MENİSKÜS DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN HİBRİT DOKU İSKELELERİN GELİŞTİRİLMESİ

DEVELOPMENT OF HYBRID SCAFFOLDS FOR MENISCUS TISSUE ENGINEERING

GİZEM ZİHNA

PROF. DR HALİL MURAT AYDIN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

Canım Aileme,

ÖZET

MENİSKÜS DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN HİBRİT DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

GİZEM ZİHNA

YÜKSEK LİSANS, BİYOMÜHENDİSLİK A.B.D.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. HALİL MURAT AYDIN

EYLÜL 2021, 131 sayfa

Ortopedi cerrahisinde yürütülen en sık prosedürlerden biri ilerleyen yaş, yaranmalar ve çeşitli travmalar sonucunda meydana gelen menisküs lezyonlarının tedavisidir. Menisküs yaralanmalarındaki artma oranı, efektif bir onarım stratejisi geliştirilmesindeki acil ihtiyacın göstergesi olmaktadır. Doğal menisküs dokusunun mikroskobik ve makroskobik özelliklerini taklit edebilecek bir malzeme halen araştırılmaya devam etmektedir. Tez çalışması kapsamında, menisküs dokularının hücresizleştirilmesi ile ultrayapının korunduğu ve jel sisteminin entegre edilerek *in situ* çapraz bağlanabilir 3B iç içe geçmiş ağ yapılarından oluşan aselüler hibrit iskeleler elde edilmiştir.

Tezin ilk kısmında deselülerizasyon metotlarının bir karşılaştırılması yapılmış; Süperkritik karbon dioksit ($scCO_2$) teknolojsi özgün bir yöntem olarak menisküs dokusunda denenmiştir. Fiziksel ön işlem, tripsin ajanı ile enzimatik ajitasyon ve SDS ajanı ile kimyasal ajitasyonu birleştirilerek % 82 genomik DNA azalmasını sağlayan optimum metot ortaya çıkarılmıştır. $scCO_2$ deselülerizasyonunda ise fiziksel ön işlem ardından tripsin ajanı ile penetrasyon derinliği artırılmış ve 37°C ve 4500 psi basınçta 1 saat prosesin gerçekleştiği grup % 76 DNA azalması ile optimum grup olarak

belirlenmiştir. H&E ve DAPI boyamaları ile de grupların hücresizleştirildiği kanıtlanmıştır. Kolajen fiberlerin görüntülenmesi Masson Trichrome boyaması; proteoglikan yapılarının dokudaki varlığı Safranin/FCF boyaması ile sağlanmıştır. Histolojik çalışmalara senkronize olan biyokimyasal analizlerde ise Hidroksiprolin analizi ile kolajen miktarlarında değişme yaşanmadığı fakat DMMB analizinde GAG miktarında konvansiyonel deselülerizasyon grubunda % 42 ve $scCO_2$ grubunda % 58 azalma yaşanmıştır. Her iki grupta da yaş ve kuru ağırlıklarında düşüşler yaşanırken $scCO_2$ grubunda daha fazla azalma görülmüştür. SEM analizi ile kolajen demetlerinin organizasyonuna bakılmış ve deselülerizasyon sonucu minör gevşemeler bulunmuştur. GAG kaybına bağlı olarak deselülerize dokularda kompresif modulüsleri 22,8 ± 0,91 MPa'dan konvansiyonel deselülerize iskelede 15,26 ± 0,28 MPa ve scCO deselülerize dokuda 14,49 ± 0,48 MPa 'a düşüş yaşanmıştır. MTT elüsyon metodu ile sitotoksisite testi yapılan dokularda her iki grubun da % 75 üzeri hücre canlılığı tespit edilmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde hibrit yapıların sentezlenebilmesi için polimer karışımları ve foto başlatıcı optimizasyonu yapılmıştır. Öncellikle jelatin molekülü metakrilik anhidrit eklenerek fonksiyonelleştirilmiş ve fonksiyonelleşme derecesi ^{1}HNMR analizi ile %75 bulunmuştur. LAP foto başlatıcısının absorbsiyonunun UVA ışık spektrumu ile çakışması hızlı bir in *situ* polimerizasyon sağladığı görülmüştür. GelMA ve desteklediği hidrojellere, LAP ve I2959 ile UV ışık altında çapraz bağlanarak oluşturulan yapılara, şişme, mekanik ve FTIR analizleri yapılmıştır. Tek fazdan ise 2 fazlı hidrojellerin daha stabil ve dayanıklı yapılar olduğu gözlenmiştir. HAMA molekülü 3. Fazı sağlaması adına yapılara eklenmiş ve en yüksek mekanik dayanımı sağlayan grup olmuştur.

Nihai alternatif aselüler iskelenin üretilmesinde GelMA-Hibrit(G-Hibrit), PEGDMA/HAMA-Hibrit(PG-Hibrit) ve PEGDMA/GelMA/HAMA-Hibrit(PGH-Hibrit) yapıları LAP foto başlatıcısı ile oluşturulmuştur. Pre-jeller 5 mm kuru doku iskelesine emdirilmiş ve inkübasyonu sağlanmıştır. UV ışık ile arkalı önlü çapraz bağlanan gruplardaki kimyasal değişimler FTIR analizi ile incelenmiş ve karakteristik pikleri ortaya konulmuştur. Şişme testi ile çapraz bağlanan iskelelerdeki su alma kapasiteleri ölçülmüş ve çapraz bağlanan iskelelerin doğal dokuya yakın şişme fenomeni gösterdiği bulunmuştur. Basma analizi ile mekanik dayanımındaki iyileşmeler çapraz bağlı iskelelerde görülmüş ve buradan çapraz bağlama yoğunluğu en fazla olan PGH-Hibrit grubu bulunmuştur. Aselüler iskelelerin termal özelliklerinin saptanabilmesi için TGA

ve DSC analizi yapılmış ve çapraz bağlanmış yapıların dekompozisyon ve protein denatürasyon sıcaklıklarında iyileşmeler gözlenmiştir. SEM ile doku iskeleleri içerisindeki 3B hidrojel yapılarının kolajen fiberleri kaplaması görüntülenmiştir. Çapraz bağlanan iskeleler PBS ve enzimatik degredasyonda % 25 altı ağırlık kaybı ile doğal dokuya benzer bir davranış sergilemiştir. Deselülerize ve hibrit iskelelere L929 hücre hattı kullanılarak Alamar Mavisi ile 1., 4. ve 7. günlerdeki hücre proliferasyonu incelenmiştir. 1. günde kontrol gruba göre % 80 üstü olan canlılık hibrit yapılarda 7. günde daha fazla yükseliş göstererek kontrol grup ile yakın olmuştur. Burada GelMA ve HAMA polimerinin hücrenin göçü ve proliferasyonunda daha etkin olduğu PGH-Hibrit grubunda görülen hücre canlılık oranının en yüksek olması ile anlaşılmıştır. Oluşturulan biyomalzemenin ayarlanabilen fizikokimyasal ve mekanik özellikleri ile menisküs doku mühendisliğinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Menisküs doku mühendisliği, deselülerizasyon, fotopolimerizasyon, hibrit yapılar, hidrojeller

