek ve dokuyu etkili bir şekilde tutmak için ince ve eşit bir siyanoakrilat tabakasının yerinde polimerize olması için uygun bir siyanoakrilat dozunu hızla uygulamak önemlidir. Bu zorluklar göz önüne alındığında, belirli bir müdahalede siyanoakrilat bazlı yapıştırıcıların uygulanması için uygun tekniğin seçimi, başarılı bir klinik sonuç için kritik hale gelebilir (Ciapetti ve ark., 1994).

Sitotoksosite, siyanoakrilat yapıştırıcıların bir başka önemli dezavantajıdır (Chen ve ark., 2007). Yapışkanların, dokularda birikebilen ve akut ve kronik inflamasyonu indükleyebilen siyanoasetat ve formaldehite hızla bozunmasından kaynaklanır. Siyanoakrilat esterlerin n-bütül, n-heptil, metoksipropil ve oktil

siyanoakrilatlar gibi çeşitli türevleri, sitotoksisiteyi azaltmak ve polimerizasyon oranını düşürmek için geliştirilmiştir (Refojo ve ark., 1969). Genel olarak, daha kısa alkil zincirlerine sahip siyanoakrilatlar daha yüksek reaktivite ve daha hızlı bozulma hızı göstermektedir. Daha uzun alkil zincirlerine sahip siyanoakrilatlar, emsallerine göre dokular üzerinde daha ciddi toksik etkilere neden olmaktadır. Ayrıca, siyanoakrilat yapıştırıcıların doku bağlama kuvvetlerinin, yan zincirlerin uzunlukları ile ters orantılı olduğu bildirilmiştir. Örneğin, butil siyanoakrilat, oktil siyanoakrilattan daha güçlü bağlanmaya sahiptir (Cavanaugh ve ark., 1991).

Özetle, avantajlarına (yani, oküler yaralanmaların hızlı, kolay ve etkili tedavisi) ve oftalmik uygulamalarda sıklıkla endikasyon dışı kullanımlarına rağmen, siyanoakrilatların kullanımı enfeksiyon, kornea endotelyal polimerizasyonu, granümatöz keratit, dakriyosistit ve semblefaron oluşumu gibi birçok eksiklikleri nedeniyle engellenmiştir (Kaufman ve ark., 2003). Ek olarak, siyanoakrilatların biyolojik olarak parçalanamayan doğası; inflamatuvar yanıtlara, yabancı cisim reaksiyonlarına, doku nekrozuna ve korneal neovaskülarizasyona yol açabilmektedir. Ayrıca, siyanoakrilatların oftalmik ameliyatlarda uygulanması, katılaşmış yapıştırıcıların katı, esnek olmayan, sıvı ve metabolitleri geçirmeyen ve dolayısıyla yabancı bir cisim olarak kalan doğası nedeniyle sınırlıdır. Ek olarak, biyolojik olarak emilemeyen yapısı şeffaflığın olmaması ve pürüzlü yüzeyi, alttaki dokunun iyileşmesini sınırlamakta, görüşü engellemekte ve göz kırpması sırasında rahatsızlığa neden olmaktadır (Sanborn ve ark., 2002). Siyanoakrilatların modifikasyonuna yönelik devam eden çalışmalar, oftalmolojideki uygulamalarıyla ilişkili yan etkileri hafifletmeleri üzerinedir.

2.3.2.1.2. Polietilen Glikol (PEG) Esaslı Oküler Yapıştırıcılar

PEG ve türevleri, hem polar olmayan hem de polar çözücülerde iyi çözünürlük, zehirlilik önleyici özellikler, toksik olmama ve düşük immünojenisite gibi dikkate değer avantajları nedeniyle sıklıkla biyomedikal uygulamalar için kullanılır. Ek olarak, PEG omurgası çok çeşitli kimyasal modifikasyonlar için uygun olup, bu özelliği PEG'i çok yönlü hale getirmektedir (Kohane ve ark., 2008). Örneğin, PEG bazlı hidrojel, diğerlerinin yanı sıra biyoaktivitelerini, biyobozunurluklarını ve mekanik özelliklerini ayarlamak için biyokimyasal ipuçlarıyla işlevselleştirilmiştir.

Bu çok yönlülük, PEG'i oküler yapıştırıcılar için çekici bir malzeme yapar (Bahney ve ark., 2011).

Oftalmolojik kullanım için PEG bazlı hidrojel yapıştırıcılar üretmek için alternatif stratejiler bildirilmiştir. Bu hidrojeller genellikle lineer PEG'in zincir uçlarının akrilat, metakrilat veya serbest radikal polimerizasyonuna (örneğin poli (etilen glikol) diakrilat (PEGDA) tabi olan diğer gruplarla işlevselleştirilmesiyle üretilir (Mazzoccoli ve ark., 2010).

PEG bazlı hidrojellerin mekanik ve biyolojik performansı;, polimer konsantrasyonu, PEG omurgasının molekül ağırlığı ve çapraz bağlama gibi fizikokimyasal özellikleri değiştirilerek ayarlanabilmektedir. Örneğin, ön-polimer konsantrasyonu; hidrojin mekanik özellikleri üzerinde ve hidrojelde kapsüllenmiş hücrelerin canlılığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Artan prepolimer konsantrasyonu, daha yüksek bir sıkıştırma modülüne neden olmaktadır, Ancak bu sonuç, 3B matriste hücre canlılığını ve proliferasyonunu sınırlayabilmektedir (Yanez-Soto ve ark., 2013). PEG polimerinin molekül ağırlığı, PEG bazlı hidrojellerin mekanik özelliklerini ve şişme davranışlarını etkileyebilir. PEG hidrojellerinin fiziksel özelliklerinin ayarlanabilirliği, oftalmolojide kullanılmak üzere PEG bazlı yapıştırıcıların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Alvarez-Lorenzo ve ark., 2006).

PEG bazlı hidrojellerin, hücrelerin spesifik olmayan bağlanmasını engellediği bilinmektedir. Bununla birlikte, peptit hücre bağlama motiflerini dahil etmek için kimyasal modifikasyon yoluyla PEG bazlı hidrojeller ile geliştirilmiş hücresel etkileşim elde edilebilir (Voit ve ark., 2009).

PEG-SPA'dan yapılan hidrojeller üstün mekanik özelliklere ve stabiliteye (birkaç aya kadar) sahip olsa da, histolojik değerlendirme bu yapıştırıcıların tavşan gözlerine uygulandığında ciddi hasara neden olabileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca, yapışkanla tedavi edilen gözler, sütürle tedavi edilen göze kıyasla tüm yara modellerinde daha yüksek sızıntı basıncını tolere etmiştir. Bu sonuç, bu yapışkanların başarılı göz yarası kapatma potansiyeli olduğunu düşündürür (Mrgalit ve ark., 2000).

2.3.2.1.3. Dendrimer Esaslı Oküler Yapıştırıcılar

Dendrimerler; yüksek dallı yapıları ve polimerizasyon dereceleri, fonksiyonel grupların yerleştirilebileceği boşlukları ile tanımlanan makromolekül sınıfıdır. Dendrimerler oldukça düzenli, dallanmış polimerik moleküllerdir. Biyomedikal uygulamalar için uygun materyallerdir. Dendrimer yapısı, birbirini izleyen monomer katmanlarının kimyasal olarak birbirlerine bağlanmasıyla sentezlenebilmektedir (Gao ve ark., 2004). Dendrimerler, lizin, valin ve lösin gibi amino asitler, şekerler, a-hidroksi asitler, yağ asitleri ve sitrik asit, fumarik asit gibi metabolik ara maddeler dahil olmak üzere doğal metabolik bileşiklerden sentezlenebilmektedir (Yemul ve ark., 2008).

Dendrimerler, oküler uygulamalar için yapışkan hidrojeller oluşturmak üzere çapraz bağlayıcı ajanlar olarak kullanılabilir. Dendrimer bazlı yapıştırıcılar, oftalmik sızdırmazlık ürünleri olarak umut vaat eden bileşiklerdir. Bu aşırı dallı bileşikler, geniş bir uygulama yelpazesi için uyarlanabilmektedir. Doku iyileşmesini desteklemek üzere farklı bileşiklerin (örneğin antibiyotikler, büyüme faktörleri ve kimyasal haberciler) kontrollü salınımı için tasarlanabilir. Dendrimerlerin karmaşık yapısı ve yüksek maliyeti, klinik ortamda uygulamalarını engelleyen en önemli engeldir. Bu tür karmaşık dendritik materyalleri sentezlemenin yüksek maliyetinin yanı sıra, iki bileşenin karıştırılması kısa sürede hızlı kovalent ağ oluşumuna yol açabileceğinden, bu yapıştırıcıların hasarlı göz dokusuna manipülasyonu ameliyat sırasında zorluk çıkarabilir (Valencia ve ark., 2015).

2.3.2.2. Doğal İçerikli Oküler Yapıştırıcılar

Oküler dokuları onarmak için protein bazlı materyallerin kullanımı son zamanlarda büyük ilgi görmüştür. Şimdiye kadar, fibrin, kolajen, jelatin ve ipek gibi çeşitli doğal proteinler, oküler yaraları onarmak veya kapatmak amacıyla incelenmiştir. Bu malzemelerin bazıları doku yapıştırıcıları olarak kullanım için FDA onayı almıştır (ancak özel olarak oftalmolojik kullanım için değildir) ve bazıları, özellikle fibrin türevli ürünler, ticari ürünler haline gelmiştir (Applegate ve ark., 2016).

Doğal olarak türetilen hidrojel oluşturu polimerler, doğal ECM'nin bileşenleri oldukları veya doğal ECM'ye benzer makromoleküler özelliklere sahip oldukları için doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Örneğin, kolajenler memeli dokusu ECM'sinin ana proteinidir. Benzer şekilde HA, yetişkin hayvanların

tüm dokularında değişen miktarlarda bulunur. HA gibi hem aljinat hem de kitosan hidrofilik, lineer polisakkaritlerdir. Ayrıca *in vivo* olarak uygun bir şekilde etkileşime girdikleri gösterilmiştir ve bu nedenle doku mühendisliği uygulamaları için hidrojel temelli doku iskelesi olarak kullanılmaktadır (Suh ve ark., 2000).

Kolajen, memeli dokularında en bol bulunan protein ve doğal ECM'nin ana bileşeni olduğu için biyomedikal uygulamalar için ilgi çekici bir malzemedir. En az 19 farklı kolajen türü vardır. Kolajenin temel yapısı, üç iplikli bir ip yapısı oluşturmak üzere birbirinin etrafına sarılan üç polipeptit zincirinden oluşur. Teller hem hidrojen hem de kovalent bağlarla bir arada tutulur. Kolajen iplikleri, stabil lifler oluşturmak için kendi kendine toplanabilir. Ek olarak, çeşitli kimyasal çapraz bağlayıcılar (glutaraldehit, formaldehit ve karbodiimid gibi) dahil edilerek kolajen lifleri ve yapı iskeleleri oluşturulabilmekte ve fiziksel işlemlerle (UV ışıması, dondurarak kurutma ve ısıtma gibi) çapraz bağlayarak veya diğer polimerlerle (HA, kitosan, PLA, PGA, PLGA ve PEO gibi) karıştırarak mekanik özellikleri iyileştirilebilmektedir. Kolajen, özellikle kolajenaz ve serin proteazlar tarafından doğal olarak bozunur, böylelikle yapısı dokuda bulunan hücreler tarafından lokal olarak kontrol edilebilmektedir (Lee ve ark., 2001).

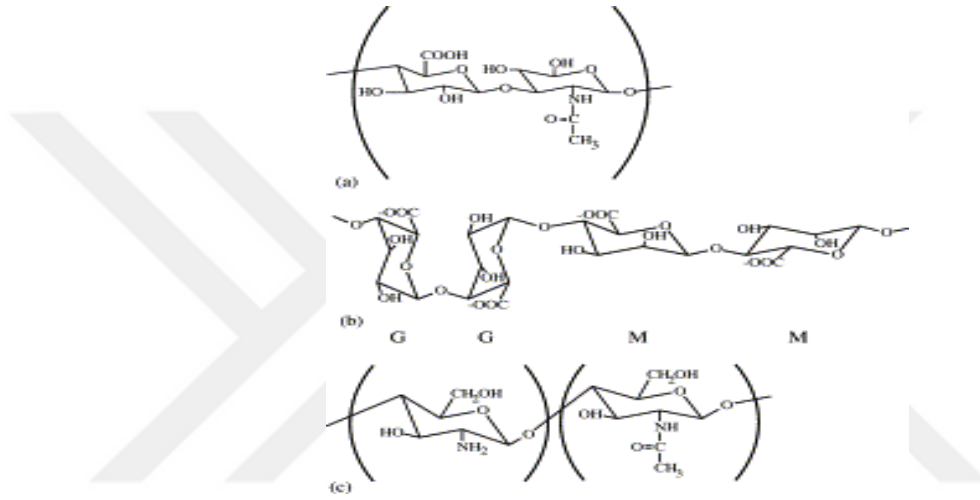
Kolajen ayrıca kornea stromasında doğal olarak bulunur. Korneaya şeffaflık ve mekanik dayanıklılık dahil olmak üzere çok önemli fonksiyonel özellikler kazandırır (Meek ve ark., 2004).

Endojen kornea kollajeninin doğal kimyasal özellikleri, korneanın bir koni şeklinde şişmesi olarak ilerleyen bir göz hastalığı olan keratokonusu düzeltmek için kullanılmaktadır. 90'ların başından beri çok sayıda çalışmada, riboflavin ve UV-A ışığı kullanılarak korneada bulunan kolajenin çapraz bağlanmasını indüklemek için farklı stratejiler tanımlanmıştır. Bu genel yaklaşımların biyogüvenliği doğrulanmıştır (Spoerl ve ark., 1998; Coskunseven ve ark., 2009).

HA, en basit glikozaminoglikandır (GAG) ve hemen hemen her memeli dokusunda ve sıvısında bulunur (Alberts, 2008). Yara iyileşmesi sırasında ve eklemlerin sinovyal sıvısında yaygındır. HA hidrojelleri, hidrazit türevleri ile kovalent çapraz bağlanma, esterifikasyon ile oluşturulur. (1–3) ve (1–4)-bağlı β -d-glukuronik asit ve N-asetil- β -d-glukozamin birimlerinden oluşan tekrarlayan bir disakkaritten oluşan lineer bir polisakkarittir (Şekil 2.5a). Ek olarak HA, kompozit

hidrojeller oluşturmak için hem kolajen hem de aljinat ile birleştirilebilmektedir. HA, hiyalüronidaz tarafından doğal olarak parçalanır, bu da vücuttaki hücrelerin materyalin klirensini lokalize bir şekilde düzenlemesine izin vermektedir (Miralles ve ark., 2001).

İyi biyoyumluluk ve biyobozunurluğu nedeniyle HA, ilaç dağıtımı, doku mühendisliği, yara iyileşmesi ve viskoz destek alanlarında önemli uygulamalara sahiptir. HA, doku mühendisliği uygulamaları için doku yapıştırıcılarının veya iskelelerin geliştirilmesi için çekici bir malzemedir (Yang ve ark., 2010).



Şekil 2.5 Doğal olarak türetilmiş polimerlerin yapısı : (a) HA , (b) aljinat ve (c) kitosan.