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF HYBRID SCAFFOLDS FOR MENISCUS TISSUE ENGINEERING

GİZEM ZİHNA

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. HALİL MURAT AYDIN

SEPTEMBER 2021, 131 pages

Treatment of meniscal tears that occur as aging, injuries, and various traumas is one of the most performed in orthopedic surgery. The increasing rate of meniscal injuries indicates the urgent need to develop an effective repair strategy. A biomaterial that can mimic the microscopic and macroscopic properties of natural meniscus tissue is still under investigation. Within the scope of the thesis study, acellular hybrid scaffolds consisting of *in situ* cross-linkable 3D interpenetrating mesh structures were obtained by decellularization of the meniscus tissues, in which the ultrastructure was preserved and following by integrating the gel system.

In the first section of studies, the comparison between decellularization methods was made; supercritical carbon dioxidee ($scCO_2$) technology was tried by the original method for meniscus tissue. By combining physical pretreatment, enzymatic agitation with trypsin agent (0,05%), and SDS (0,5 %) chemical agitation was found out an optimum method that ensures decreased 82% genomic DNA. For $scCO_2$ decellularization protocol, physical pretreatment is performed and after that penetration

depth is yielded by trypsin agent. And then decellularization group with diminished 76 % genomic DNA is obtained by 37°C temperature and 4500 psi pressure. Decellularized tissue was confirmed by H&E and DAPI staining also. Masson Trichrome and Safranin/FCF staining viewed collagen fibers and proteoglycans structure in tissue. Biochemical studies that synchronized to histologic studies carried out collagen and GAG amount to determine whether decreased or not. While collagen amount is not changed in decellularized groups according to hydroxyproline assay, GAG amount in conventional group and $scCO_2$ group was decreased by respectively 48% and 58% seeing that DMMB analysis. Both two processes were caused by decreased wet and dry weight of decellularized tissues, but $scCO_2$ group has been in a higher decline than conventional. The organization of collagen fibrils was scanned by SEM analysis, and it was observed minor loosen around fibers after decellularization. In the native tissue (22.8 ± 0.91 MPa) compressive modulus was diminished as to 15,26 ± 0.28 MPa in conventional and 14.49 ± 0.48 MPa in $scCO_2$ group based on GAG reduction. Both processes were obtained beyond 75% cell viability in cytotoxicity analysis via MTT extraction method.

In the second section of the study, with the intent of synthesizing hybrid constructs, there was working on optimization of polymer blends and photoinitiators choosing. Firstly, the gelatin molecule was functionalized by adding methacrylic anhydride and the degree of functionalization was found to be 75% by ^{1}HNMR analysis. Owing to overlaying absorbances of LAP photoinitiator and UVA light spectrum was resulted with provided fast in situ polymerization. GelMA and GelMA supported hydrogels were conducted both of I2959 and LAP. Swelling, mechanical and FTIR analysis were got on hydrogels. It has been observed that 2-blend (GelMA/PEGDMA) hydrogels are more stable and durable structures than single-phase ones. With the incorporating HAMA molecules, 3-blends hydrogels were the highest mechanical strength and were more resistant to swell than other blends.

G-Hybrid, PG-Hybrid, and PGH-Hybrid constructs that generated final alternative decellularized scaffolds were produced by LAP photoinitiators. Following pre-gels immersed through sonicator within 5 mm dry scaffolds was incubated 37°C for avoiding gelation before crosslinking. Subsequently, acellular scaffolds that trapped hydrogels are polymerized with UVA light by turning both sides. Chemical changes

were determined with FTIR and presented characteristic peaks in native, decellularized and hybrid structures. Water uptake capacities in cross-linked hybrid structures were measured in swelling studies; it was found that hybrid scaffolds are similar to native tissues about swelling phenomena. Enhanced mechanical properties were seen at crosslinked scaffolds by compressive analysis and also in the PGH-hybrid group was found the highest crosslink density due to 3 polymer blends. TGA and DSC analysis were used to establish thermal properties in acellular scaffolds. Protein denaturation where H-bond broke down between triple helix structure in collagen fibers and decomposition transition temperatures were improved by adding hydrogels to acellular scaffolds according to these analyses. Hydrogels in scaffolds that are covering collagen fibrils were monitored with SEM. Cross-linked acellular scaffolds have exhibited a behavior close to native tissues with below 25% mass loss in PBS and enzymatic degradation. Cell viability and proliferation were examined through Alamar Blue, on 1st, 4th, 7th days, with L929 cell line in acellular hybrid scaffolds. On the first day, cell viability in hybrid constructs has been above 80% while on the 7th day it is established to further increase and close to the control group. Such rising that seen in the hybrid structure have proved that GelMA and HAMA biopolymers are attractive for cell migration and proliferation. It was concluded that the created biomaterial could be used in meniscus tissue engineering with its tunable physicochemical and mechanical properties.

Keywords: Meniscus tissue engineering, decellularization, photopolymerization, hybrid structures, hydrogels

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana maddi ve manevi hep destek olan, bilimsel çalışmalarda beni hep ileri adımlara taşıyan, bilgi ve deneyimleri ışığında bana yol gösteren ve bütün tez çalışmalarım boyunca bana güvenen ve cesaretlendiren çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Halil Murat AYDIN'a;

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde yardımcı olan ve bana gerekli imkanı sağlayan saygı değer hocam Sedat ODABAŞ ve çalışma ekibine;

Tez çalışmalarımın tamamlanmasında desteklerini esirgemeyen ve imkan sağlayan BMT Grup Ailesine;

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (BAP), FYL-2020-18602 numaralı proje ile sağlanan maddi desteklerinden dolayı;

3 yıl boyunca her zaman yanımda olan, arkadaşlıkları ile beni motive eden, yardımsever ve pozitif kişilikleri ile güzel bir çalışma ortamı yaratan Ahsen SEYREK'e, Bengisu TOPUZ'a, Gülçin Günal KARATAŞ'a, Safa KARARMAZ'a, Selcan GÜLER'e ve Zeynep ÇAĞLAR'a;

Her adımımda arkamda olan, maddi ve manevi anlamda destekleyen, bu süreçte beni hiç yalnız bırakmayan annem Mazes ZİHNA'ya, babam Kadri ZİHNA'ya, ablam Gülçin ZİHNA'ya;

Öğrenci Evlerinde kurduğum o güzel dostluklarından dolayı yurt arkadaşlarıma;

Tez çalışmalarım boyunca gece ve gündüz bana yaverlik yapan ve Hacettepe Üniversitesi kampüsünü güzelleştiren Pofuduk, Zuko, Zarife ve Şanslı Bebek'e;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım…

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT iv
TEŞEKKÜR vii
İÇİNDEKİLER viii
ŞEKİLLER DİZİNİ xii
ÇİZELGELER DİZİNİ xv
SİMGELER VE KISALTMALAR xvi
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Menisküs Yapısı ve Fonksiyonu 3
2.1.1. Menisküs Anatomisi ve Vasküleritesi 3
2.1.2. Biyokimyasal Kompozisyonu 5
2.1.3. Fonksiyonu ve Mekanik Özellikleri 7
2.2. Menisküs Yaralanmaları ve Tedavileri 9
2.2.1. Yaralanma Tipleri 9
2.2.2. Menisküs Yaralanmalarında Tedavi Yöntemleri 11
2.2.3. Menisküs Allogreft Transplantasyonu (MAT) ve Ticari İmplantlar 12
2.3. Menisküs Doku Mühendisliği 13
2.3.1. Menisküs Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler 14
2.3.1. Menisküs Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler 16
2.4. Doku Mühendisliğindeki Hücresizleştirme Yaklaşımı 17
2.4.1. Konvansiyonel Deselülerizasyon Ajanları ve Teknikleri 18
2.4.1.1. Fiziksel Teknikler 18
2.4.1.2. Kimyasal Ajanlar 19
2.4.1.3. Enzimatik Ajanlar 20
2.4.2. Süperkritik Akışkan Teknolojisi ile Deselülerizasyon 21
2.4.3. Menisküs Dokusu ile Yapılan Hücresizleştirme Çalışmaları 22

2.5. *In situ* Fotopolimerizasyon ve Özellikleri 23
2.5.1. Polimerizasyon Mekanizması ve Fotobaşlatıcılar 24
2.5.2. Fotoçapraz Bağlanabilen Polimerler 26
2.5.2.1. Fonksiyonelleştirilmiş Jelatin (GelMA) 26
2.5.2.2. Poli (etilen glikol) dimetakrilat (PEGDMA) 26
2.5.2.3. Metakrilanmış Hyaluronik Asit (HAMA) 27
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 28
3.1. Tez çalışmasında Kullanılan Malzemeler 28
3.2. Deselülerize Menisküs Dokularının Hazırlanması 29
3.2.1. Menisküs Diseksiyonu 29
3.2.2. Konvansiyonel Deselülerizasyon Protokollerinin Optimizasyonu 30
3.2.3. Süper Kritik Akışkan Teknolojisi ile Deselülerizasyon Protokollerinin Optimizasyonu 32
3.2.4. Deselülerize Menisküs Dokularının Karakterizasyonları 33
3.2.4.1. Histolojik Analizler 33
3.2.4.1.1. Hematoksilen & Eozin (H&E) Boyaması 34
3.2.4.1.2. 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) Boyaması 34
3.2.4.1.3. Masson Trichrome Boyaması 35
3.2.4.1.4. Safranin/Fast Green Boyaması 35
3.2.4.2. Biyokimyasal Analizler 35
3.2.4.2.1. Genomik DNA Tayini 36
3.2.4.2.2. Toplam Kolajen Miktar Tayini 36
3.2.4.2.3. Toplam GAG Miktar Tayini 37
3.2.4.3. Yaş ve Kuru Ağırlık Değişimleri 37
3.2.4.4. Morfolojik Analiz 38
3.2.4.5. Taramalı Elektron Mikroskobi (SEM) Analizi 38
3.2.4.6. Biyomekanik Analizi 38
3.2.4.7. Sitotoksisite Analizi 38
3.3. Foto Çapraz Bağlanabilen Hidrojellerin Hazırlanması 39
3.3.1. Metakrilanmış Jelatinin Sentezi (GelMA) ve Fonksiyonelleşme Derecesinin Hesaplanması 40

3.3.2. Hibrit İskelede Kullanılacak Hidrojellerin Optimizasyonu ve Karakterizasyonları 41
3.3.2.1. UV Absorbans Analizi 42
3.3.2.2. Şişme Testi ve Sol Fraksiyon Analizi 42
3.3.2.3. Biyomekanik Analiz 43
3.3.2.4. Kimyasal Analiz 43
3.4. Hibrit Doku İskelelerinin Hazırlanması 43
3.4.1. Hibrit Doku İskelelerinin Karakterizasyonları 44
3.4.1.1. Morfolojik Analiz 45
3.4.1.2. FTIR Analiz 45
3.4.1.3. Şişme Testi ve Sol Fraksiyon Analizi 45
3.4.1.4. Mekanik Analiz 46
3.4.1.5. Termal Analiz 46
3.4.1.6. SEM Analizi 47
3.4.1.7. Degredasyon Testi 47
3.4.2. *In Vitro* Çalışmalar 48
3.4.2.1. Hücrelerin Kültürü ve Ekimi 48
3.4.2.2. Hücre Canlılık Analizi 49
3.5. İstatistiksel Çalışmalar 49
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 50
4.1. Deselülerize Menisküs Dokularının Hazırlanması 50
4.1.1. Konvansiyonel Yöntemlerle Deselülerize Edilen Grupların Karakterizasyonları 50
4.1.1.1. Histolojik Çalışmalar 50
4.1.1.2. Biyokimyasal Analizler 58
4.1.2. Süperkritik Akışkan Teknolojisi ile Deselülerize Edilen Grupların Karakterizasyonları 62
4.1.2.1. Histolojik Çalışmalar 62
4.1.2.2. Biyokimyasal Analizler 68
4.1.3. Menisküs Deselülerizasyonunda Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması 70
4.1.3.1. Morfolojik Analiz 71

4.1.3.2. Su Tutma Kapasitesi ve Ağırlık Değişimleri 72
4.1.3.3. Taramalı Elektron Mikroskobisi (SEM) Analizi 73
4.1.3.4. Mekanik Analiz 75
4.1.3.5. Sitotoksisite Analizi 77
4.2. Fotoçapraz bağlanabilen Hidrojellerin Sentezi ve Karakterizasyonları 78
4.2.1. Fonksiyonelleştirilmiş Jelatinin (GelMA) Karakterizasyonu 79
4.2.2. GelMA Destekli Hidrojellerin Karakterizasyonları 81
4.2.2.1. UV Absorbans Tayini 82
4.2.2.2. Morfolojik Analiz 84
4.2.2.3. Şişme ve Sol Fraksiyon Testi 84
4.2.2.4. Mekanik Analiz 86
4.2.2.5. FTIR Analizi 88
4.3. Hibrit Nihai Menisküs İskelelerinin Karakterizasyonları 90
4.3.1. Morfolojik Analiz 92
4.3.2. FTIR Analizi 93
4.3.3. Şisme ve Sol Fraksiyon Testi 96
4.3.4. Mekanik Özelliklerinin Tayini 97
4.3.5. Termal Analiz 100
4.3.6. Taramalı Elektron Mikroskobi (SEM) Analizi 105
4.3.7. PBS ve Enzimatik Degredasyon Analizi 106
4.3.8. *In Vitro* Çalışmalar 108
4.3.8.1. Alamar Mavisi Testi 109
5. YORUM 111
6. KAYNAKLAR 118
EKLER 129
EK 1 – Kalibrasyonlar 129
ÖZGEÇMİŞ 131