Aljinat, yumuşak koşullar altında jelleştiği, düşük toksisiteye sahip olduğu ve kolayca bulunabildiği için hücre kapsülleme ve ilaç stabilizasyonu da dahil olmak üzere çeşitli tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır. (1–4)-bağlı β - d -mannuronik asit (M) ve α - l -guluronik asit (G) monomerlerinin lineer bir polisakarit kopolimeridir (Şekil 1.5b) ve esas olarak kahverengi deniz yosunu ve bakterilerden elde edilir (169). Aljinat polimeri içinde, M ve G monomerleri ya tekrar eden ya da değişen bloklar halinde sıralı olarak bulunmaktadır. Her monomerin miktarı ve dağılımı, aljinatın izole edildiği deniz yosununun türüne, konumuna ve yaşına bağlıdır (Johnson ve ark., 1997). Aljinat jel yapısı Ca^{2+} , Ba^{2+} veya Sr^{2+} gibi iki değerlikli katyonların, polimer zincirleri arasında iyonik köprüler oluşturmak için G monomer blokları ile işbirliği içinde etkileşime girdiğinde oluşur. İyonik olarak çapraz bağlanmış jellerin çapraz bağlama yoğunluğu, mekanik özellikleri ve gözenek boyutu, polimer zincirinin M'den G'ye oranı ve moleküler ağırlığı değiştirilerek kolaylıkla ayarlanabilmektedir. Jeller ayrıca standart karbodiimid kimyası kullanılarak aljinatın

adipik hidrazid ve PEG ile kovalent olarak çapraz bağlanmasıyla oluşturulabilmektedir. İyonik olarak çapraz bağlı aljinat hidrojenleri spesifik olarak bozunmazlar, fakat yavaş, kontrolsüz çözünmeye uğrarlar. Yapı, kalsiyumun iyon değişimi yoluyla bozulur, ardından zincirlerin ayrışması gerçekleşir, bu da zamanla mekanik dayanımın azalmasına neden olur (LeRoux ve ark., 1999). Hidrolitik olarak bozunabilen aljinat formları, sırasıyla oksitlenmiş aljinat ve poli(aldehit guluronat) (PAG) oluşturmak üzere aljinatın ve bir aljinat türevi olan poliguluronatın kısmi oksidasyonu ile sentezlenmektedir (Lee ve ark., 2000).

Kitosan, yapısal olarak doğal olarak oluşan GAG'lara benzediği ve insanlarda enzimler tarafından parçalanabildiği için çeşitli doku mühendisliği uygulamaları için araştırılmıştır. Kitosana türetilen (1–4)-bağlı D-glukozamin ve N -asetil-D-glukozamin kalıntılarından lineer bir polisakkaritidir (Şekil 1.5c). Eklem bacaklıların dış iskeletlerinde bulunur (Suh ve ark., 2000). N-deasetilasyonun derecesi genellikle %50 ile %90 arasında değişir. Kitosan, serbest amino gruplarını protonlayan seyreltik asitlerde çözünür . Çözündükten sonra, kitosan pH artırılarak veya çözelti bir solvent olmayan içine ekstrüde edilerek jelleştirilebilir (Tomihata ve ark., 1997). Kitosan türevleri ve karışımları ayrıca glutaraldehit ile çapraz bağlanarak, UV ışınması ile veya termal varyasyonlar yoluyla jelleştirilir. Kitosan, lizozim tarafından parçalanmaktadır ve bozunma kinetiği kristallik derecesi ile ters orantılıdır (Vårum ve ark., 1996).

2.4. Hidrojeller

Hidrojenlerin doku mühendisliği alanında birçok farklı işlevi vardır. Biyoaktif moleküller için boşluk doldurma ajanları olarak ve hücreleri organize eden ve istenen doku oluşumunu yönlendirmek için uyarı veren 3B yapılar olarak kullanılırlar. Ek olarak; biyoaktif moleküller, anjiyogenezin teşviki ve salgı hücrelerinin kapsüllenmesi dahil olmak üzere çeşitli uygulamalarda hidrojel yapı iskelelerinden yararlanılır. Hidrojel yapı iskeleleri, hücrelere nakil yapmak ve kırıkta, kemik ve düz kas dahil olmak üzere vücuttaki hemen hemen her hasarlı dokuyu rejenere için kullanılmaktadır. Hidrojeller, büyük miktarda suyu emebilen sentetik veya doğal polimerlerin 3B ağlarıdır. Farklı işleme yöntemleri ve farklı polimerler kullanarak, istenen fizyokimyasal ve biyomekanik özelliklere sahip hidrojel temelli yapı iskeleleri üretilmektedir (Drury ve ark., 2003).

Kornea doku mühendisliğindeki son gelişmelerde, hidrojel malzemeler yenilikçi şekillerde kullanmıştır. Tablo 1.2’de rapor edilen son çalışmalar, araştırmacıların taklit etmeyi amaçladığı kornea tabakasına ve kullanılan biyomateriyale göre düzenlenmiştir. Tablo 1.2 hidrojel sistemini değerlendirmek için kullanılan yöntemlerin yanı sıra, formülasyonda hücrelerin kullanılıp kullanılmadığını göstermektedir. Pek çok polimer kombinasyonu araştırılmış olup gerçekleştirilen çalışmalar kornea doku nakli geliştirmede umut vaat etmeye devam etmektedir (Ellis ve ark., 1990; Lai ve ark., 2016; Tang ve ark., 2017; Han ve ark., 2020; Yazdanpanah ve ark., 2021).

Tablo 2.2 Kornea doku mühendisliği için doğal hidrojel formülasyonlarındaki güncel çalışmaların özeti (Jameson ve ark., 2021).

Doğal içerikli oküler yapıştırıcılar	Yenilik	Araştırma modeli		
		Malzeme karakterizasyonu	In vitro olarak değerlendirilen hücreler	In vivo veya ex vivo çalışmalar
Epitel				
İpek fibroin	Organik çözücüler ve metal iyonları kullanılarak ayarlanabilir mekanik özelliklere sahip şeffaf ipek fibroin hidrojellerinin üretimi	–Mekanik özellikler –Morfoloji –Şeffaflık	–İnsan CEpC’leri –İnsan dermal fibroblast hücreleri	--
Kolajen/Jelatin/Aljinat	3B-baskı ile sodyum sitrat varlığında ayarlanabilir bozunma davranışı gösteren insan CEpC’leri yüklü yapıların üretimi	–Degradasyon –Morfoloji –Şeffaflık	–İnsan CEpC’leri	--
Kolajen	Gelişmiş esneklik özellikler için kolajen metakrilasyonu	–Degradasyon –Mekanik özellikler –Spektroskopi	–İnsan CEpC’leri –Murin CPC’leri	--
Jelatin	Ayarlanabilir mekanik, biyolojik ve bozunma özelliklerine sahip, akrilatlı jelatin ve tiyolatlı jelatinden oluşan enjekte edilebilir, ışıkla sertleştirilebilen hidrojel üretimi	–Degradasyon –Mekanik özellikler –Morfoloji –Spektroskopi –Şeffaflık	–L929 murin fibroblast hücreleri	–NZW tavşanlarında fokal kornea yaralanması

Kitosan	Stromal hücre kaynaklı faktör-1 alfa salan termosensitif kitosan-jelatin hidrojenlerinin üretimi	–Morfoloji	–Sıçan LESC’leri –Sıçan MSC’leri	–SD sıçanlarda alkali yanık yaralanması
Stroma				
İpek fibroin	Genipin çapraz bağlı PVA/ipek fibroin/nano-hidroksiapatit hidrojenlerinin üretimi	–Degradasyon –Mekanik özellikler –Morfoloji	–İnsan CF’leri	--
Kolajen	Çeşitli miktarlarda metakrilatlanmış kolajen ve sodyum aljinat içeren üç boyutlu baskılı kolajen-I bazlı biyo-mürekkep	–Mekanik özellikler –Morfoloji –Şeffaflık	–İnsan CK’leri	--
Kolajen	Biyo-ortogonal çapraz bağlı hyaluronat-kolajen hidrojel	–Degradasyon –Mekanik özellikler –Morfoloji –Şeffaflık	–İnsan CEpC’leri	–NZW tavşanlarında ön lameller keratoplasti
Kolajen	3B yazdırılabilir kolajen/agaroz	–Mekanik özellikler –Şeffaflık	–İnsan CK’leri	--
Jelatin	Jelatin/askorbik asit kriyojelleri	–Degradasyon –Mekanik özellikler –Morfoloji –Spektroskopi	–Tavşan CK’leri	–NZW tavşanlarında ön lameller keratoplasti
GelMA	Görünür ışık çapraz bağlanabilir	–Degradasyon –Mekanik özellikler	–İnsan CF’leri	–NZW tavşanlarında yarım kalınlıkta stromal defekt
GelMA	Stereolitografi kullanılarak basılmış 3B doku iskelesi	–Morfoloji –Şeffaflık	–İnsan CSC’leri	--
GelMA	PCL-PEG iskele destekli GelMA hidrojel	–Mekanik özellikler –Şeffaflık	–Sıçan LSSC’leri	–SD Sıçanlarda İntrastromal keratoplasti
GelMA	Hibrit hücreleştirilmiş GelMA ve hücreleştirilmiş sıgır kornea ECM’si	–Degradasyon –Mekanik özellikler –Spektroskopi –Şeffaflık	–Sığır CK’leri	--
GelMA	Keratositlerle kapsüllenmiş 3B-Biyobaslı ile hidrojel üretimi	–Degradasyon –Morfoloji –Spektroskopi –Şeffaflık	–İnsan CK’leri	--

			–Mekanik özellikler	
Bakteriyel selüloz	Kompozit Bakteriyel selüloz ve PVA	–Morfoloji –Şeffaflık	–İnsan CSC’leri	–NZW tavşanlarında intrastromal keratoplasti
Endotel				
GelMA	Gelişmiş tek katmanlar için nano desenleme ve hibrit çapraz bağlama	–Degradasyon –Mekanik özellikler –Morfoloji –Spektroskopi	–İnsan CEnC’leri	–NZW tavşanlarında anterior keratoplasti
HA	Endotel hücre tabakası dağıtım sistemi olarak gözenekli HA hidrojel	–Degradasyon –Morfoloji	–Tavşan CEnC’leri	–NZW tavşanlarında endotelial sıyrık yarası
poli-ε-lizin	ECM proteinleri yüzeye adsorbe edilmesi ile kornea endotel hücrelerinin genişlemesi için gözenekli hidrojel	–Mekanik özellikler –Şeffaflık –Temas açısı	–İnsan CEnC’leri (HCEC-12) –Domuz CEnC’leri	--
Tam Kalınlık				
Kolajen	Hüresizleştirilmiş domuz kornea tabakalarının ve üst yüzeye ekilmiş insan CEpC’leri ile insan CSC yüklü kolajen hidrojel üretimi	–Degradasyon –Şeffaflık	–İnsan CSC’leri –İnsan CEpC’leri	–Ex vivo domuz ön lameller keratoplasti modeli
Kolajen + Laminin	Kolajen ve laminin bazlı mürekkeplerle lazer destekli 3B-biyobaskı	–Degradasyon –Morfoloji	–İnsan LESC’leri –İnsan ASC’leri	--
Kolajen benzeri peptitler	Vücut sıcaklığında kendiliğinden jelleşen kolajen benzeri peptitler/PEG/fibrinojen hidrojel	–Mekanik özellikler –Şeffaflık	–İnsan CEpC’leri	–NZW tavşanlarında epitel perforasyonu yarası
Kolajen	Sentetik Bowman zarı ve stromal tabaka ile çift katmanlı kolajen	–Degradasyon –Mekanik özellikler –Morfoloji –Şeffaflık	–Tavşan CF’leri	–NZW tavşanlarında ön lameller keratoplasti
Kolajen	Ayarlanabilir şeffaflık, bozulma ve sertliğe sahip PEG-NHS ile çapraz bağlı in situ kolajen hidrojelleri	–Degradasyon –Mekanik özellikler –Şeffaflık	–İnsan CEpC’leri –İnsan LSSC’leri	–NZW tavşanlarında keratektomi

Hücresizleştirilmiş domuz korneası	Yerinde ısıya duyarlı hidrojel oluşturan	–Mekanik özellikler –Morfoloji –Şeffaflık	–İnsan CEpC’leri –İnsan MSC’leri	--
---	--	---	-------------------------------------	----

2.4.1. İpek Fibroin Bazlı Hidrojeller

İpek fibroin, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan genellikle Bombyx mori ipek kozalarından izole edilen doğal bir biyopolimerdir.. İpek böceğinden izole edildiğinde, ipek fibroin proteini, ağır ve hafif zincirler olarak adlandırılan iki büyük biyopolimerden oluşur. İpek peptitleri veya ipek fibroin proteininin küçük kısımları, bir laboratuvarındaki bir biyoreaktörde *Escherichia coli* (*E. Coli*) veya diğer organizmalar tarafından genetik olarak tasarlanabilir ve üretilir. Bu ipek peptitleri genellikle örümcek ipeğinden gelen dizileri taklit eder ve diğer peptit dizileriyle birleştirilebilir (Xia ve ark., 2011; Wang ve ark., 2014; Huang ve ark., 2015; Koivusalo ve ark., 2018). Rejenere ipek fibroin proteini (Rockwood ve ark., 2011) hidrojel oluşturmak için kullanılabilir (Rockwood ve ark., 2011; Partlow ve ark., 2014) veya rekombinant olarak üretilen peptitlerden oluşturulabilir (Applegate ve ark., 2016; Huang ve ark., 2016). Rejenere ipek fibroin, protein omurgası üzerindeki doğal veya zenginleştirilmiş karboksilik ve amid gruplarının modifikasyonu yoluyla işlevselliği arttırmak için modifiye edilebilir (Ibáñez-Fonseca ve ark., 2020) ve amino asit birleştirme reaksiyonları yoluyla hidrojel oluşturulabilir (Stoppel ve ark., 2017). Kornea epitelini taklit edecek şekilde tasarlandıklarında (Raia ve ark., 2017), ipek fibroin bazlı hidrojeller, ipek nano-yapılarında bulunan metal iyonlarının miktarını modüle ederek şeffaflığını korumaktadır (Raia ve ark., 2017). Stromayı taklit etmek için formüle edildiğinde ipek fibroin, genipin çapraz bağlı PVA ve nanokristal hidroksiapatitten oluşturulan kompozit hidrojeller, genipin çapraz bağlanması olmayan hidrojellere kıyasla hidrojel ağının yapısal bütünlüğünü iyileştirirken, aynı zamanda insan kornea fibroblast canlılığını da korumaktadır (Mitropoulos ve ark., 2015). Şeffaf ipek hidrojelleri üretilirken, rejenere ipek hidrojelleri içinde nanokristalin alanların yavaş oluşumu bu malzemelerin şeffaflığını ve mekanik özelliklerini değiştirmektedir (Zhou ve ark., 2019).

İpek fibroin bazlı biyomalzemeler, modifikasyona yatkınlıkları, olağanüstü şeffaflıkları, mekanik mukavemetleri ve biyolojik olarak parçalanabilmeleri nedeniyle

çok sayıda doku mühendisliği uygulaması için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ve bu da onu kornea rejeneratif uygulamalar için çekici bir materyal haline getirmektedir (Tabatabai ve ark., 2015).

2.4.2. Jelatin ve GelMA Bazlı Hidrojeller

İkincil yapıya sahip sarmal tip I kolajene bir alternatif, jelatin veya metakrile jelatin (GelMA) kullanımındır (Raia ve ark., 2020). Denatüre ve hidrolize bir kolajen formu olan jelatin ve metakrile formu olan GelMA biyouyumlu bir materyal olup ayarlanabilir mekanik özellikler, düşük maliyet, işleme kolaylığı ve şeffaflık nedeniyle birçok doku mühendisliği uygulamasında geniş uygulanabilirlik göstermektedir (Kilic ve ark., 2018). Bu özellikler onları oküler uygulamalar için ilgi çekici bir biyomateryal haline getirmektedir. Askorbik asit içeren jelatin krijojeller askorbik asit konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak ayarlanabilir mekanik özellikler göstermektedir (Li ve ark., 2018). Elastik modül, stromal dokunun özellikleriyle yakından eşleşmektedir. Bununla birlikte, jelatin krijojelin askorbik asidin dahil edilmesi, krijojelin gözenek boyutunu ve gözenekliliğini arttırmaktadır. Bu sonucun askorbik asit tarafından EDC çapraz bağlanmasını kesintiye uğratmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Li ve ark., 2018).