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Meniskal bağlantılarıların anterior ve superior taraftan görünümü [1]. 4
Şekil 2. 2. Menisküs vaskülerizasyonunun şematik gösterimi [14]. 5
Şekil 2. 3. Menisküs Dokusundaki Kolajen Organizasyonu [17]. 6
Şekil 2. 4. Menisküs Dokusunda Görülen Hücre Morfolojileri.(a)- yüzeysel hücreler, (b)- fibroblast benzeri hücreler, (c)- fibrokondrosit benzeri hücreler, (d)- kondrosit benzeri hücreler [22]. 7
Şekil 2. 5 . Menisküs dokusuna etki eden kuvvetler ve dağılımları [24]. 8
Şekil 2. 6. Menisküs yırtıklarının tipleri. (A) Normal menisküs, (B) Radyal yırtık, (C) çevrimsel yırtık, (D) Horizontal flap, (E) Vertikal flap, (F) Kova sapı yırtığı, (G) Oblik yırtık, (H) Kompleks yırtık, (I) Horizontal yırtık, (İ) Boynuz yırtıkları. [33]. 10
Şekil 2. 7. Hiç işlem görmemiş diz eklemi için tibial platonun üzerine düşen temas gerilimi (A), menisektomi yapılmış bir dizdeki gerilim büyüklüğünün küçük alanda toplanarak artması (B). [42]'den uyarlanmıştır. 12
Şekil 2. 8. Süperkrititk CO_2'in kritik noktasını gösteren grafik [85]. 21
Şekil 2. 9. Serbest Radikal Polimerizasyonun Basamakları. 25

Şekil 3. 1. Tez Çalışmasındaki Adımlar. 28
Şekil 3. 2. Menisküs diseksiyonununda (A) Diz ekleminin genel görüntüsü, (B) tibia yüzeyinin süperior görüntüsü, (C) disekte edilmiş menisküs dokuları. 30
Şekil 3. 3. GelMA polimerinin sentez aşamaları. 40

Şekil 4. 1. İşlem görmemiş menisküs dokusu (kontrol) ve deselülerizasyon gruplarının H&E boyamaları. (A)-kontrol, (B)-G-1, (C)-G-2, (D)-G-3, (E)- G-4, (F)-G-5, (G)-G-6, (H)- 51
Şekil 4. 2. İşlem görmemiş (kontrol) ve deselülerize grupların DAPI boyamaları. (A)-kontrol, (B)-G-1, (C)-G-2, (D)-G-3, (E)-G-4, (F)-G-5, (G)-G-6, (H)-G-7. (10X) 53
Şekil 4. 3. Kontrol ve Deselülerize Menisküs Dokularının Masson Trichrome boyaması. (A)-kontrol, (B)-G-2.Grup, (C)-G-5.Grup, (D)-G-6.Grup, (E)-G-7.grubun (10X). 55
Şekil 4. 4. İşlem görmemiş doku (kontrol) ve optimal deselülerizasyon gruplarının Safranin-O/FCF boyaması. (A) Kontrol, (B) G-2, (C) G-5, (D) G-6, (E) G-7 (10X). 57
Şekil 4. 5. İşlem görmemiş menisküs dokusu ve konvansiyonel deselülerize grupların DNA miktarını gösteren histogram grafiği. **** P <0.0001. 58
Şekil 4. 6. Konvansiyonel deselülerize gruplarının kolajen miktar tayinini gösteren histogram grafiği (*p<0,05) 60
Şekil 4. 7. Konvansiyonel deselülerize gruplarının GAG içeriğini gösteren histogram grafiği. 61
Şekil 4. 8. İşlem görmemiş (kontrol) ve $scCO_2$ deselülerize menisküs dokularının H&E boyamaları. (A)-kontrol, (B)- SK-1, (C)- SK-2, (D)- SK-3, (E)- SK-4, (F)- SK-5, (G)- SK-6 (10X). 63
Şekil 4. 9. İşlem görmemiş (kontrol) ve $scCO_2$ deselülerize menisküs dokularının DAPI boyamaları. (A)-kontrol, (B)- SK-1, (C)- SK-2, (D)- SK-3, (E)- SK-4, (F)- SK-5, (G)- SK-6 (10X). 65

Şekil 4. 10. İşlem görmemiş doku (kontrol) ve $scCO_2$ deselülerize gruplarının Masson Trichrome boyamaları. (A)- kontrol, (B)- SK-5 , (C)- SK-6 (10X). 66
Şekil 4. 11. İşlem görmemiş doku (kontrol) ve $scCO_2$ deselülerize gruplarının Safranin-O/FCF boyamaları. (A)- kontrol, (B)- SK-5 , (C)- SK-6 (10X). 67
Şekil 4. 12. İşlem görmemiş doku (kontrol) ve $scCO_2$ deselülerize grupların DNA miktarını gösteren histogram grafiği. **** p <0.0001 68
Şekil 4. 13. $scCO_2$ deselülerize grupların kolajen miktar tayinini gösteren histogram grafiği (*p<0,05). . 69
Şekil 4. 14. $scCO_2$ deselülerize gruplarının GAG miktar tayinini gösteren histogram grafiği (**p<0,01). 70
Şekil 4. 15. İşlem görmemiş doku (kontrol) ve deselülerize gruplarının morfolojik görüntüleri. (A) İşlem görmemiş doku, (B) Konvansiyonel Deselülerize grubu, (C) $scCO_2$ Deselülerize grup. 71
Şekil 4. 16. İşlem görmemiş doku (kontrol) ve deselülerizasyon gruplarının yaş ve kuru ağırlık tayinini gösteren histogram grafikleri (*p<0.05) (**p<0.01). 72
Şekil 4. 17. İşlem görmemiş (doğal) dokunun enine ve boyuna kesitlerinin (A, B); Konvansiyonel optimal deselülerize grubun enine ve boyuna kesitlerinin (C, D); $scCO_2$ optimal deselülerize grubun enine ve boyuna kesitlerinin (E, F) SEM görüntüleri. (1000X) 74
Şekil 4. 18. İşlem görmemiş (doğal menisküs) ve deselülerize grupların gerilim-gerinim eğrisi. 75
Şekil 4. 19. İşlem görmemiş (Kontrol) ve deselülerize grupların elastik ve kompresif modulüslerini gösteren histogram grafikleri. (*p<0.05), (**p<0.01). 77
Şekil 4. 20. Deselülerize grupların % hücre canlılığını gösteren histogram grafiği. 78
Şekil 4. 21. GelMA-1 (A), GelMA-2 (B) ve Jelatin (C) için ^{1}H-NMR analizindeki piklerin integral alanları. 79
Şekil 4. 22. GelMA ve jelatin piklerin karşılaştırmasını gösteren çakıştırma spektrumu. 80
Şekil 4. 23. Polimerizasyon öncesi ve 300 saniye sonrası (A) LAP ve (B) I2959 fotobaşlatıcılarının sol-gel yapıları. 82
Şekil 4. 24. I2959 ve LAP fotobaşlatıcılarının 200-400 nm dalga boyları arasındaki absorbans spektrumu. 83
Şekil 4. 25. (A) G-I2959, (B) G-LAP, (C) PG-I2959, (D) PG-LAP ve (E) PGH-LAP hidrohellerinin makroskobik görüntüleri. 84
Şekil 4. 26. Hidrojellerin zamana bağlı şişme oranlarını gösteren çizgi grafiği. 85
Şekil 4. 27. Hidrojellerin Sol Fraksiyon oranını gösteren grafik (*p<0.05). 86
Şekil 4. 28. Oluşturulan hidrojellerin gerilim-gerinim grafiği. 87
Şekil 4. 29. Hidrojellerin (A) Elastik modulüsleri ve (B) Kompresif modulüslerini gösteren histogram grafiği. (**p<0.01)(***p<0.001)(****p<0.0001) 87
Şekil 4. 30. Hidrojellerin çakıştırmalı olarak verilen FTIR spektrumları. 89
Şekil 4. 31. Çapraz bağlandıktan sonra hibrit iskelelerin iç kısımlarının makroskobik görüntüleri. (A) 1. Grup (72 saat inkübasyon), (B) 2. Grup (4 saat inkübasyon), (C) 3. Grup (4 saat inkübasyon + DHT) (37°C, 28 mbar), (D) 4. Grup (4 saat sonikasyon + 1 gece inkübasyon). 91

Şekil 4. 32. Pre-jelin aselüler iskeleye emdirilmesinde kullanılan yöntemlerin (A) % şişme oranı ve (B) % sol fraksiyonunu gösteren grafik. (*p<0.05)(**p<0.001) 92
Şekil 4. 33. (A) G-Hibrit, (B) PG-Hibrit ve (C) PGH-Hibrit iskelelerinin çapraz bağlama öncesi (sağ) ve sonrasının (sol) morfolojik görüntüleri. 92
Şekil 4. 34. (A) G-Hibrit, (B) PG-Hibrit ve (C) PGH-Hibrit iskelelerin hiç işlem görmemiş ve deselülerize iskeleler ile çakıştırmalı FTIR spektrumları. 94
Şekil 4. 35. Hibrit aselüler iskelelerin (A) zamana bağlı olarak % şişme davranışlarını ve (B) % sol fraksiyonunu gösteren grafikler. 96
Şekil 4. 36. Hiç işlem görmemiş, deselülerize ve hibrit yapıların gerilim-gerinim grafikleri. 98
Şekil 4. 37. Hiç işlem görmemiş, deselülerize ve hibrit yapıların (A) Elastik modulüsleri ve (B) Kompresif modulüslerini gösteren histogram grafikleri. (*p<0.05)(**p<0.01). 99
Şekil 4. 38. Hiç işlem görmemiş, deselülerize ve hibrit yapıların termogram grafikleri. 101
Şekil 4. 39. Hiç işlem görmemiş, deselülerize ve hibrit yapıların sıcaklığa bağlı ısı akış grafikleri. 104
Şekil 4. 40. Deselülerize dokunun 1 kX ve 5 kX 'deki enine kesitlerinin (A, D); PGH-Hibrit grubunun 1 kX VE 5 kX'deki enine kesitlerinin (B, E); PG-Hibrit grubunun 1 kX ve 5 kX'deki enine kesitlerinin (C, F); deselülerize dokunun 1 kX ve 5 kX'deki boyuna kesitlerinin (G, J); PGH-Hibrit grubunun 1 kX ve 5 kX'deki boyuna kesitlerinin (H, K); PG-Hibrit grubunun 1 kX ve 5 kX'deki boyuna kesitlerinin (I, L) SEM görüntüleri. 105
Şekil 4. 41. Hiç işlem görmemiş, deselülerize ve hibrit yapıların (A) PBS içinde ve (B) enzimatik solüsyon içinde zamana bağlı olarak % degradasyonunu gösteren grafikler. 108
Şekil 4. 42. L929 hücrelerinin P9 pasajındaki 2 gün sonundaki flask üzerindeki görünümleri. 108
Şekil 4. 43. Alamar Mavisi Analizinin 1., 4. Ve 7. günlerinin gruplardaki absorbans değerlerinin gösteren histogram grafiği. 110

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Menisküs doku mühendisliğinde çalışılan sentetik/biyolojik polimerler 14
Çizelge 2. 2. Menisküs Deselülerizasyon Çalışmaları 22

Çizelge 3. 1. Konvansiyonel Deselülerizasyon Protokolleri 30
Çizelge 3. 2. Süperkritik akışkan teknolojisi ile yapılan deselülerizasyon grupları. 32
Çizelge 3. 3. Jel emdirme yöntemlerinin prosesleri 44

Çizelge 4. 1. İşlem görmemiş (kontrol) ve deselülerize gruplarında kalan artık DNA miktarı ve yüzde azalışı. 59
Çizelge 4. 2. Doğal ve deselülerize menisküs dokularının mekanik özellikleri. 76
Çizelge 4. 3. Hidrojel sentezi için kullanılan grupların kısaltmaları ve jelleşme süreleri. 81
Çizelge 4. 4. Doğal, deselülerize ve hibrit menisküs iskelelerinin 5 mm kuru ağırlık oranları. 93
Çizelge 4. 5. Doğal, deselülerize ve hibrit iskelelerinin elastik ve kompresif modulüslerinin ortalama değerleri 100
Çizelge 4. 6. Hiç işlem görmemiş, deselülerize ve hibrit grupların TGA termogramından elde edilen veriler. 102

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

MD	Metakrilasyon Derecesi
n	Molar çapraz bağlama yoğunluğu (mol/cm³)
R_i	Fotopolimerizasyon başlangıç hızı
ε	Molar sönümleme katsayısı (1/M.cm)