Jelatin metakrilasyonu, görünür ışık ve fotobaşlatıcı varlığında foto çapraz bağlama,; çapraz bağlama yoğunluğu ve hidrojel gözenekliliği üzerinde kontrol sağlayabilmektedir (Luo ve ark., 2018). Elastik modül değeri, polimer konsantrasyonu ve ışığa maruz kalma süresi değiştirilerek veya hem fiziksel çapraz bağlama hem de UV çapraz bağlama dahil olmak üzere çapraz bağlama stratejilerinin bir kombinasyonu kullanılarak 1.1 – 220 kPa arasında değiştirilebilmektedir (Bektas ve ark., 2020). Hem fiziksel çapraz bağlama hem de UV çapraz bağlamanın kullanılması, GelMA imalat işlemine bir soğutma aşamasının eklenmesinin, normal GelMA hidrojellerine kıyasla mekanik mukavemette 8 kat artışa sahip ek çapraz bağlamayı kolaylaştırdığını göstermiştir (Bektas ve ark., 2020). Ek deneyler, GelMA'nın mekanik sertliğinin, 10-40C°'den itibaren bir sıcaklıkta azalmadığını ve hibrit çapraz bağlı GelMA hidrojellerinin biyolojik bozunma hızının, yalnızca UV çapraz bağlı GelMA hidrojellerine kıyasla daha yavaş olduğunu doğrulamaktadır (Bektas ve ark., 2020). Bununla birlikte, bu çapraz bağlama yöntemi, bozulma hızının ayarlanabileceğini, kornea yaralanmasının veya hastalığının iyileşme kaskadı ile eşleşmek için çekici bir özellik olduğunu göstermiştir. 3B yazdırılabilir GelMA bazlı

hidrojel, kornea stroma dokularını etkili bir şekilde taklit etmek için uygundur (Uyanıklar ve ark., 2019). GelMA/HEMA kompozit hidrojellerinin kullanımı aynı zamanda kornea stroma dokularını taklit ederek mekanik özellikler ve mekanik performans üzerinde daha fazla kontrol sağlamaktadır (Rose ve ark., 2014). HEA'nın kontakt lenslerde ve diğer oküler uygulamalarda kullanım eski yıllara dayanmaktadır (Zhu ve ark., 2019). GelMA hidrojellerine HEMA eklenmesi, hidrojel şeffaflığını korurken sıkıştırma modülünü ~155 kPa değerine yükseltmektedir. Ayrıca, Kolajenaz tip II varlığında GelMA/HEMA hidrojeli üzerinde yapılan bozunma deneyleri, stabilitenin 10 U/mL'lik bir enzim konsantrasyonunda belirli bir süre muhafaza edildiğini göstermiştir (Rose ve ark., 2014).



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kimyasal Malzemeler

- %0,05 Tripsin-(Tripsin-EDTA), Bioindustrial Engineering
- 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT), Invitrogen
- '4',6-Diamidino -2-fenilindol dihidroklorür (DAPI), Sigma&Aldrich
- Alexa Flour 488594, Thermo Fisher
- Bovin serum albumin (BSA), Sigma&Aldrich
- DMEM F-12, Capricorn
- Paraformaldehit (PFA), Sigma&Aldrich
- Dimetilsülfoksit (DMSO), Sigma
- Tripan mavisi (Biological Industries, İsrail)
- Etanol, Tekkim
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu, Gibco
- Fosfat tuz tamponu (PBS), PAN-Biotech
- Lityum bromür (LiBr), Sigma&Aldrich
- Triton X-100, Biofroxx
- Tween-20, Sigma&Aldrich
- PrestoBlue, Invitrogen

3.2. Sarf Malzemeler

- 10-200-1000 µl'lik pipet uçları, Isolab
- 175 cm² 'lik kültür kabı, Nest
- 5 ml ve 10 ml hacimlerinde enjektörler, Set inject
- 6, 12, 24, 48 ve 96 kuyulu kültür kapları, TPP
- 75 cm² 'lik kültür kabı, Nest
- Diyaliz membran, Sigma&Aldrich,
- Kriyoviyal, Nest
- Lam SuperFrost Menzel, Thermo Scientific Mikroskop lamı, Nest
- Lamel SuperFrost Menzel, Thermo Scientific
- Steril santrifüj tüpleri (15-50 ml), Isolab
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), MilliporeSigma
- Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA

3.3. Hücre Hatları

Tez kapsamında ATCC ‘den temin edilen insan kornea fibroblast hücre hattı (hCFC) kullanılmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan hücrelerin pasaj numaraları P10-P12 ‘tir.

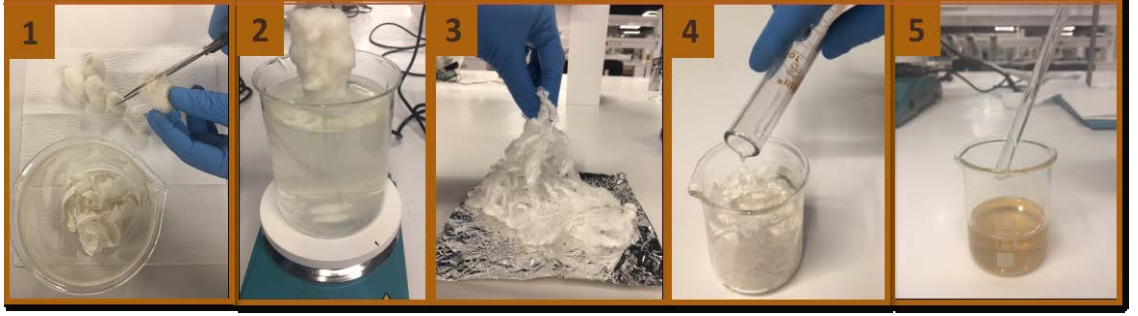
3.4. Kullanılan Cihazlar

- Buzdolabı, Panasonic
- Etüv, Nüve FN055
- Floresans mikroskopu, Zeiss Axio
- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D
- Hücre kültürü inkübatörü (CO₂ inkübatörü), Panasonic
- Inverted mikroskop, Nikon, Japonya
- Liyofilizatör, Christ, Alpha 1-2 LSPLUS
- Manyetik karıştırıcı, Jeitech
- Mikropipet, Rainin
- Mikroplaka okuyucu, Spektrostar Nano, BMG Labtech
- Otoklav, Nüve, OT120M
- Santrifüj, Hitachi, Japonya
- Spektrofluorometre, Jasco, FP 8300
- Steril kabin, Telstar
- Mor ışık kaynağı, VALO Dental Curing System

3.5. İpek Fibroin İzolasyonu

İpek kozalarından ipek fibroin izolasyonu literatürde açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir (Rockwood ve ark., 2000). İlk olarak ipek böceği kozaları bir makas yardımıyla küçük parçalara kesilmiş, 0,02 M Na₂CO₃ çözeltisinde yarım saat kaynatılmıştır. Elde edilen ürün distile su ile 3 kez yıkanmıştır. Takiben fazla suyu sıkılarak uzaklaştırıldıktan sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen ürün bir behere alınmış, üzerine LiBr çözeltisi ilave edilmiş, 60°C’de 4 saat inkübe edilmiştir. Böylelikle ipek fibroinin çözünmesi sağlanmıştır (Şekil 2.1). Elde edilen çözeltisi diyaliz membranına (MWCO=12000 Da) alınarak destile suya karşı bir hafta boyunca diyaliz edilmiştir. Bu süre sonunda diyaliz membranının içerisindeki ipek

fibroin çözeltisi santrifüj tüplerine alınarak iki kere santrifüj edilmiş ve 4°C’de saklanmıştır.



Şekil 3.1. İpek fibroin sentez adımları.

3.6. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Hazırlanması

İpek fibroin temelli doku yapıştırıcısı üretimi için mor ışık kaynağı (VALO dental curing system) kullanılmıştır. Optimum ipek fibroin temelli doku yapıştırıcısı üretim şartlarının belirlenmesi kapsamında, farklı konsantrasyonlarda ipek fibroin polimer çözeltileri (ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5) ve farklı ışıma sürelerinde (1 dakika, 2 dakika ve 4 dakika) doku yapıştırıcıları hazırlanmıştır. Foto-başlatıcı olarak Riboflavin/Sodyum persulfat çifti kullanılmıştır. Hidrojel temelli ipek fibroin doku yapıştırıcıları molding tekniği ile sentezlenmiştir. Formülasyonlar mikropipet yardımıyla 100µl polimer çözeltisi alınarak 1 mm aralayıcıyla ayrılmış iki cam slayt arasına pipetlenmiştir. Daha sonra polimer karışımı 2.5 mW/cm² güçte belirli süreler boyunca mor ışığa maruz bırakılarak doku yapıştırıcıları hazırlanmıştır. Bu kapsamda, 9 farklı doku yapıştırıcı formülasyonunu hazırlanmıştır. Tez kapsamında, ipek fibroin konsantrasyonunun ve ışıma süresinin doku yapıştırıcılarının özellikleri üzerine etkisi araştırılmıştır.

3.7. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Yapısal Karakterizasyonu

Bölüm 2.6 ‘da detaylıca açıklandığı şekilde hazırlanan ipek fibroin temelli doku yapıştırıcılarının yapısı FTIR analizi ile karakterize edilmiştir. FTIR analizleri 400-4000 cm⁻¹ aralığında gerçekleştirilmiştir.

3.8. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının In vitro Şişme ve Degradasyon Testleri

Geliştirilen ipek fibroin temelli doku yapıştırıcılarının *in vitro* şişme testleri şartlarda 48 saat boyunca (jellerin dengeye ulaştığı süre) 37°C’de PBS ortamında gerçekleştirilmiştir. İlk olarak örnekler tartılmış (W_0), takiben belirli bir hacimde şişme ortamlarına daldırılarak, 48 saatlik sürenin sonunda şişme ortamından uzaklaştırılmış, fazla suyu alındıktan sonra tekrar tartılmış (W_t) ve şişme oranları (W_t/W_0) hesaplanmıştır (Tutar ve ark., 2022). En az 3 tekrarlı çalışılmıştır.

Geliştirilen ipek fibroin temelli doku yapıştırıcılarının *in vitro* degradasyon testleri 3 haftalık süre boyunca 37°C’de PBS (pH=7,4) ve yapay göz yaşı (6,78 g/l NaCl; 2,18 g/l NaHCO₃; 1,38 g/l KCl; 0,084 g/l CaCl₂·2H₂O; pH=8) at 37°C) ortamlarında gerçekleştirilmiştir (Raeisan ve ark., 2021). İlk olarak, örnekler tartılmış (W_0) ve belirli hacimdeki degradasyon ortamlarına daldırılmış, 3 haftalık süre sonunda degradasyon ortamlarından uzaklaştırılmıştır. Takiben -20°C’de dondurulmuş ve liyofilize edilerek kurutulmuştur ve örnekler tekrar tartılmıştır (W_t). %Degradasyon hızları $100 - [W_t \cdot 100 / W_0]$ formülü ile hesaplanmıştır. En az 3 tekrarlı çalışılmıştır.

3.9. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Mekaniksel Dayanım Testleri

Geliştirilen ipek fibroin temelli doku yapıştırıcıları distile su ortamında şişirildikten sonra silindirik ebatlarda olması için 5 mm çaplı biopsy punch ile delinmiştir. Analizler İstinye Üniversitesi’nde bulunan Texture Analyser cihazı (TA.XTPlus) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 10kg load-cell kullanılmıştır. Örnekler cihazın iki sıkıştırma plakası arasına yerleştirilerek 1 mm/dk’lık bir yer değiştirme hızında sıkıştırılmıştır. Tüm analizlerde dört tekrarlı çalışılmıştır (Shin ve ark., 2013).

3.10. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Patlama Basıncı Testleri

3.10.1. In vitro Patlama Basıncı Testi

Örneklerin ayrılma mukavemeti testleri ASTM F2392-04 standartlarına göre (Standart Test Method for Burst Strenght of Surgical Sealants) gerçekleştirilmiştir (Shirzaei ve ark., 2019). Patlama basıncı testi için özel dizayn edilen patlama basınç aparatı kullanılmıştır. Testler ticari olarak satın alınan kolajen sosis kılıf üzerinde gerçekleştirilmiştir. İlk olarak kolajen sosis kılıf patlama basıncı test aparatına sabitlenmiştir (10 mm çapında bir delik içeren üst halka ile alttaki halkanın arasına). 5

mm çaplı biopsi punch kullanılarak kolajen kılıfta bir delik oluşturulmuştur. Daha sonra kusurlu alana *in sitü* 75 µl prepolimer solüsyonu pipetlenmiş, mor ışık altında çapraz bağlanmıştır. Takiben sisteme 20 mm/dk 'ya ayarlanmış ekstrüzyon pompası ile hava gönderilmiştir, kablosuz sensor kullanılarak maksimum patlama basıncı bilgisayar ortamında kaydedilmiştir (Tutar ve ark., 2022).

3.10.2. Ex vivo Patlama Basıncı Testi

Mezbahadan temin edilen öküz gözlerinde bir biyopsi zımbası kullanılarak (3 mm çapında ve >%50 derinliğinde) kornea defekti oluşturulmuştur. Oluşturulan defekt bölgesine, otomatik pipet yardımı ile *in sitü* 100 µl ipek fibroin doku yapıştırıcı çözeltisi uygulanmıştır. Çözelti belirli süre boyunca ışık kürlenmesi sağlanmış ve çapraz bağlı hidrojel oluşturmuştur. Takiben, kornea kademeli olarak bir peristaltik pompa yardımıyla 20 mL/dak sabit bir hızda hava gönderilmiştir. Analizler, *in vitro* patlama basıncı testinde açıklanan aynı kurulum sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kablosuz sensor kullanılarak maksimum patlama basıncı bilgisayar ortamında kaydedilmiştir (Tutar ve ark., 2022).

3.11. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Biyouyumluluk Testleri

3.11.1. Hücrelerin Stoktan Çıkartılması

Tez kapsamında kornea fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Hücre kültür ortamı olarak %10 FBS, %1 L-Glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM-F12 besiyeri kullanılmıştır. Kornea fibroblast hücreleri -80°C'deki dondurucudan çıkarılarak 37°C'deki sıcak su banyosunda seri bir şekilde çözünmesi sağlanmıştır ve üzerine hücre besiyeri eklenerek 1500 rpm hızında 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Sonrasında süpernatant kısım pipet yardımıyla uzaklaştırılmış ve hücre peleti üzerine 2 ml hücre besiyeri ilave edilmiş ve mikropipet yardımıyla hücreler süspansE edilmiştir. Takiben 175 cm²'lik flasklara hücre süspansiyonu ve 18 ml hücre besiyeri eklenmiş ve 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılmıştır.

3.11.2. Hücrelerin Pasajlanması

Flasklarda bulunan kornea fibroblast hücreleri %90 konfluent duruma geldiklerinde ilk olarak flasklarda bulunan hücre besiyeri pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır ve PBS ile yıkanmıştır. Takiben flaskların yüzeyinden hücrelerin

kalması için %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilmiştir ve 37°C’de %5 CO₂’li ortamda 5 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonrasında, hücrelerin flask yüzeyinden kalkması durumu inverted mikroskop altında teyit edilmiştir. Tripsinin aktivitesini inhibe etmek için tripsinin miktarında eşit olarak şekilde hücre besiyeri ilavesi yapılmıştır. Sonrasında, flasklardaki hücre süspansiyonu, 15 ml’lik falkon tüp içerisine alınmış ve 1500 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatant kısım pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Son aşamada, elde edilen hücre peleti üzerine hücre besiyeri ilave edilerek flasklara aktarılmıştır. 37°C %5 CO₂ içeren steril ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

3.11.3 Hücrelerin Stoklanması

Hücreler flask yüzeyini kapladıklarında, ilk olarak flaskta bulunan hücre besiyeri pipet yardımıyla ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Takiben hücreler PBS ile yıkanmıştır. Flaska %0,05 Tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilerek hücrelerin flask yüzeyinden kalkması sağlanmıştır. Bunun için, hücreler 37°C’de %5 CO₂’li ortamda 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. 5 dakikalık inkübasyon süresi sonrasında inverted mikroskop kullanılarak hücrelerin flask yüzeyinden kalkması gözlenmiş ve, tripsin inhibisyonu için tripsin miktarına eşit olacak şekilde flaskla hücre besiyeri ilavesi yapılmıştır. Flask içindeki hücre süspansiyonu 15 ml’lik steril falkon tüplere aktarılmıştır. Takiben 1500 rpm’de hızda 5 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatant kısmı pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Takiben Hücre peleti üzerine her bir kriyovial için 1 ml olacak şekilde hücre dondurma çözeltisi (%10 DMSO + %65 FBS + %25 DMEM) ilavesi yapılmıştır. Kriyovialler -80°C’ye kaldırılmıştır.