Kısaltmalar

AÇB	Arka Çapraz Bağlar
DAPI	4′,6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMMB	Dimetilen Mavisi
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNAaz	Deoksiribonükleaz
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
ECM	Ekstra Selüler Matriks
FBS	Fetal Sığır Serumu
FDA	Gıda ve İlaç Kurumu
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit disodyum dihidrat tuzu
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
GAG	Glikozaminoglikan
GelMA	Metakrilanmış Jelatin
HA	Hyaluronik Asit
HAMA	Metakrilanmış Hyaluronik Asit

HCI	Hidroklorik asit
HNMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
H&E	Hematoksile&Eozin
I2959	2-Hydroxy-4′-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone
KMI	Kolajen Menisküs İmplant
LAP	Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate
LM	Lateral Menisküs
MA	Metakrilik Anhidrit
MAT	Menisküs Allogreft Transplantasyonu
MM	Medyal Menisküs
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NACI	Sodyum Klorür
NAOH	Sodyum Hidroksit
ÖÇB	Ön Çapraz Bağlar
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PCL	Polikaprolakton
PEG	Poli(Etilen Glikol)
PEGDMA	Poli(Etilen Glikol) Dimetakrilat
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik-*co*-glikolik asit
PMCP	Perimeniskal Capillary Plexus
PU	Poli üretan
RGD	Arjinin- Glisin- Aspartik asit
RNA	Reoksiribonükleik asit
$scCO_2$	Süperkritik karbondioksit

SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TGA	Termogravimetrik Analiz

1. GİRİŞ

Osteoartrit gelişimiyle sonuçlanan menisküs lezyonları diz ekleminde görülen en sık yaralanmalardan biridir. Amerika'da her yıl gerçekleştirilen 1,500,000 artroskopik diz eklem cerrahisinden yaklaşık %50'si bu yapılardan olan menisküs ile ilişkilidir. Bu oranın dünya genelinde 2 katı olduğu düşünülmektedir [1]. Söz konusu yaralanmalar, femur ve tibia arasındaki anormal bir yüzey meydana getirmesiyle dize gelen yüklerin yeniden dağılımını tetiklemektedir. Diz biyomekaniğinde meydana gelen bu değişiklikler tedavi edilmez ise bireyin hareket kabiliyetini etkileyebilmektedir. Menisküs dokusunun hipohücresillik ve hipovasküleritesinden dolayı kendiliğinden onarım mekanizması sınırlı olmaktadır.

Fibrin yapıştırıcılar, zımbalar ve sutür teknikleri belli bir yere kadar onarım sağlandığı için meniskal yaralanmaların yaklaşık olarak % 85'i cerrahi işlemleri gerektirir. Tedavinin altın standardı olarak kabul edilen kısmi ya da total menisektomi ise menisküs aşınmalarında sıklıkla uygulanmaktadır [2]. Kısa dönemde ağrı, şişlik, güç kaybı gibi semptomların azalmasını sağlayan tedavinin geniş zaman aralığındaki incelemelerinde eklem aralığının darlığı, kıkırdak dejenerasyonu ve osteoartrit gelişimi gözlenmiştir [3]. Menisektomi yapılan dizde allogreft trasplantasyonu diz fonksiyonunun gelişimi ile hastaların yaşam kalitesini artırabilmektedir. Fakat implantın hastalık taşıma riski, ulaşım zorluğu, ekonomiklik yönü vb. dezavantajları kullanımlarını kısıtlar. Zenogreftler bu dezantajları indirgeyebilse de immün risk hala ortopedi cerrahisinde problem olarak kalmaktadır.

Doku mühendisliği yaklaşımları menisküs dokusununun rejenerasyonu için umut vaat eden alternatif tedavileri sunmaktadır. Piyasada bulunan kolajen menisküs (KMI), Actifit ve NUSurface implantları dejeneratif aşınmalarda kullanılmasıyla menisküs onarımını sağlar. Yine de biyomekanik özelliklerini tam karşılayamadığı, implantın ekstrüze olması ve erken degradasyonuyla destek malzeme niteliğini kaybettiği için klinik çalışmaların alternatif iskelelere yönelimi sağlamaktadır. Menisküsün doğasından ötürü ideal doku onarımında; histoyapısı ve anizotropik biyomekanik özellikleri bakımından doğal dokuyu mimik edebilecek bir implanta ihtiyaç devam eder.

Hücresizleştirilmiş iskeleler mikroyapının sürdürülmesi ile hücre ekimi ve proliferasyonu için biyolojik olarak aktif olan, ayrıca ECM kompozisyonunda

gerçekleşen minimum değişiklikler sayesinde mekaniksel davranışlarının da korunduğu biyomimetik implantlardır. Deselülerizasyon stratejilerinde sadece hücrelerinden arındırılmış non-immünojenik iskeleler elde etmek değil aynı zamanda yapıdaki protein ve protein bazlı bileşenlerin sürdürülmesini amaçlar. Menisküs deselülerizasyon yöntemlerinde enzimatik, kimyasal ve fiziksel muameleler ve bunların kombinasyonları sıklıkla kullanılmaktadır.

Sunulan tez çalışmasında fiziksel, enzimatik ve kimyasal ajitasyon ile menisküs dokusun intakt yapısını koruyabilecek şekilde hücresizleştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca fibröz kıkırdak dokuda ilk defa denenecek olan süperkritik akışkan karbondioksit teknolojisi ile deselülerizasyon yöntemi karşılaştırma için kullanılmıştır. Histolojik çalışmalar, biyokimyasal analizler, mekanik analiz ve ultrayapının mikroskobik olarak görüntülenmesi hücresizleştirmedeki yöntemlerin başarısı için bakılmıştır.

Çalışmanın ikinci kapsamında hibrit iskele üretiminde kullanılacak hidrojellerin serbest radikal polimerizasyonu için parametreleri optimize edilecektir. Jelatin molekülü modifiye edilerek, poli (etilen glikol) ve hyaluronik asit bazlı bileşenlerin fonksiyonelleştirilmiş türleri ile birleştirilip UV ışık altında çapraz bağlama verimliliği saptanmıştır.