3.11.4. Hücrelerin Sayımı

Hücrelerin sayım çalışmaları kapsamında süspanse haldeki hücrelerden 10 µl alınarak üzerlerine 10 µl %0,5’lik tripan mavisi çözeltisi eklenerek mikropipet yardımı ile homojen hale getirilmiştir. Takiben elde edilen çözeltiden mikropipet yardımıyla 10 µl alınmış ve thoma lamına koyulmuştur. Takiben lamel yardımıyla thoma lamının üzeri kapatılmıştır. Mikroskopta Thoma lamının üzerinde bulunan 16 karelik alanda bulunan hücreler sayılmıştır. Hücrelerin sayısı sulandırma katsayısı ile çarpılarak hücre süspansiyonu içerisindeki hücre sayısı belirlenmiştir.

3.11.5. MTT Testi

Tez kapsamında geliştirilen ipek fibroin doku yapıştırıcılarının sitotoksosite analizleri kolorimetrik bir yöntem olan MTT testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tetrazolyum tuzlarıyla yapılan bu testte, hücrelerin mitokondrisinde tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgenirken, tuzların formazan denilen yapıya dönüşmeleri sağlanır ve renk değişikliğine neden olur (Akgüner ve ark., 2020). Tez kapsamında gerçekleştirilen analizlerde indirekt MTT tekniği kullanılmıştır (Yaşayan ve ark., 2021). MTT stok çözeltisi 5 mg MTT 1 ml PBS içerisinde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti MTT analizlerinde kullanılmak üzere -20°C’de karanlıkta saklanmıştır. Kornea fibroblast hücreleri, 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyucuk başına 100 µl DMEM F-12 besiyeri ile birlikte ekilmiştir. Hücrelerin yapışmasını sağlamak için kültür kapları 24 saat boyunca 37°C’de %5 CO₂’li ortamda inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda hücre besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. MTT analizleri,; ağırlıkça %7,5 %15 ve %22,5 konsantrasyonlarda 200 µl hacmindeki PDMS moldlar içerisinde 4 dakika ışık altında çapraz bağlanarak hazırlanan örnekler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Doku yapıştırıcıları liyofilize edilerek kurutulmuştur. Her bir örnek 2 ml DMEM F-12 içeren 15 ml’lik steril santrifüj tüplerine konulmuş ve salım yapabilmesi için 24 saat inkübatörde inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda DMEM F-12 içeren ekstrakt çözeltisi 0,22 filtre ile steril edilmiştir. 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarındaki hücrelerin üzerine bu örnek grupları 100 µl hacminde eklenmiştir ve 24 saat 37°C’de %5 CO₂’li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında kuyucuklardaki ekstrakt içeren hücre medyumları uzaklaştırılmıştır. Her kuyucuğa %10 MTT solüsyonu içeren hücre besiyeri eklenmiş ve 4 saat boyunca 37°C’de alüminyum folyoya sarılı şekilde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki MTT solüsyonu mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmış, 100 µl DMSO ilave edilerek 20 dakika daha karanlıkta inkübe edilmiştir. Ardından plakalar 570 nm’de mikropipetle okuyucuda okunmuştur. Test edilen doku yapıştırıcı örnekleri ile kontrol grubunun absorbans değeri karşılaştırılarak % canlılık hesaplanmıştır. Sadece DMEM F-12 uygulanmış kontrol grubunun absorbans değeri, hücre canlılığı cinsinden %100 kabul edilmiştir. Deneylerde 6 tekrarlı çalışılmıştır.

3.12. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Hücre Adezyonu Testleri

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan doku yapıştırıcıların steril olması gerekmektedir. Bu nedenle, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ipek fibroin prepolimer solüsyonları otoklavlanarak steril edilmiştir. Ağırlıkça %7,5 %15 ve %22,5 konsantrasyonlardaki ipek fibroin örnekleri 15 ml steril santrifüj tüplerinde hazırlanmıştır. Tüpler alüminyum folyo ile sarılıp, kapakları parafilmlelendikten sonra cam beher içerisinde otoklavın 121°C 20 dakika süren programında steril edilmiştir. 7,5 mg RB 1 ml dH₂O'da ve 47,6 mg SPS 1 ml dH₂O'da çözündürülmüştür. Foto-başlatıcı riboflavin çözeltisi 0,45 filtreden geçirilerek steril edilmiştir ve otoklavdan çıkarılan ipek fibroin jelleri ile 900 µL ipek fibroin prepolimer çözeltisi ile 50 µL riboflavin ve 50 µL sodium persülfat ile birleştirilerek hazırlanmıştır.

Geliştirilen doku yapıştırıcılarının, hücre adezyon özelliklerini değerlendirmek için; her bir kuyucuğa 75 µL solusyonlardan pipetleme yapılmış ve belirli süre ışık altında çapraz bağlanarak hazırlanan hidrojel örneklerin üzerine kornea fibroblast hücreleri ekilmiştir. Hücre adezyon testi 48-kuyucuklu kültür kaplarında gerçekleştirilmiştir. Her bir kuyucukta 2×10^4 hücre olacak şekilde örneklerin üzerine hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Analizler için belirli süreler boyunca 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

3.12.1. DAPI/Aktin Analizi

Doku yapıştırıcılarının üzerine ekilen kornea fibroblast hücrelerinin morfolojisini görselleştirmek için hücreler Alexa-Fluor 594 ve DAPI ile boyanmıştır. Öncelikle doku iskeleleri steril şartlarda 48-kuyucuklu kültür kaplarında hazırlanmıştır. Her bir kuyucukta 2×10^4 hücre olacak şekilde 48-kuyucuklu kültür kaplarında bulunan doku yapıştırıcılarının üzerine ekilmiştir. Belirli süreler sonrasında (1. 3. Ve 7. Günlerde) hücreler distile su ile hazırlanmış %4'lük paraformaldehit (pH 7,4) ile kuyucuklardaki besiyerler uzaklaştırılıp 3 kere 5'er dakika yıkandıktan sonra laminar kabin içerisinde kuyucuk başı 300 µl PFA ile 30 dakika oda sıcaklığında fiks edilmiştir. 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra permeabilizasyon işlemi için %0,1 TritonX-100 ile 30 dakika muamele edilmiş ve takiben %1'lik bovin serumu %0,1 Tween 20 içeren solüsyon ile bloklanmıştır. Karanlıkta sırasıyla Alexa Flour 594 (1 saat) ve DAPI ile boyanarak (30 dakika) PBS ile yıkandıktan sonra floresan

mikroskobu (Zeiss AxioScope Z1) ile hücreler görüntülenmiştir (Yuce-Erarslan ve ark., 2021).

3.12.2. PrestoBlue Analizi

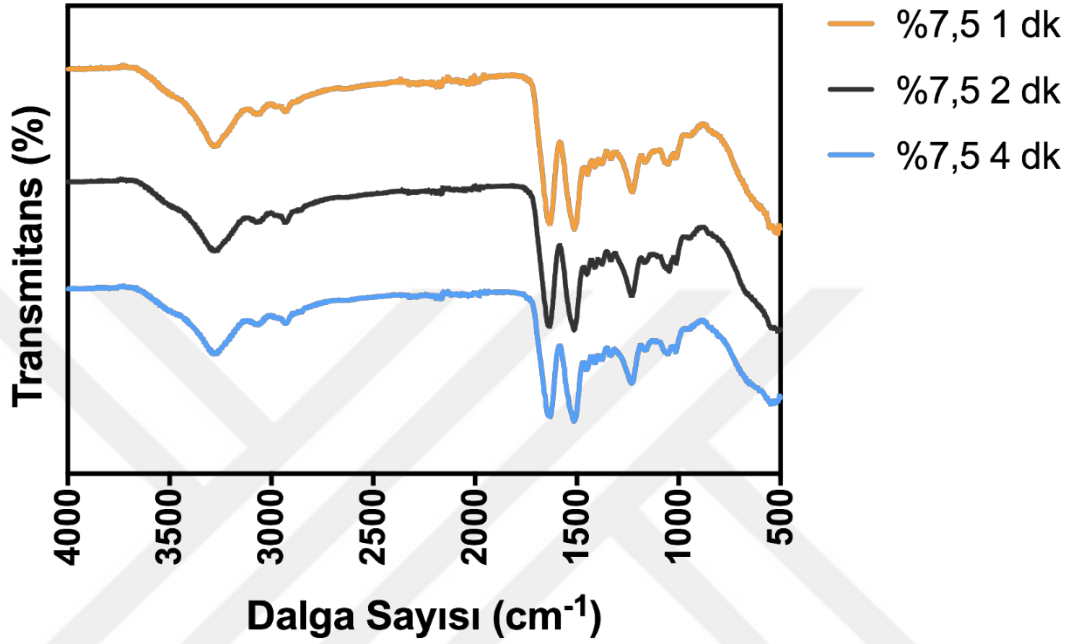
PrestoBlue® reaktifi, hücrelerin proliferasyonunu kantitatif olarak ölçmek için canlı hücrelerin indirgeme gücünü kullanarak hücre canlılığı göstergesi olarak işlev gören resazurin bazlı bir çözümdür. PrestoBlue® reaktifi, mavi renkli ve floresan olmayan hücreye nüfuz eden bir bileşik olan resazurin içerir. Hücrelere eklendiğinde, canlı hücrenin indirgeyici ortamı tarafından modifiye edilerek kırmızı renkli resorufine indirgenir ve floresan hale gelir. Bu dönüşüm, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır (canlı hücre sayısı arttıkça sinyal şiddetlenir) ve böylelikle kantitatif olarak ölçüm yapılabilir.

Bir önceki bölümde detaylı bir şekilde açıklanlandığı gibi hazırlanan ağırlıkça %7,5 %15 ve %22,5 konsantrasyonlardaki ipek fibroin doku yapıştırıcılarının üzerine ekilen kornea fibroblast hücrelerinde çoğalma hızları PrestoBlue testi ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Kültürün belirli günlerinde kültür ortamı çekildikten sonra her bir kuyucuğa hacimce %10'luk 200 µL PrestoBlue boyası (taze besiyeri ile seyreltme yapılmıştır) eklenmiş, 1 saat karanlık ortamda 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrası her bir kuyucuktan toplanan 100 µL hacmindeki besiyeri spektrofotometrede 560ex/ 590em nm değerinde okunmuştur. Hücreler üzerinde kalan PrestoBlue çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkama yapılmış ve taze besi ortamı eklenerek kültüre devam edilmiştir. Aynı işlem inkübasyon sürelerinin 4. ve 7. Günleri için de aynı şekilde gerçekleştirilmiştir.

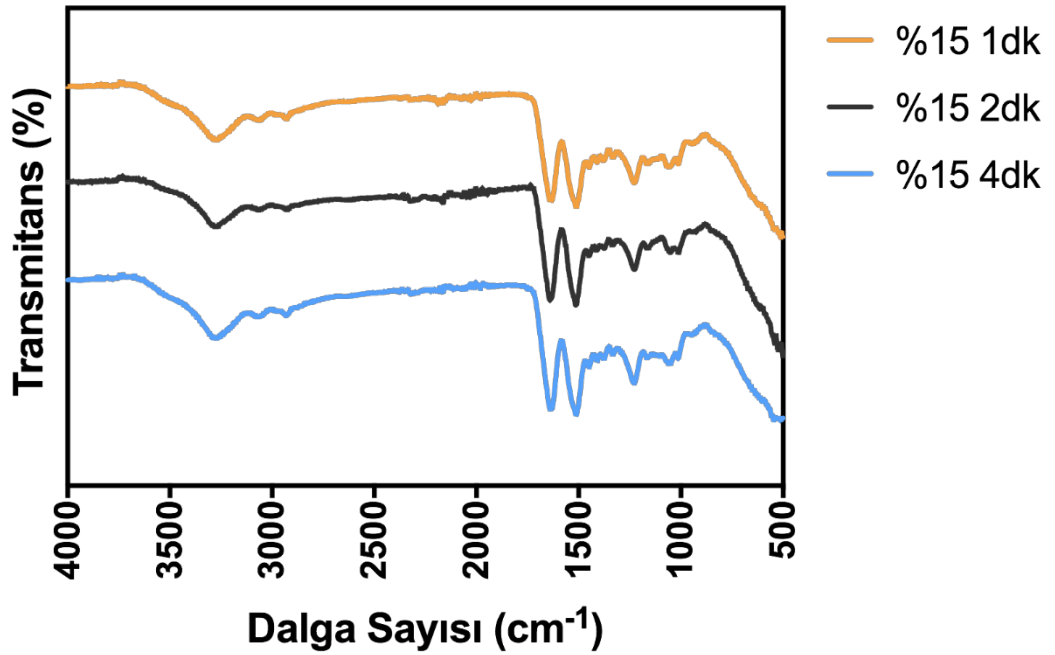
4. BULGULAR

4.1. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Yapısal Karakterizasyon Sonuçları

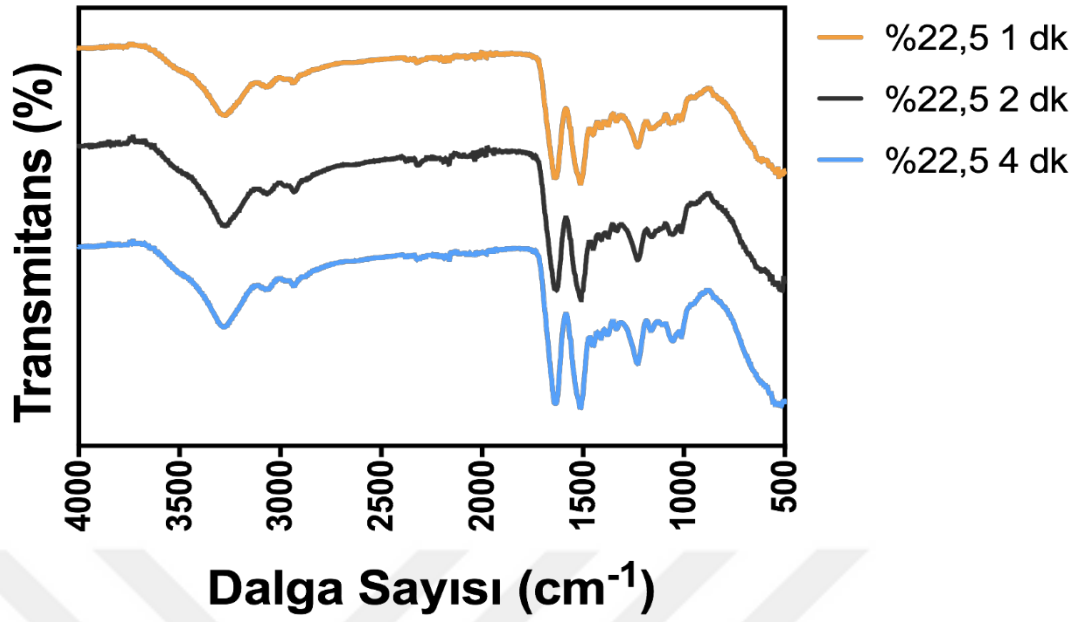
İpek fibroin doku yapıştırıcılarının FTIR analizleri, bir önceki bölümde anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’de sunulmuştur.



Şekil 4.1: %7,5 ipeke fibroin doku yapıştırıcılarının FTIR analizi sonuçları.



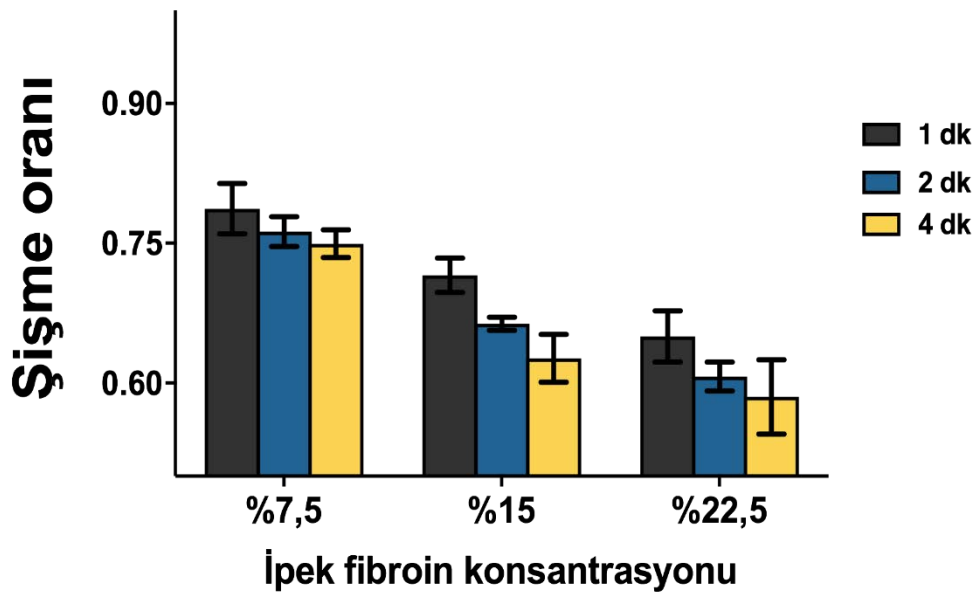
Şekil 4.2: %15 ipeke fibroin doku yapıştırıcılarının FTIR analizi sonuçları.



Şekil 4.3: %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarının FTIR analizi sonuçları.

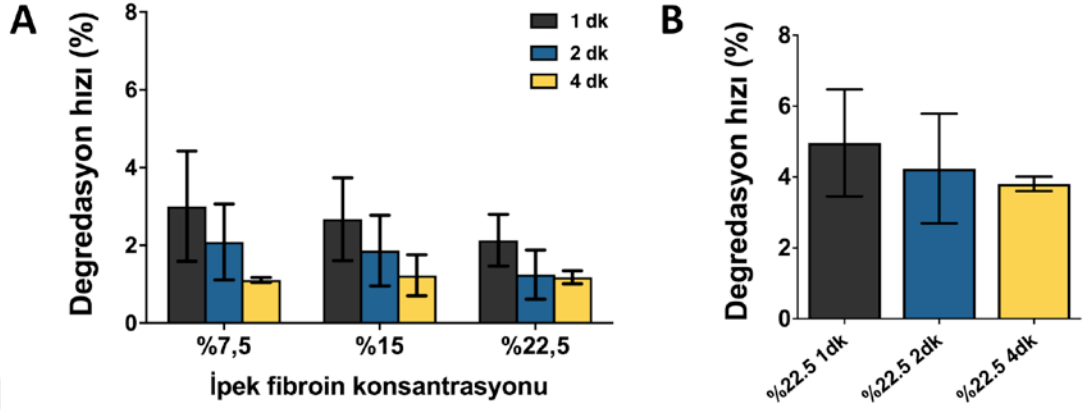
4.2. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının In vitro Şişme ve Degradasyon Testi Sonuçları

İpek fibroin doku yapıştırıcılarının *in vitro* şişme testleri PBS ortamında, bir önceki bölümde detaylı bir şekilde anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4’de sunulmuştur.



Şekil 4.4: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının *in vitro* şişme testi sonuçları.

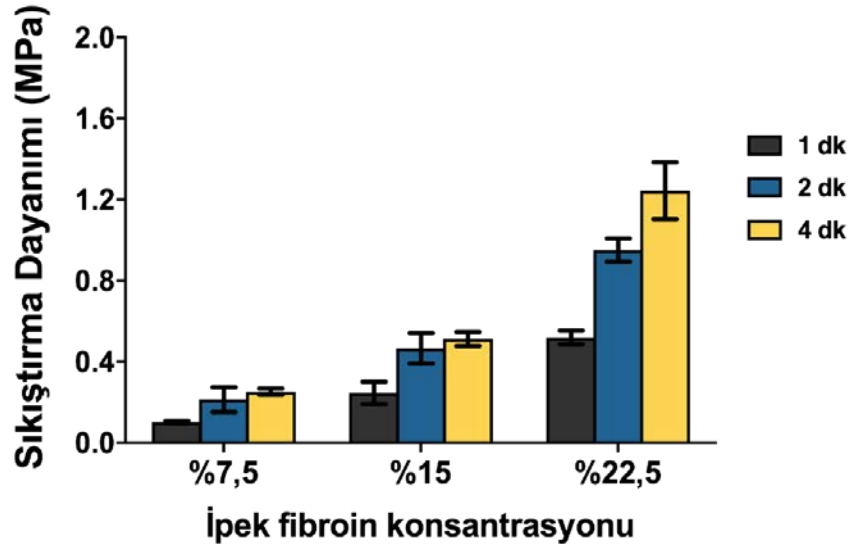
İpek fibroin doku yapıştırıcılarının *in vitro* degradasyon testleri PBS ve yapay gözyaşı ortamlarında, bir önceki bölümde detaylı bir şekilde anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5’de sunulmuştur.



Şekil 4.5: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının *in vitro* degradasyon testi sonuçları: (A) Yapay gözyaşı ve (B) PBS ortamı.

4.3. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Mekaniksel Dayanım Testi Sonuçları

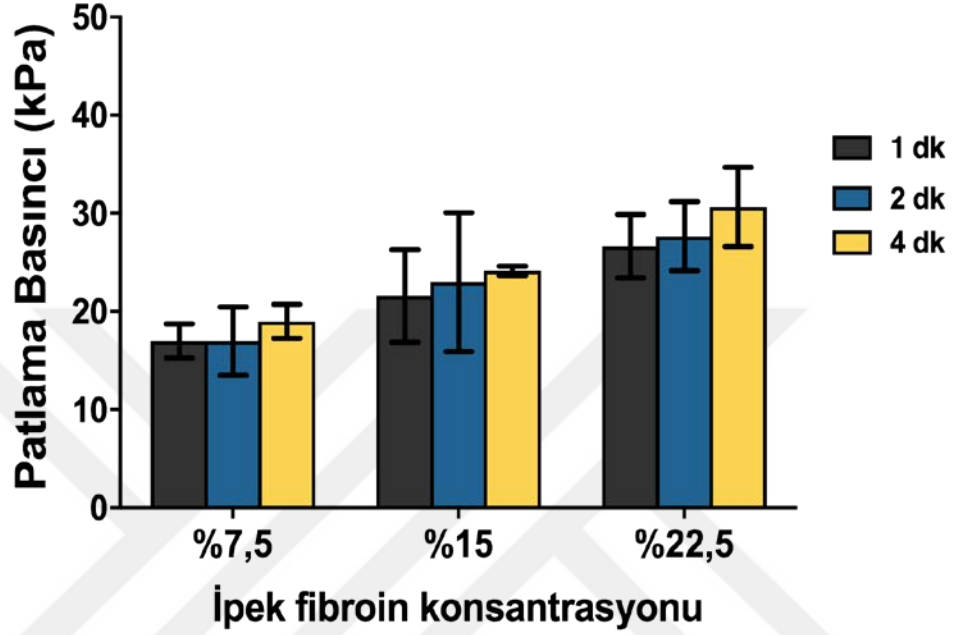
İpek fibroin doku yapıştırıcılarının mekaniksel dayanım testleri, bir önceki bölümde detaylı bir şekilde anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6’da sunulmuştur.



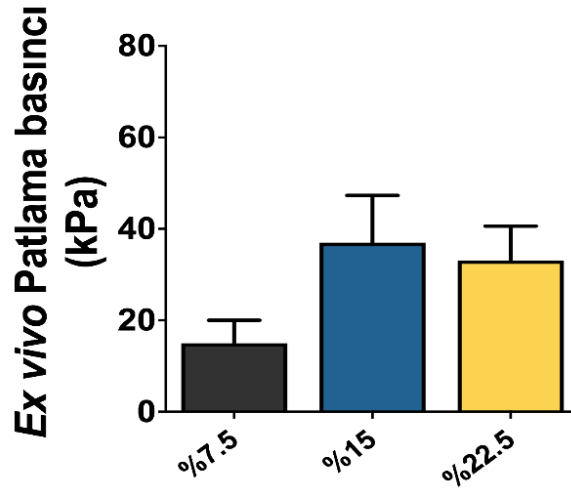
Şekil 4.6: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının mekanik dayanım testi sonuçları.

4.4. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Patlama Basıncı Testi Sonuçları

İpek fibroin doku yapıştırıcılarının patlama basıncı testleri, bir önceki bölümde detaylı bir şekilde anlatıldığı gibi *in vitro* ve *ex vivo* şartlarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de sunulmuştur.



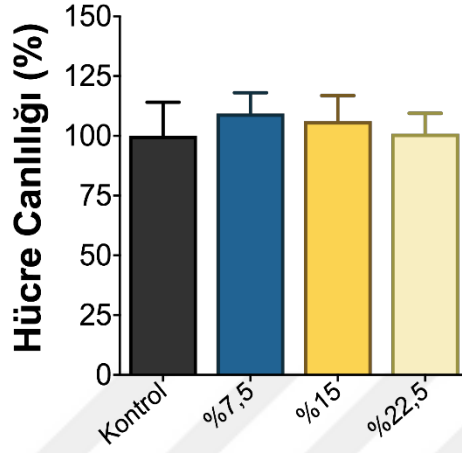
Şekil 4.7: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının *in vitro* patlama basıncı testi sonuçları.



Şekil 4.8: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının *ex vivo* patlama basıncı testi sonuçları.

4.5. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Biyouyumluluk Testleri

İpek fibroin doku yapıştırıcılarının biyouyumluluk testleri, bir önceki bölümde detaylı bir şekilde anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9’da sunulmuştur.

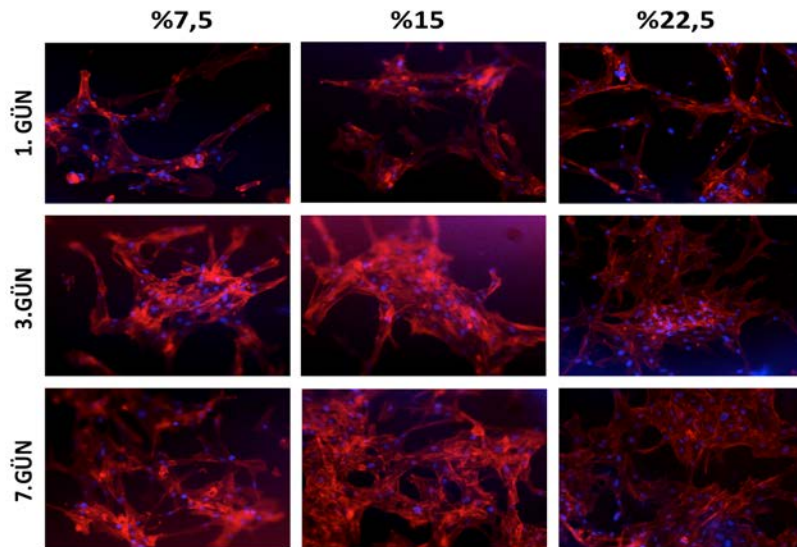


Şekil 4.9: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının MTT testi sonuçları.

4.6. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Hücre Adezyonu Sonuçları

4.6.1. DAPI/Aktin Testi Sonuçları

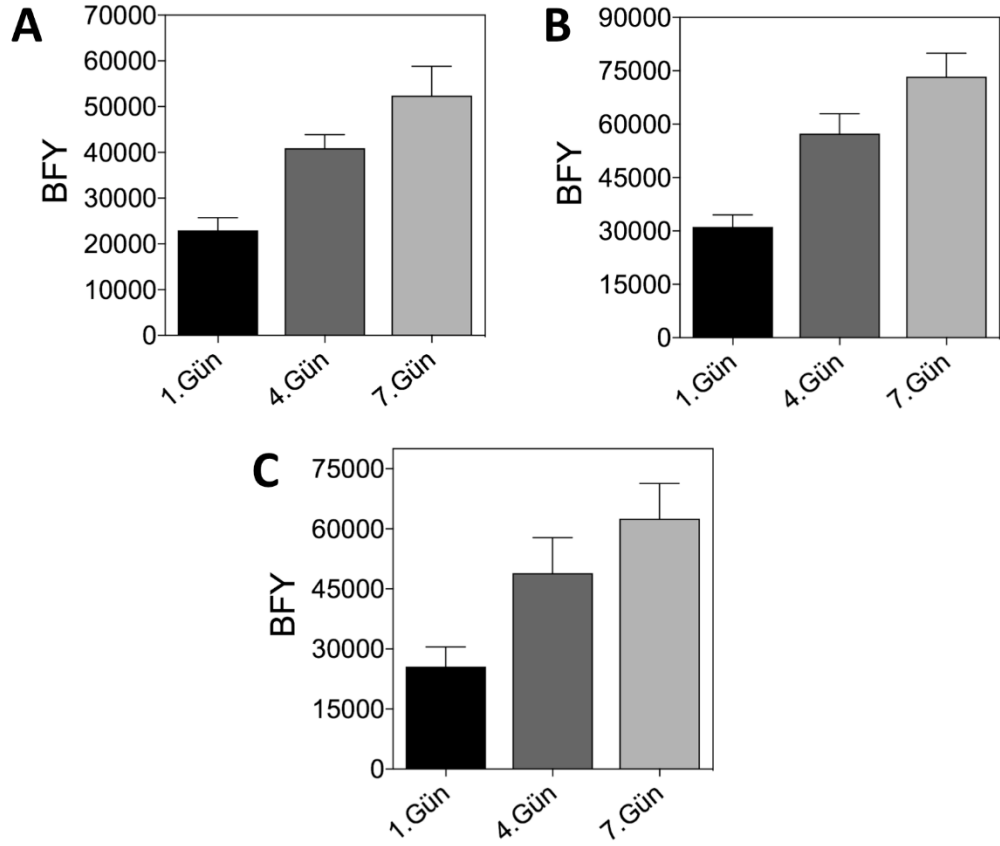
İpek fibroin doku yapıştırıcılarının DAPI/Aktin testleri, bir önceki bölümde detaylı bir şekilde anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.10’da sunulmuştur.



Şekil 4.10: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının DAPI/Aktin testi sonuçları.

4.6.2. PrestoBlue Testi Sonuçları

İpek fibroin doku yapıştırıcılarının PrestoBlue testleri, bir önceki bölümde detaylı bir şekilde anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.11’de sunulmuştur.



Şekil 4.11: İpek fibroin doku yapıştırıcılarının PrestoBlue testi sonuçları: (A) %7,5 (B) %15 ve (C) %22,5 (BFY: bağlı floresan yoğunluk).

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, korneal yaralanmalarının onarımında kullanılmak üzere ipek fibroin temelli doku yapıştırıcıları geliştirilmiştir. Çalışmamızda 3 farklı konsantrasyonda ipek fibroin konsantrasyonu ve 3 farklı ışıma süresi uygulanmıştır. İpek fibroinin belirli bir oran kullanılarak (%7,5 %15 ve %22,4 a/h) hazırlanan doku yapıştırıcıları, kornea ile dayanıklı ve biyolojik olarak uyumlu bir dolgu macunu geliştirmek için farklı ışıma süreleri (1, 2 ve 4 dakika) uygulanarak çapraz bağlanmıştır. Optimum ipek fibroin konsantrasyonu ve ışıma süresi belirlenmiştir. İpek fibroinin ve ışıma sürelerinin elde edilen doku yapıştırıcılarındaki fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerine etkisi incelenmiştir.

Elde edilen bulgular bu bölümde tartışmalı olarak değerlendirilmiştir.