Hibrit aselüler iskelelerin belirlenen öncü jel formlarıyla entegrasyonu ve ardından UV ışık altında *in situ* çapraz bağlanabilirliği üçüncü adımda incelenmiştir. Son zamanlarda revaçta olan hidrojel sistemlerinin bu çalışmada kullanılması deselülerizasyona sonucu oluşabilecek mekanik dayanımdaki düşüş ve GAG miktarında azalmasından doğan dezavantajları minimuma indirmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda, şişme testi ve mekanik analiz ile su tutma oranı ve mekanik davranışındaki değişimler tayin edilmiştir. Jel yapının eklenmesi sonucu kimyasal yapıdaki değişim ve termal özelliklerindeki değişime FTIR ve TGA, DSC analizleri ile bakılmıştır. Özellikle iskele içerisindeki jel yapının görüntülenmesi ve çapraz bağlama sonucu kolajen fiberlerin morfolojisi elektron mikroskobisi ile analiz edilmiştir. Hibrit iskelelerin degredasyon çalışması PBS ve enzimatik solüsyonlarda yürütülmüştür. Son olarak biyomalzemenin sitototoksisitesine bakılacak ve hidrojellerin hücre canlılığını ne kadar etkilediği kantitatif olarak verilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde genel olarak menisküs dokusunun anatomisi, ultrayapısı, kompozisyonu, biyomekanik özellikleri, yaralanmaları durumunda yapılan tedavi ve yapılabilecek doku mühendisliği ile onarım yaklaşımları ele alınmıştır. Ayrıca, yeni bir yaklaşım olan deselülerizasyon ve gerekli muameleleri için de literatür araştırması yapılmış ve bu kısımda yer verilmiştir. Alternatif bir hibrit iskele oluşturulmasında kullanılacak serbest radikal polimerizasyonu ve kullanılan polimerler ile çapraz bağlama parametrelerinden de ayrıntılı olarak bahsedilmiştir.

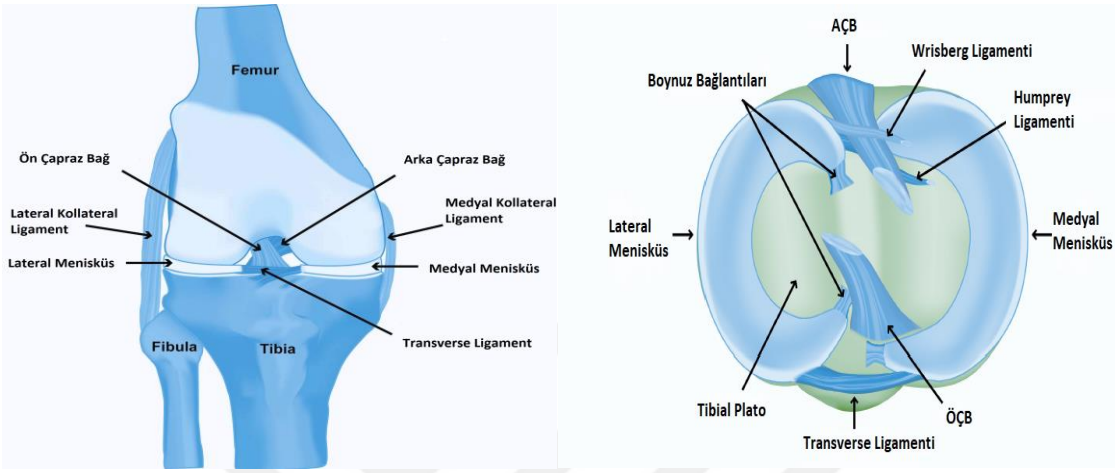
2.1. Menisküs Yapısı ve Fonksiyonu

Diz, öncelik olarak bacağın fleksiyon ve ekstansiyonuna izin verirken; rotasyonal, translasyonal ve dönme hareketlerinin de uyumunu sağlayan karmaşık bir oynar eklemdir. Femoral ve tibial eklem yüzeyleri yapısal olarak çok az bir stabilite sağlar [4]. Bu yüzden, biyomekanik fonksiyonlarının gerçekleştirilmesinde artiküler kıkırdak, menisküs ve ligamentler diz eklemi için önemli role sahiptir. Menisküs dokuları, artiküler kıkırdak üzerindeki temas yüzey alanını artırarak, dize gelen yüklerin dağılması ve artiküler kıkırdak üzerinde daha düşük stresin sonuçlanmasıyla diz eklemi uyumunu artırmaktadır. Her bir dizde medyal ve lateral olarak bir çift olan menisküsler, bu uyumun sağlanması için üçgensel kesit ve yarım ay şeklini göstermektedir [5, 6].

2.1.1. Menisküs Anatomisi ve Vasküleritesi

Menisküs, femur ve tibial plato arasında konumlandırılmış, C- şeklindeki fibröz-kıkırdak dokulardır. Konveks yapıdaki femoral kondil ile temas halindeki proksimal yüzeyleri konkav şekli ile uyum sağlarken; distal yüzeyleri tibial plato için nispeten düz yapısı ile uyuşmaktadır. Medyal menisküs laterale göre daha az daireseldir ve buna bağlı olarak daha az yer kaplamaktadır. Boyut, şekil ve kalınlık bakımından farklılık gösteren medyal ve lateral menisküs dokuları tibial platonun sırasıyla %51-74 ve %75-93'lük kısmının üzerini kapatmaktadır [7, 8]. Eklem kayganlığı ve stabilitesini sağlayan menisküs dokuları çeşitli ligamentler ile diz eklemine tutturulmaktadır. Dokudaki posterior ve anterior kısımlarında bulunan boynuz yapılarının tibial platoya bağlanması ana bağlantı noktalarını oluşturmaktadır [9]. Transverse ligamentler ile de lateral ve medyal menisküs dokularının anterior kısımları birbirine bağlanmaktadır. Lateral menisküsün anterior boynuzunun dış çevresi tibial interkondiler tepesine giderken ön

çapraz bağların arkasından ilişkilendirilmektedir. Arka(posterior) boynuzu ise medyal femoral kondile, arka çapraz bağların arkasında ve önünde bulunan, sırasıyla Wrisberg ve Humphrey ligamentleri ile bağıntı kurmaktadır [1]. Diz eklemindeki meniskal bağlantı kesişmelerinin önden (anterior) ve üstten (süperior) görünümü Şekil 2-1'de verilmiştir.

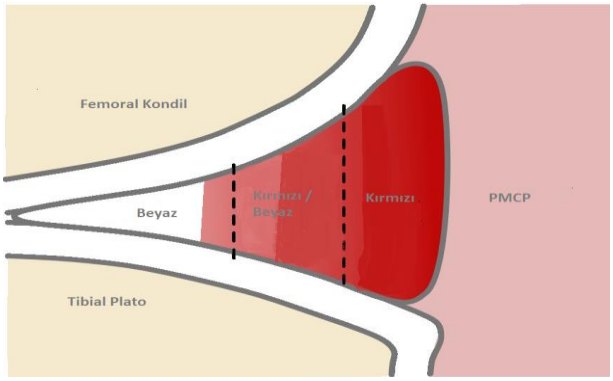


Şekil 2. 1. Meniskal bağlantılarıların anterior ve superior taraftan görünümü [1].