5.1. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının FTIR Analizi Sonuçları

Bölüm 4.1’de üç farklı konsantrasyonda (ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5) ve 3 farklı zaman aralığında (1, 2 ve 4 dakika) ışık uygulanarak kürlenmiş doku ipek fibroin doku yapıştırıcılarının FTIR spektrumu Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3 de verilmiştir. Genel olarak, 1640-1655 cm^{-1} ’deki absorpsiyon bantları rastgele bobinlerle (random coil) ilişkilendirilirken, 1610-1630 cm^{-1} ’de ki bantlar bir β -tabaka (beta sheet) yapısının göstergesidir. Tüm numuneler için, rastgele bobinlerle ilişkili 1640-1655 cm^{-1} ’de absorpsiyon bantlarının varlığı gözlenmiştir. Bu, di-tirozin çapraz bağlarının oluştuğunu ve ipek fibroin içeriğinin, β -tabaka kristalli alanların oluşumunu desteklemediğini göstermektedir. Işıma süresinde değişmeye bağlı olarak FTIR spektralarında herhangi bir farklanma gözlenmemiştir.

5.2. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Şişme ve Degradasyon Testi Sonuçları

Bölüm 4.2’de üç farklı konsantrasyonda (ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5) ve 3 farklı zaman aralığında (1, 2 ve 4 dakika) ışık uygulanarak kürlenmiş ipek fibroin doku yapıştırıcılarının şişme testi sonuçları Şekil 3.4’de verilmiştir.

Sonuçlardan görüldüğü üzere tüm ipek fibroin doku yapıştırıcıları belirli ölçüde su emerek şişmiştir ve doku yapıştırıcılarının şişme oranlarında ipek fibroin konsantrasyonun artmasıyla ve ışıma süresinin artmasıyla birlikte azalma görülmüştür. 1 dakika mor ışık altında kürlenmiş ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarının şişme oranları sırasıyla $0,779 \pm 0,027$, $0,718 \pm 0,019$ ve $0,647 \pm 0,028$

bulunmuştur. 2 dakika mor ışık altında kürlenene ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarının şişme oranları sırasıyla $0,768\pm0,016$, $0,667\pm0,007$ ve $0,608\pm0,015$ bulunmuştur. 4 dakika mor ışık altında kürlenene ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarının şişme oranları sırasıyla $0,749\pm0,015$, $0,625\pm0,026$ ve $0,576\pm0,040$ bulunmuştur. Elde edilen tüm sonuçlar mekaniksel dayanım test sonuçlarını destekler niteliktedir.

Bölüm 4.2’de üç farklı konsantrasyonda (ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5) ve 3 farklı zaman aralığında (1, 2 ve 4 dakika) ışık uygulanarak kürlenene ipek fibroin doku yapıştırıcılarının yapay göz yaşı ortamında gerçekleştirilen degradasyon testi sonuçları Şekil 4.5A’da verilmiştir. Sonuçlardan görüldüğü üzere tüm ipek fibroin doku yapıştırıcıları 3 haftalık degradasyon süre sonrasında konsantrasyonlarına ve ışımaya sürelerine bağlı olarak belirli oranlarda degrade olmuştur. Doku yapıştırıcılarının % degradasyon hızlarında ipek fibroin konsantrasyonunun artmasıyla ve ışımaya süresinin artmasıyla birlikte azalma görülmüştür. 1 dakika mor ışık altında kürlenene ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarının % degradasyon hızları sırasıyla $3\pm1,414$, $2,663\pm1,067$ ve $2,123\pm0,664$ bulunmuştur. 2 dakika mor ışık altında kürlenene ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarının % degradasyon hızları sırasıyla $2,085\pm0,979$, $1,863\pm0,908$ ve $1,247\pm0,632$ bulunmuştur. 4 dakika mor ışık altında kürlenene ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarının % degradasyon hızları sırasıyla $1,109\pm0,061$, $1,227\pm0,527$ ve $1,178\pm0,171$ bulunmuştur. Sonuçlardan görüleceği üzere ipek fibroin konsantrasyonunun ve ışımaya süresinin artmasıyla % degradasyon hızlarında azalma görülmüştür, ancak sonuçlar arasında anlamlı bir farklanma bulunmamaktadır.

Bölüm 4.2’de üç farklı konsantrasyonda (ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5) 4 dakika ışık uygulanarak kürlenene ipek fibroin doku yapıştırıcılarının PBS ortamında gerçekleştirilen degradasyon testi sonuçları Şekil 4.5B’de verilmiştir. Sonuçlardan görüldüğü üzere ipek fibroin konsantrasyonunun artışı ile PBS ortamındaki % degradasyon hızları azalmıştır. %7,5, %15 ve %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarının % degradasyon hızları sırasıyla $4,965\pm1,509$, $4,237\pm1,549$ ve $3,802\pm0,204$ bulunmuştur. Sonuçlar arasında anlamlı bir farklanma bulunmamaktadır.

5.3. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Mekanik Dayanım Testi Sonuçları

İpek fibroin konsantrasyonunun ve ışıma süresinin doku yapıştırıcılarının mekanik özellikleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için sıkıştırma testi uygulanmıştır. Doku yapıştırıcılarının polimer konsantrasyonu çoğunlukla içerisindeki polimer miktarı arttıkça artmaktadır, bu da doku yapıştırıcının mekanik özelliklerinde artışa neden olmaktadır. Bölüm 4.3’de üç farklı konsantrasyonda (ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5) ve 3 farklı zaman aralığında (1, 2 ve 4 dakika) ışık uygulanarak kürlenmiş ipek fibroin doku yapıştırıcılarının mekanik dayanım test sonuçları Şekil 4.6’da verilmiştir.

Sonuçlardan da görüldüğü üzere artan ipek fibroin konsantrasyonu ve ışıma süresi ile birlikte doku yapıştırıcılarının mekaniksel dayanımlarında artış gözlenmiştir. 1 dakika mor ışık altında kürlenmiş ağırlıkça %7,5 , %15 ve %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarında sıkıştırma dayanımları sırasıyla $0,105 \pm 0,006$ MPa, $0,245 \pm 0,055$ MPa ve $0,51 \pm 0,035$ MPa’dır. 2 dakika mor ışık altında kürlenmiş ağırlıkça %7,5 , %15 ve %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarında sıkıştırma dayanımları sırasıyla $0,214 \pm 0,061$ MPa, $0,467 \pm 0,075$ MPa ve $0,105 \pm 0,006$ MPa’dır. 4 dakika mor ışık altında kürlenmiş ağırlıkça %7,5 , %15 ve %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarında sıkıştırma dayanımları sırasıyla $0,952 \pm 0,057$ MPa, $0,105 \pm 0,006$ MPa ve $0,105 \pm 0,006$ MPa’dır.

İpek fibroin doku yapıştırıcılarının sıkıştırma dayanımları görüldüğü üzere, içeriğindeki ipek fibroin konsantrasyonuna ve ışıma süresine bağlıdır.

5.4. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Patlama Basıncı Testi Sonuçları

Bölüm 4.4.1’de üç farklı konsantrasyonda (ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5) ve 3 farklı zaman aralığında (1, 2 ve 4 dakika) ışık uygulanarak kürlenmiş ipek fibroin doku yapıştırıcılarının *in vitro* şartlarda patlama basıncı testi sonuçları Şekil 4.7’de verilmiştir.

Sonuçlardan da görüldüğü üzere, artan ipek fibroin konsantrasyonu ve ışıma süresi ile birlikte doku yapıştırıcılarının *in vitro* patlama basıncı değerlerinde artış gözlenmiştir. 1 dakika mor ışık altında kürlenmiş ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarında *in vitro* patlama basıncı değerleri sırasıyla $17,0 \pm 1,73$

kPa, $21,6 \pm 4,72$ kPa ve $26,7 \pm 3,22$ kPa'dır. 2 dakika mor ışık altında kürlenene ağırlıkça %7,5 , %15 ve %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarında *in vitro* patlama basıncı değeri sırasıyla $17,0 \pm 3,46$ kPa, $23,00 \pm 7,07$ kPa ve $27,67 \pm 3,51$ kPa'dır. 4 dakika mor ışık altında kürlenene ağırlıkça %7,5 , %15 ve %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarında *in vitro* patlama basıncı değeri sırasıyla $19,0 \pm 1,73$ kPa, $24,17 \pm 0,47$ kPa ve $30,67 \pm 4,04$ kPa'dır.

Bölüm 4.4.2'de üç farklı konsantrasyonda (ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5) ve 4 dakika mor ışık altında ışık uygulanarak kürlenene ipek fibroin doku yapıştırıcılarının *ex vivo* şartlarda patlama basıncı testi sonuçları Şekil 4.8'de verilmiştir. Artan ipek fibroin konsantrasyonu ile birlikte ağırlıkça %15 ve %22,5 doku yapıştırıcılarının *ex vivo* patlama basıncı değeriinde ağırlıkça %7,5 doku yapıştırıcılarına göre artış gözlenmiştir. Ağırlıkça %15 ve %22,5 doku yapıştırıcılarının *ex vivo* patlama basıncı değeriinde anlamlı bir farklanma görülmemiştir. Ağırlıkça %7,5 , %15 ve %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarında *ex vivo* patlama basıncı değeri sırasıyla $15,0 \pm 5,0$ kPa, $37,0 \pm 10,29$ kPa ve $33,1 \pm 7,49$ kPa'dır.

5.5. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Biyouyumluluk Sonuçları

Bölüm 4.5'de üç farklı konsantrasyonda (ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5) ve 4 dakika mor ışık altında kürlenene ipek fibroin doku yapıştırıcılarının biyouyumlulukları indirekt MTT testi ile değerlendirilmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da verilmiştir.

MTT sonuçlarından görüleceği üzere ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5 doku yapıştırıcılarının %hücre canlılığı sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklanma olmadığı görülmüştür. Tüm doku yapıştırıcılarının kornea fibroblast hücrelerine karşı *in vitro* toksik etki göstermediği sonucuna varılmıştır.

5.6. İpek Fibroin Doku Yapıştırıcılarının Hücre Adezyonu Test Sonuçları

Bir biyomateriyalin doku yapıştırıcısı olarak kullanılabilirliğinin ve performansının saptanması için hücre adezyonu davranışlarının araştırılması önemlidir. Bölüm 4.6.1 ve Bölüm 4.6.2'de üç farklı konsantrasyonda (ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5) ve 4 dakika mor ışık altında ışık uygulanarak kürlenene ipek fibroin doku yapıştırıcılarının üzerine ekilen kornea fibroblast hücrelerinin *in vitro* hücre

adezyonu davranışları DAPI/Aktin ve PrestoBlue analizleri ile incelenmiştir. DAPI/Aktin test sonuçları Şekil 4.10'da, PrestoBlue sonuçları ise Şekil 4.11 de verilmiştir.

Şekil 4.10. kornea fibroblast hücrelerinin ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5 doku yapıştırıcılarının üzerine ekilmesinden sonraki 1., 3. ve 7. gündeki floresan mikroskop görüntülerini göstermektedir. Görüntüler ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5 doku yapıştırıcılarının biyouyumlu olduğunu ve kornea fibroblast hücrelerinin ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5 doku yapıştırıcılarının yüzeylerine kolayca bağlanabileceğini ve kornea yaralanmalarının onarımında kullanılabilirliğini göstermektedir.

Şekil 4.11. kornea fibroblast hücrelerinin ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5 doku yapıştırıcılarının üzerine ekilmesinden sonraki 1., 3. ve 7. Gündeki PrestoBlue sonuçlarını göstermektedir. PrestoBlue analizi ile doku yapıştırıcılarının üzerine ekilen kornea fibroblast hücrelerinin proliferasyon hızları (üreme davranışları) belirlenmiştir. Ağırlıkça %7,5, doku yapıştırıcılarında 1., 3. ve 5. Günlerde sırasıyla $22983,79 \pm 2757,94$, $40923,38 \pm 2940,02$, $52417,54 \pm 6403,53$ bağıl floresan yoğunluk ölçülmüştür. Ağırlıkça %15 doku yapıştırıcılarında 1., 3. ve 5. Günlerde sırasıyla $31156,86 \pm 3359,52$, $454342,12 \pm 5594,56$, $73376,22 \pm 658227$ bağıl floresan yoğunluk ölçülmüştür. Ağırlıkça %22,5 doku yapıştırıcılarında 1., 3. ve 5. Günlerde sırasıyla $25608,32 \pm 4911,68$, $48959,436 \pm 8849,45$, $62551,66 \pm 8772,38$ bağıl floresan yoğunluk ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde; tüm %7,5, %15 ve %22,5 ipek fibroin doku yapıştırıcılarında kornea fibroblast hücrelerinin çoğaldığı ve benzer trend gösterdiği görülmüştür.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında; korneal yaralanmalarının onarımında kullanılmak üzere kolaylıkla uygulanabilen, ışık altında kürlenebilen, mekaniksel olarak dayanıklı 3 farklı konsantrasyonda (ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5) ve 3 farklı ışıma süresi kullanılarak ipek fibroin doku yapıştırıcıları hazırlanmıştır. İpek fibroin konsantrasyonunun ve ışıma süresinin doku yapıştırıcılarının özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Doku yapıştırıcılarının ipek fibroin konsantrasyonun ve ışıma süresinin artması ile şişme oranı ve % degradasyon hızları değerlerinde azalma, sıkıştırma dayanımı ve *in vitro* patlama basıncı değerlerinde artış gözlenmiştir. 4 dakika ışıma süresinde öküz gözü kullanılarak gerçekleştirilen *ex vivo* patlama basıncı testlerinde ise en yüksek değerler %15 ipek fibroin konsantrasyonuna sahip doku yapıştırıcılarında elde edilmiştir. Ağırlıkça %7,5, %15 ve %22,5 konsantrasyonlarda hazırlanan doku yapıştırıcılarının MTT test sonuçlarına göre toksik olmadığı, DAPI/Aktin ve PrestoBlue test sonuçlarına göre ise hücre adezyonunu ve proliferasyonunu desteklediği sonucuna varılmıştır. Yapılan tüm deneysel çalışmalar sonrasında, ipek fibroin konsantrasyonun ve ışıma süresinin değiştirilmesiyle ayarlanabilir özelliklere sahip kornea yaralanmalarında kullanılmak üzere doku yapıştırıcılarının hazırlanabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKÇA

Acheson, J. F., & Lyons, C. J. (1991). *Ocular morbidity due to monofilament nylon corneal sutures.* *Eye*, 5(1), 106-112.

Ahearne, M., Fernández-Pérez, J., Masterton, S., Madden, P. W., & Bhattacharjee, P. (2020). *Designing scaffolds for corneal regeneration.* *Advanced Functional Materials*, 30(44), 1908996.

Akgüner, Z. P., & Bal Öztürk, A. (2020). *Development of tissue scaffolds with nanoparticles for bone tissue engineering applications.* *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 27(7), 842-850.

Akter, F. (2016). *Principles of tissue engineering.* In *Tissue engineering made easy* (pp. 3-16). Academic Press.

Alvarez-Lorenzo, C., Yanez, F., Barreiro-Iglesias, R., & Concheiro, A. (2006). *Imprinted soft contact lenses as norfloxacin delivery systems.* *Journal of Controlled Release*, 113(3), 236-244.

Applegate, M. B., Partlow, B. P., Coburn, J., Marelli, B., Pirie, C., Pineda, R., ... & Omenetto, F. G. (2016). *Photocrosslinking of silk fibroin using riboflavin for ocular prostheses.* *Advanced materials*, 28(12), 2417-2420.

Aydın, P. (2010). *Akova YA Temel Göz Hastalıkları 2. Basım*, 12, 480-1.

Bahney, C. S., Lujan, T. J., Hsu, C. W., Bottlang, M., West, J. L., & Johnstone, B. (2011). *Visible light photoinitiation of mesenchymal stem cell-laden bioresponsive hydrogels.* *European cells & materials*, 22, 43.

Bektas, C. K., & Hasirci, V. (2020). *Cell loaded 3D bioprinted GelMA hydrogels for corneal stroma engineering.* *Biomaterials science*, 8(1), 438-449.
Bhatia, S. S. (2006). *Ocular surface sealants and adhesives.* *The ocular surface*, 4(3), 146-154

Bryant, S. J., & Anseth, K. S. (2001). *The effects of scaffold thickness on tissue engineered cartilage in photocrosslinked poly (ethylene oxide) hydrogels.* *Biomaterials*, 22(6), 619-626.

Campbell, J. D., Ahmad, S., Agrawal, A., Bienek, C., Atkinson, A., McGowan, N. W., ... & Dhillon, B. (2019). *Allogeneic ex vivo expanded corneal epithelial stem cell transplantation: a randomized controlled clinical trial.* *Stem cells translational medicine*, 8(4), 323-331.

Cascone, M. G., Laus, M., Ricci, D., & Sbarbati Del Guerra, R. (1995). *Evaluation of poly (vinyl alcohol) hydrogels as a component of hybrid artificial tissues.* *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 6(2), 71-75.

Cauich-Rodriguez, J. V., Deb, S., & Smith, R. (1996). *Effect of cross-linking agents on the dynamic mechanical properties of hydrogel blends of poly (acrylic acid)-poly (vinyl alcohol-vinyl acetate).* *Biomaterials*, 17(23), 2259-2264.

Cauich-Rodríguez, J. V., Deb, S., & Smith, R. (2001). *Physicochemical characterization of hydrogels based on polyvinyl alcohol-vinyl acetate blends.* *Journal of applied polymer science*, 82(14), 3578-3590.

Cavanaugh, T. B., & Gottsch, J. D. (1991). *Infectious keratitis and cyanoacrylate adhesive.* *American journal of ophthalmology*, 111(4), 466-472.

Chan, S. M., & Boisjoly, H. (2004). *Advances in the use of adhesives in ophthalmology.* *Current opinion in ophthalmology*, 15(4), 305-310.

Chen, W. L., Lin, C. T., Hsieh, C. Y., Tu, I. H., Chen, W. Y., & Hu, F. R. (2007). *Comparison of the bacteriostatic effects, corneal cytotoxicity, and the ability to seal corneal incisions among three different tissue adhesives.* *Cornea*, 26(10), 1228-1234.

Chen, Z., You, J., Liu, X., Cooper, S., Hodge, C., Sutton, G., ... & Wallace, G. G. (2018). *Biomaterials for corneal bioengineering.* *Biomedical Materials*, 13(3), 032002.

Ciapetti, G., Stea, S., Cenni, E., Sudanese, A., Marraro, D., Toni, A., & Pizzoferrato, A. (1994). *Cytotoxicity testing of cyanoacrylates using direct contact assay on cell cultures.* *Biomaterials*, 15(1), 63-67.

Coskunseven, E., Jankov II, M. R., & Farhad Hafezi, M. D. (2009). *Contralateral eye study of corneal collagen cross-linking with riboflavin and UVA irradiation in patients with keratoconus.* *Journal of refractive surgery*, 25(4), 371.

Cruise, G. M., Scharp, D. S., & Hubbell, J. A. (1998). *Characterization of permeability and network structure of interfacially photopolymerized poly (ethylene glycol) diacrylate hydrogels.* *Biomaterials*, 19(14), 1287-1294.

Drury, J. L., & Mooney, D. J. (2003). *Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications.* *Biomaterials*, 24(24), 4337-4351.

Eghrari, A. O., Riazuddin, S. A., & Gottsch, J. D. (2015). *Overview of the cornea: structure, function, and development.* *Progress in molecular biology and translational science*, 134, 7-23.

Ellis, D. A., & Shaikh, A. (1990). *The ideal tissue adhesive in facial plastic and reconstructive surgery.* *The Journal of otolaryngology*, 19(1), 68-72.

Ferry, A. P., & Barnert, A. H. (1971). *Granulomatous keratitis resulting from use of cyanoacrylate adhesive for closure of perforated corneal ulcer.* *American Journal of Ophthalmology*, 72(3), 538-541.

Freyman, T. M., Yannas, I. V., & Gibson, L. J. (2001). Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Progress in Materials science*, 46(3-4), 273-282.

Fuest, M., Yam, G. H. F., Mehta, J. S., & Duarte Campos, D. F. (2020). Prospects and challenges of translational corneal bioprinting. *Bioengineering*, 7(3), 71.

Gain, P., Jullienne, R., He, Z., Aldossary, M., Acquart, S., Cognasse, F., & Thuret, G. (2016). Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA ophthalmology*, 134(2), 167-173.

Gao, C., & Yan, D. (2004). Hyperbranched polymers: from synthesis to applications. *Progress in polymer science*, 29(3), 183-275.

Ghezzi, C. E., Rnjak-Kovacina, J., & Kaplan, D. L. (2015). Corneal tissue engineering: recent advances and future perspectives. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 21(3), 278-287.

Grinstaff, M. W. (2007). Designing hydrogel adhesives for corneal wound repair. *Biomaterials*, 28(35), 5205-5214.

Gupta, B. K., Edward, D., & Duffy, M. T. (2001). 2-Octyl cyanoacrylate tissue adhesive and muscle attachment to porous anophthalmic orbital implants. *Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery*, 17(4), 264-269.

Han, Y., Li, C., Cai, Q., Bao, X., Tang, L., Ao, H., ... & Liu, Z. (2020). Studies on bacterial cellulose/poly (vinyl alcohol) hydrogel composites as tissue-engineered corneal stroma. *Biomedical Materials*, 15(3), 035022.

Heath, C. A. (2000). Cells for tissue engineering. *Trends in biotechnology*, 18(1), 17-19.

Huang, W., Rollett, A., & Kaplan, D. L. (2015). Silk-elastin-like protein biomaterials for the controlled delivery of therapeutics. *Expert opinion on drug delivery*, 12(5), 779-791.

Huang, W., Tarakanova, A., Dinjaski, N., Wang, Q., Xia, X., Chen, Y., ... & Kaplan, D. L. (2016). Design of Multistimuli Responsive Hydrogels Using Integrated Modeling and Genetically Engineered Silk-Elastin-Like Proteins. *Advanced functional materials*, 26(23), 4113-4123.

Islam, M. M., Buznyk, O., Reddy, J. C., Pasychnikova, N., Alarcon, E. I., Hayes, S., ... & Griffith, M. (2018). Biomaterials-enabled cornea regeneration in patients at high risk for rejection of donor tissue transplantation. *NPJ Regenerative medicine*, 3(1), 1-10.

Jameson, J. F., Pacheco, M. O., Nguyen, H. H., Phelps, E. A., & Stoppel, W. L. (2021). Recent Advances in Natural Materials for Corneal Tissue Engineering. *Bioengineering*, 8(11), 161.

Jeong, B., Bae, Y. H., Lee, D. S., & Kim, S. W. (1997). *Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems.* *Nature*, 388(6645), 860-862.

Jindal, S. K., Kiamehr, M., Sun, W., & Yang, X. B. (2014). *Silk scaffolds for dental tissue engineering.* In *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (pp. 403-428).

Johnson, F. A., Craig, D. Q., & Mercer, A. D. (1997). *Characterization of the block structure and molecular weight of sodium alginates.* *Journal of pharmacy and pharmacology*, 49(7), 639-643.

Kaufman, H. E., Insler, M. S., Ibrahim-Elzembely, H. A., & Kaufman, S. C. (2003). *Human fibrin tissue adhesive for sutureless lamellar keratoplasty and scleral patch adhesion: a pilot study.* *Ophthalmology*, 110(11), 2168-2172.

Kilic Bektas, C., & Hasirci, V. (2018). *Mimicking corneal stroma using keratocyte-loaded photopolymerizable methacrylated gelatin hydrogels.* *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 12(4), e1899-e1910.

Kilic Bektas, C., & Hasirci, V. (2020). *Cell Loaded GelMA: HEMA IPN hydrogels for corneal stroma engineering.* *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 31(1), 1-15.

Kohane, D. S., & Langer, R. (2008). *Polymeric biomaterials in tissue engineering.* *Pediatric research*, 63(5), 487-491.

Koivusalo, L., Karvinen, J., Sorsa, E., Jönkkäri, I., Väliäho, J., Kallio, P., ... & Kellomäki, M. (2018). *Hydrazone crosslinked hyaluronan-based hydrogels for therapeutic delivery of adipose stem cells to treat corneal defects.* *Materials Science and Engineering: C*, 85, 68-78.

Kong, B., & Mi, S. (2016). *Electrospun scaffolds for corneal tissue engineering: A review.* *Materials*, 9(8), 614.

Kong, B., Chen, Y., Liu, R., Liu, X., Liu, C., Shao, Z., ... & Mi, S. (2020). *Fiber reinforced GelMA hydrogel to induce the regeneration of corneal stroma.* *Nature communications*, 11(1), 1-12.

Lai, J. Y. (2016). *Hyaluronic acid concentration-mediated changes in structure and function of porous carriers for corneal endothelial cell sheet delivery.* *Materials Science and Engineering: C*, 59, 411-419.

Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. P., & Atala, A. (Eds.). (2020). *Principles of tissue engineering.* Academic press.

Lee, C. R., Grodzinsky, A. J., & Spector, M. (2001). *The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis.* *Biomaterials*, 22(23), 3145-3154.

Lee, K. Y., Bouhadir, K. H., & Mooney, D. J. (2000). *Degradation behavior of covalently cross-linked poly (aldehyde guluronate) hydrogels.* *Macromolecules*, 33(1), 97-101.

Lee, S. J., Yoo, J. J., & Atala, A. (2018). *Biomaterials and tissue engineering.* *Clinical regenerative medicine in urology*, 17-51.

Leonard, F., Kulkarni, R. K., Brandes, G., Nelson, J., & Cameron, J. J. (1966). *Synthesis and degradation of poly (alkyl α -cyanoacrylates).* *Journal of applied polymer science*, 10(2), 259-272.

LeRoux, M. A., Guilak, F., & Setton, L. A. (1999). *Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration.* *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 47(1), 46-53.

Liliensiek, S. J., Campbell, S., Nealey, P. F., & Murphy, C. J. (2006). *The scale of substratum topographic features modulates proliferation of corneal epithelial cells and corneal fibroblasts.* *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 79(1), 185-192.

Liu, Y., Gan, L., Carlsson, D.J., Fagerholm, P., Lagali, N., Watsky, M.A. ve diğerleri. (2006). *A Simple, Cross-Linked Collagen Tissue Substitute for Corneal Implantation.* *Investigative Ophthalmology&Visual Science*, 47(5), 1869-1875.
Ljubimov, A. V., & Saghizadeh, M. (2015). *Progress in corneal wound healing.* *Progress in retinal and eye research*, 49, 17-45.

Luo, L. J., Lai, J. Y., Chou, S. F., Hsueh, Y. J., & Ma, D. H. K. (2018). *Development of gelatin/ascorbic acid cryogels for potential use in corneal stromal tissue engineering.* *Acta biomaterialia*, 65, 123-136.

Mahdavi, S. S., Abdekhodaie, M. J., Mashayekhan, S., Baradaran-Rafii, A., & Djalilian, A. R. (2020). *Bioengineering approaches for corneal regenerative medicine.* *Tissue engineering and regenerative medicine*, 17(5), 567-593.

Mann, B. K., Gobin, A. S., Tsai, A. T., Schmedlen, R. H., & West, J. L. (2001). *Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering.* *Biomaterials*, 22(22), 3045-3051.

Mazzocchi, J. P., Fekke, D. L., Baskaran, H., & Pintauro, P. N. (2010). *Mechanical and cell viability properties of crosslinked low-and high-molecular weight poly (ethylene glycol) diacrylate blends.* *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 93(2), 558-566.

Meek, K. M., & Boote, C. (2004). *The organization of collagen in the corneal stroma. Experimental eye research*, 78(3), 503-512.

Mehdizadeh, M., & Yang, J. (2013). *Design strategies and applications of tissue bioadhesives. Macromolecular bioscience*, 13(3), 271-288.

Miralles, G., Baudoin, R., Dumas, D., Baptiste, D., Hubert, P., Stoltz, J. F., ... & Payan, E. (2001). *Sodium alginate sponges with or without sodium hyaluronate: in vitro engineering of cartilage. Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 57(2), 268-278.

Mitropoulos, A. N., Marelli, B., Ghezzi, C. E., Applegate, M. B., Partlow, B. P., Kaplan, D. L., & Omenetto, F. G. (2015). *Transparent, nanostructured silk fibroin hydrogels with tunable mechanical properties. ACS Biomaterials Science & Engineering*, 1(10), 964-970.

Nishida, K. (2003). *Tissue engineering of the cornea. Cornea*, 22(7), S28-S34.

Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Maeda, N., Watanabe, H. ve diğerleri. (2004). *Functional Bioengineered Corneal Epithelial Sheet Grafts from Corneal Stem Cells Expanded Ex Vivo on A Temperature-Responsive Cell Culture Surface. Transplantation*, 77(3), 379-385.

Nuttelman, C. R., Mortisen, D. J., Henry, S. M., & Anseth, K. S. (2001). *Attachment of fibronectin to poly (vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration. Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 57(2), 217-223.

Oshika, T., Sugita, G., Miyata, K., Tokunaga, T., Samejima, T., Okamoto, C., & Ishii, Y. (2007). *Influence of tilt and decentration of scleral-sutured intraocular lens on ocular higher-order wavefront aberration. British Journal of Ophthalmology*, 91(2), 185-188.

Park, H. C., Champakalakshmi, R., Panengad, P. P., Raghunath, M., & Mehta, J. S. (2011). *Tissue adhesives in ocular surgery. Expert review of ophthalmology*, 6(6), 631-655.

Partlow, B. P., Hanna, C. W., Rnjak-Kovacina, J., Moreau, J. E., Applegate, M. B., Burke, K. A., ... & Kaplan, D. L. (2014). *Highly tunable elastomeric silk biomaterials. Advanced functional materials*, 24(29), 4615-4624.

Procopio, A., Lagreca, E., Jamaledin, R., La Manna, S., Corrado, B., Di Natale, C., & Onesto, V. (2022). *Recent Fabrication Methods to Produce Polymer-Based Drug Delivery Matrices (Experimental and In Silico Approaches). Pharmaceutics*, 14(4), 872.

Raia, N. R., Jia, D., Ghezzi, C. E., Muthukumar, M., & Kaplan, D. L. (2020). *Characterization of silk-hyaluronic acid composite hydrogels towards vitreous humor substitutes. Biomaterials, 233, 119729.*

Raia, N. R., Partlow, B. P., McGill, M., Kimmerling, E. P., Ghezzi, C. E., & Kaplan, D. L. (2017). *Enzymatically crosslinked silk-hyaluronic acid hydrogels. Biomaterials, 131, 58-67.*

Rana, M., & Savant, V. (2013). *A brief review of techniques used to seal corneal perforation using cyanoacrylate tissue adhesive. Contact Lens and Anterior Eye, 36(4), 156-158.*

Refojo, M. F., & Dohlman, C. H. (1969). *The tensile strength of adhesive joints between eye tissues and alloplastic materials. American journal of ophthalmology, 68(2), 248-255.*

Refojo, M. F., Dohlman, C. H., Ahmad, B., Carroll, J. M., & Allen, J. C. (1968). *Evaluation of adhesives for corneal surgery. Archives of ophthalmology, 80(5), 645-656.*

Rockwood, D. N., Preda, R. C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M. L., & Kaplan, D. L. (2011). *Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. Nature protocols, 6(10), 1612-1631.*

Rosa, V., Della Bona, A., Cavalcanti, B. N., & Nör, J. E. (2012). *Tissue engineering: from research to dental clinics. Dental Materials, 28(4), 341-348.*

Rose, J. B., Pacelli, S., Haj, A. J. E., Dua, H. S., Hopkinson, A., White, L. J., & Rose, F. R. (2014). *Gelatin-based materials in ocular tissue engineering. Materials, 7(4), 3106-3135.*

Ruberti, J. W., & Zieske, J. D. (2008). *Prelude to corneal tissue engineering—gaining control of collagen organization. Progress in retinal and eye research, 27(5), 549-577.*

Salehi, A. O. M., Nourbakhsh, M. S., Rafienia, M., Baradaran-Rafii, A., & Keshel, S. H. (2020). *Corneal stromal regeneration by hybrid oriented poly (ϵ -caprolactone)/lyophilized silk fibroin electrospun scaffold. International Journal of Biological Macromolecules, 161, 377-388.*

Sanborn, T. J., Messersmith, P. B., & Barron, A. E. (2002). *In situ crosslinking of a biomimetic peptide-PEG hydrogel via thermally triggered activation of factor XIII. Biomaterials, 23(13), 2703-2710.*

Shigemitsu, T., & Majima, Y. (1997). *The utilization of a biological adhesive for wound treatment: comparison of suture, self-sealing sutureless and cyanoacrylate closure in the tensile strength test. International ophthalmology, 20(6), 323-328.*

Shirzaei Sani, E., Kheirkhah, A., Rana, D., Sun, Z., Foulsham, W., Sheikhi, A., ... & Annabi, N. (2019). *Sutureless repair of corneal injuries using naturally derived bioadhesive hydrogels. Science advances, 5(3), eaav1281.*

Soh, Y. Q., Peh, G. S., & Mehta, J. S. (2017). *Translational issues for human corneal endothelial tissue engineering. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 11(9), 2425-2442.*

Spoerl, E., Huhle, M., & Seiler, T. (1998). *Induction of cross-links in corneal tissue. Experimental eye research, 66(1), 97-103.*

Stepp, M. A., Tadvalkar, G., Hakh, R., & Pal-Ghosh, S. (2017). *Corneal epithelial cells function as surrogate Schwann cells for their sensory nerves. Glia, 65(6), 851-863.*

Stoppel, W. L., Raia, N., Kimmerling, E., Wang, S., Ghezzi, C. E., & Kaplan, D. L. (2017). *2.12 Silk Biomaterials.*

Suggs, L. J., Shive, M. S., Garcia, C. A., Anderson, J. M., & Mikos, A. G. (1999). *In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of poly (propylene fumarate-co-ethylene glycol) hydrogels. Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials, 46(1), 22-32.*

Suh, J. K. F., & Matthew, H. W. (2000). *Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. Biomaterials, 21(24), 2589-2598.*

Tabatabai, A. P., Kaplan, D. L., & Blair, D. L. (2015). *Rheology of reconstituted silk fibroin protein gels: the epitome of extreme mechanics. Soft Matter, 11(4), 756-761.*

Tang, Q., Luo, C., Lu, B., Fu, Q., Yin, H., Qin, Z., ... & Yao, K. (2017). *Thermosensitive chitosan-based hydrogels releasing stromal cell derived factor-1 alpha recruit MSC for corneal epithelium regeneration. Acta Biomaterialia, 61, 101-113.*

Tavakoli, M. (2008). *Corneal Confocal Microscopy: A Novel Non-Invasive Diagnostic Tool for Assessing Peripheral Neuropathies. The University of Manchester (United Kingdom).*

Teixeira, A. I., McKie, G. A., Foley, J. D., Bertics, P. J., Nealey, P. F., & Murphy, C. J. (2006). *The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography. Biomaterials, 27(21), 3945-3954.*

Tomihata, K., & Ikada, Y. (1997). *In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. Biomaterials, 18(7), 567-575.*

Torbet, J., Malbouyres, M., Builles, N., Justin, V., Roulet, M., Damour, O. ve diğerleri. (2007). *Orthogonal Scaffold of Magnetically Aligned Collagen Lamellae for Corneal Stroma Reconstruction. Biomaterials*, 28, 4268-4276.

Torricelli, A. A., Singh, V., Santhiago, M. R., & Wilson, S. E. (2013). *The corneal epithelial basement membrane: structure, function, and disease. Investigative ophthalmology & visual science*, 54(9), 6390-6400.

Trott, A. T. (1997). *Cyanoacrylate tissue adhesives: an advance in wound care. Jama*, 277(19), 1559-1560.

Trujillo-de Santiago, G., Sharifi, R., Yue, K., Sani, E. S., Kashaf, S. S., Alvarez, M. M., ... & Annabi, N. (2019). *Ocular adhesives: Design, chemistry, crosslinking mechanisms, and applications. Biomaterials*, 197, 345-367.

Tutar, R., Yüce-Erarslan, E., İzbudak, B., & Bal-Öztürk, A. (2022). *Photocurable silk fibroin-based tissue sealants with enhanced adhesive properties for the treatment of corneal perforations. Journal of Materials Chemistry B*, 10(15), 2912-2925.

Uyanıklar, M., Gunal, G., Tevlek, A., Hosseinian, P., & Aydin, H. M. (2019). *Hybrid cornea: cell laden hydrogel incorporated decellularized matrix. ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6(1), 122-133.

Vacanti, J. P., & Langer, R. (1999). *Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. The lancet*, 354, S32-S34.

Valencia-Gallegos, J. A., Álvarez, M. M., & Martínez-Merino, V. J. (2015). *High loaded dendrimers with free peripheral groups. Tetrahedron Letters*, 56(48), 6803-6806.

Vårum, K. M., Holme, H. K., Izume, M., Stokke, B. T., & Smidsrød, O. (1996). *Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1291(1), 5-15.

Vats, A., Tolley, N. S., Polak, J. M., & Gough, J. E. (2003). *Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, 28(3), 165-172.

Vauthier, C., Dubernet, C., Fattal, E., Pinto-Alphandary, H., & Couvreur, P. (2003). *Poly (alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. Advanced drug delivery reviews*, 55(4), 519-548.

Voit, B. I., & Lederer, A. (2009). *Hyperbranched and Highly Branched Polymer Architectures Synthetic Strategies and Major Characterization Aspects. Chemical reviews*, 109(11), 5924-5973.

Wang, Q., Xia, X., Huang, W., Lin, Y., Xu, Q., & Kaplan, D. L. (2014). *High throughput screening of dynamic silk-elastin-like protein biomaterials. Advanced functional materials*, 24(27), 4303-4310.

Webster, R. G., Slansky, H. H., Refojo, M. F., Boruchoff, S. A., & Dohlman, C. H. (1968). *The use of adhesive for the closure of corneal perforations: report of two cases. Archives of ophthalmology*, 80(6), 705-709.

West, J. L., & Hubbell, J. A. (1999). *Polymeric biomaterials with degradation sites for proteases involved in cell migration. Macromolecules*, 32(1), 241-244.

Whitcher, J. P., Srinivasan, M., & Upadhyay, M. P. (2001). *Corneal blindness: a global perspective. Bulletin of the world health organization*, 79(3), 214-221.

Pellegrini, G., & De Luca, M. (2014). *Eyes on the prize: limbal stem cells and corneal restoration. Cell Stem Cell*, 15(2), 121-122.

Wu, Z., Kong, B., Liu, R., Sun, W., & Mi, S. (2018). *Engineering of corneal tissue through an aligned PVA/collagen composite nanofibrous electrospun scaffold. Nanomaterials*, 8(2), 124.

Xia, X. X., Xu, Q., Hu, X., Qin, G., & Kaplan, D. L. (2011). *Tunable self-assembly of genetically engineered silk–elastin-like protein polymers. Biomacromolecules*, 12(11), 3844-3850.

Yan, J., Qiang, L., Gao, Y., Cui, X., Zhou, H., Zhong, S., ... & Wang, H. (2012). *Effect of fiber alignment in electrospun scaffolds on keratocytes and corneal epithelial cells behavior. Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(2), 527-535.

Yanez-Soto, B., Liliensiek, S. J., Murphy, C. J., & Nealey, P. F. (2013). *Biochemically and topographically engineered poly (ethylene glycol) diacrylate hydrogels with biomimetic characteristics as substrates for human corneal epithelial cells. Journal of biomedical materials research Part A*, 101(4), 1184-1194.

Yang, G., Espandar, L., Mamalis, N., Prestwich, G.D. (2010). *A cross-linked hyaluronan gel accelerates healing of corneal epithelial abrasion and alkali burn injuries in rabbits. Veterinary ophthalmology*, 13(3), 144-150.

Yaşayan, G., Karaca, G., Akgüner, Z. P., & Bal Öztürk, A. (2021). *Chitosan/collagen composite films as wound dressings encapsulating allantoin and lidocaine hydrochloride. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 70(9), 623-635.

Yazdanpanah, G., Jiang, Y., Jabbehdari, S., Anwar, K., Shen, X., An, S., ... & Djalilian, A. R. (2021). *Rheological and Proteomics Characterization of Thermoresponsive Hydrogel from Porcine Cornea Extracellular Matrix for Corneal Tissue Engineering Purposes. Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 62(8), 872-872.

Yemul, O., & Imae, T. (2008). *Synthesis and characterization of poly (ethyleneimine) dendrimers. Colloid and Polymer Science*, 286(6), 747-752.

Yousaf, S., Keshel, S. H., Farzi, G. A., Momeni-Moghadam, M., Ahmadi, E. D., Asencio, I. O., ... & Sefat, F. (2019). Scaffolds for corneal tissue engineering. In *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume Two* (pp. 649-672). Woodhead Publishing.

Yuce-Erarslan, E., Tutar, R., Izbudak, B., Alarçin, E., Kocaaga, B., Guner, F. S., ... & Bal-Ozturk, A. (2021). Photo-crosslinkable chitosan and gelatin-based nanohybrid bioinks for extrusion-based 3D-bioprinting. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 1-12.

Zhou, H., Wang, Z., Cao, H., Hu, H., Luo, Z., Yang, X., ... & Zhou, L. (2019). Genipin-crosslinked polyvinyl alcohol/silk fibroin/nano-hydroxyapatite hydrogel for fabrication of artificial cornea scaffolds—a novel approach to corneal tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(17), 1604-1619.

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

EKLER

EK – 1: İntihal Raporu

EK – 2: Özgeçmiş



EK – 1: İNTİHAL RAPORU

Document Viewer

Turnitin Originality Report

Processed on: 28-Jul-2022 12:29 +03
ID: 1876140510
Word Count: 11594
Submitted: 1

**KORNEA DEFEKTLERİNİN
TEDAVİSİ İÇİN HİDROJEL T... By
Ayşegül Tanrıverdi**

Similarity Index 17%	Similarity by Source Internet Sources: 17% Publications: 0% Student Papers: 1%
---------------------------------------	--

[include quoted](#) [include bibliography](#) [excluding matches < 3 words](#) mode:
quickview (classic) report [print](#) [refresh](#) [download](#)

8% match (Internet from 07-Dec-2021)
<https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12713/2241/690882.pdf?isAllowed=y&sequence=1>

3% match (Internet from 15-Dec-2021)
<https://9lib.net/document/7qvr90gy-okueler-doku-yapistiricilari.html>

1% match (Internet from 10-Jun-2021)
<https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12713/1462/ZeynepPurenAkguner.pdf?isAllowed=y&sequence=2>

1% match (Internet from 30-Dec-2020)
<http://nek.istanbul.edu.tr:4444>

<1% match (Internet from 07-Dec-2021)
<https://acikerisim.istinye.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12713/2242/3.pdf?isAllowed=y&sequence=1>

<1% match (Internet from 20-Aug-2021)
<https://9lib.net/document/1y97k4rq-bile%C5%9Fimine-katk%C4%B1l%C4%B1-biyoaktif-camlardan-kompozit-i%C3%87skelesi-%C3%BCretimi-karakterizasyonu.html>

<1% match (Internet from 12-Dec-2021)
<https://docplayer.biz.tr/186897418-İngilizce-dil-editoru-english-language-editor-dr-sushi-kadanakuppe.html>

<1% match (Internet from 17-Feb-2022)
<http://docplayer.biz.tr>

<1% match (Internet from 22-Mar-2022)
<http://nek.istanbul.edu.tr:4444>

<1% match (Internet from 17-Jan-2022)
<https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/2169230>

<1% match (Internet from 05-Jan-2021)
<https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/1121711>

<1% match (Internet from 16-Nov-2021)
<http://acikerisim.mu.edu.tr>

<1% match (Internet from 23-Mar-2021)

62

EK – 2: ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

- **İsim:** Ayşegül Tanrıverdi

ÖĞRENİM DURUMU

STAJ BİLGİLERİ

YABANCI DİL VE DÜZEYİ

BİLGİSAYAR BECERİLERİ

- Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint) ileri seviye
- Grafik Programları (Adobe Photoshop, Adobe Illustrator, Adobe InDesign) orta seviye

KURSLAR, SERTİFİKALAR VE EĞİTİMLER

- FATİH UNIVERSTY completed the English Preparatory Program(05.04.2012)
- Biyo&Nano Teknoloji Kongresi Katılım Sertifikası (1-3 Ekim 2013)
- Biyoteknoloji Merkezi Sektör Günleri ve Ar-Ge Çalışmaları Katılım Sertifikası (2 Aralık 2013)
- Biyoteknoloji Merkezi Proteomiks Günü Katılım Sertifikası (6 Aralık 2013)

- Biyoteknoloji Alanında Teknoloji Transfer ve Eğitim Merkezi Projesi Tarafından ;
 7 saatlik GDO ANALİZİ Çalıştayına Katılım Sertifikası (30.11.2013)
 5 saatlik BİYOENFORMATİK Çalıştayına Katılım Sertifikası (1.12.2013)
 5 saatlik PROTEİN MODELLEME Çalıştayına Katılım Sertifikası (1.12.2013)
 5 saatlik HÜCRE KÜLTÜRÜ Çalıştayına Katılım Sertifikası (7.12.2013)
 7saatlik PROTEİN TRANSFORMASYON,KARAKTERİZASYON ve SAFLAŞTIRMA Çalıştayına Katılım Sertifikası (8.12.2013)
 14 saatlik GENETİK KLONLAMA Çalıştayına Katılım Sertifikası (14.12.2013)
- ISTANBUL UNIVERSITY XI. IUGEN International Molecular Biology and Genetics Students' Winter School(7-9 March 2014)
- ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ '11.ULUSLARARASI KOGNİTİF NÖROBİLİM KONGRESİ' Katılım Sertifikası(02.05.2014-04.05.2014)
- VİVAMED SAĞLIK ' Topical Gradient 96 REAL-TIME PCR cihazının Uygulama ve Software Eğitimi' Katılımcı Sertifikası(27.09.2014)
- 7 th International Student Congress Of Turgut Özal University Faculty Of Medicine Katılım Sertifikası (8-10.04.2016)
- Kariyer Mimarı Bilişim Teknolojileri Akademisi 'BİLGİSAYARLI MUHASEBE UZMANLIK SERTİFİKASI' (04.01.2017)
- Kariyer Mimarı Bilişim Teknolojileri Akademisi 'GRAFİK TASARIM UZMANLIK SERTİFİKASI' (13.03.2017)
- At Istanbul Personal Development Seminar Organized By Gençlik Duragi, Participation To The Training 'BODY LANGUAGE' is entitled to Receive This Certificate. (15.10.2017)
- At Istanbul Personal Development Seminar Organized By Gençlik Duragi, Participation To The Training 'SOCIAL MEDIA MANAGEMENT' is entitled to Receive This Certificate. (15.10.2017)
- At Istanbul Personal Development Seminar Organized By Gençlik Duragi, Participation To The Training 'EFFECTIVE COMMUNICATION' is entitled to Receive This Certificate. (15.10.2017)
- At Istanbul Personal Development Seminar Organized By Gençlik Duragi, Participation To The Training 'MOTIVATION' is entitled to Receive This Certificate. (15.10.2017)
- 5. BİYOMALZEME GÜNLERİ YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ (22-23 EKİM 2018)
- 6. TÜRK TIP DÜNYASI KURULTAYI (29-31 EKİM 2019)

ORGANİZASYONLAR

- BIO TÜRKİYE ORGANİZASYONU ULUSLARARASI BİYOTEKNOLOJİ KONGRESİ, BIOSPHERE, BIOSTARTHUP ORGANİZASYON KOMİTESİ ÜYESİ (5-7 MART 2020)
- GENÇ İVEK ÖĞRENCİ ZİRVESİ BAŞKANI (10 EKİM 2020)
- BIO TÜRKİYE ORGANİZASYONU ULUSLARARASI BİYOTEKNOLOJİ KONGRESİ, BIOSPHERE, BIOSTARTHUP ORGANİZASYON KOMİTESİ ÜYESİ (9-11 EYLÜL 2021)
- SAĞLIK BİLİM VE TEKNOLOJİLERİ ALANINDA WEBINAR SERİSİ (GENÇ İVEK BAŞKANI-MODERATÖR) (2021)
- BİLİŞİM TEKNOLOJİLERİ ZİRVESİ EĞİTİM KAMPI (ZİRVE BAŞKANI) (2021)

GÖNÜLLÜ DENEYİMLERİ

UZMANLIK ALANLARI