Medyal menisküs eklem kapsülünün dışında bulunan medyal kolleteral ligamente periferik olarak sıkı bir bağlantı içindedir. Lateral menisküsün femur ve popliteal tendona bağlantısı rotasyon sırasında femoral kondil hareketiyle birleştirir; fleksiyon sırasında da popliteal tendon arka boynuzu geri çekerek dokunun femur ve tibia arasında hapsolmasını engeller. Bu nedenle daha az haraketli bir yapı sergileyen medyal menisküsün yaranmalara eğilimi lateral menisküse kıyasla fazladır [10].

Menisküsün vasküler anatomisine bakıldığında, doğumda hemen hemen tüm menisküsün kanlandığı fakat 9. ayda iç bölgenin üçte biri avasküler olduğu bilinmektedir. Yetişkinliğe doğru bu azalışın devam etmesiyle her iki menisküste de sadece periferal denilen dış bölgede ~%10-30 vaskülerite görünmektedir [11]. Vasküler büyümenin inhibitörü işlevini gören endostatin/kollajen tip 18 bu azalmada etkin bir rol oynamaktadır [12]. Menisküs dokuları kanlanma ve beslenme şekillerine 3 bölgeye ayrı bölgeye ayrılabilir. Şekil 2-2'de menisküs vaskülerite si ve bölgeleri görülmektedir. Kırmızı bölge menisküsün dıştaki 3'te birlik kısmını temsil eder ve bu bölgenin kanlanması iyi olduğu için doku kan damarlarından beslenme sağlamaktadır. Kırmızı-beyaz bölge ortanın 1/3'ünü kaplamasıyla hem kan damarlarından hem de sinoviyal sıvıdan beslenmeyi almaktadır. Beyaz bölge ise tamamıyla avasküler yapıda olmakla

beraber sadece sinoviyal sıvı tarafından beslenir. [13]. Dokuda görülen bu hipovaskülerite yaralanma veya aşınma durumlarında iyileşme potansiyeline negatif etki etmektedir.



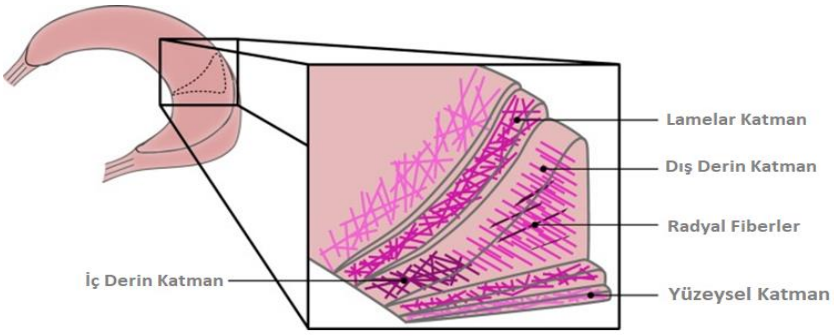
Şekil 2. 2. Menisküs vaskülerizasyonunun şematik gösterimi [14].

2.1.2. Biyokimyasal Kompozisyonu

Menisküs dokusu, kolajen oryantasyonu ve kanlanma bölgeleri ile heterojenik bir yapı sergilemektedir. Menisküsün genel olarak biyokimyasal kompozisyonu da % 72 su içeriğini ve % 28 oranında organik bileşenlerini içerir. Bu organik bileşenler hücre bağıntılı matris yapılarına tekabül etmektedir. Kolajenler organik bileneşenlerin %75'lik kısmını oluşturarak dokunun temel bileşimi olmaktadır. Ardından %17'lik kısmını glikozaminoglikanlar (GAG) takip etmekte ve % 2 oranında DNA içeriği de dokunun hipohücreselliğini ortaya koymaktadır.

Adhezyon glikoproteinleri ve elastin dokuda % 1'in altında bulunmaktadır [15]. Kolajen menisküs dokusunda ana fibril bileşeni olmasına karşın farklı kolajen tipleri dokunun her bir bölgesinde değişen miktarlarda bulunur. Cheung ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada dış bölgenin üçte 2'sinde Tip I kolajen birincil olarak gösterilirken iç bölgedeki üçte 1'lik kısımda %60 Tip II ve %40 Tip I kolajen görülmüştür. Kolajenin diğer varyantları olan Tip III, V, VI dokuda minör bileşenler olarak mevcuttur [16]. Buradaki kolajen fiberlerinin organizasyonu dokunun mekaniksel fonksiyonlarıyla spesifikleşmektedir. Menisküs dokusunda kolajen düzenlenişi yüzeysel, lamelar ve derin katmanlar olmak üzere 3 ayrı tabaka ile gösterilmektedir. Yüzeysel ve lamelar katmanlardaki kolajen fibriller rastgele hizalanarak femur ve tibia yüzeylerine temas eden ağ şeklini oluştururlar. Daha derin katmanlarda ise fiberler dış bölgeye doğru sirkumferansiyel (çevrimsel) bir hizalama gösterirler. Menisküsün perifer kısmından

merkezine doğru görülen bu sirkümferansiyel fiberlere dik radyal fiberler yığın yapının rijiditesini artırmaktadır [17]. Şekil 2.3. teki kolajen fibril hizalanışının katmanlar arasındaki spesifikliği görülmektedir.

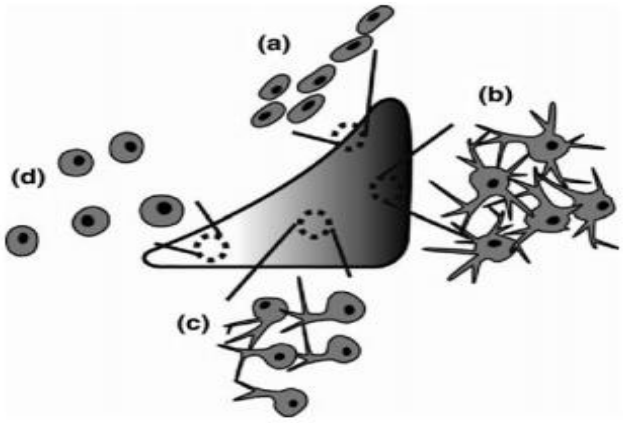


Şekil 2. 3. Menisküs Dokusundaki Kolajen Organizasyonu [17].

Proteoglikanlar menisküs dokusunun hidrasyon ve kompresif direncine yardımcı olan glikozaminoglikan dalları ve merkez protein çekirdekten oluşan hidrofilik glikoproteinlerdir. Birincil proteoglikanlar olarak dokuda agrekan, biglikan ve dekorin bulunmaktadır. Birincil glikozaminoglikanlar ise kondroitin-4-sülfat (%40), kondroitin 6-sülfat (%10-20), Dermatan sülfat (%20-30), keratan sülfat (%15) ve hyaluronan (%3) oranlarını içermektedir. Proteoglikanların yoğunluklarının bölgelere göre değişiklik göstermesi menisküs dokusundaki anizotropinin bir diğer sebebini de oluşturmaktadır. İç bölgenin 2/3'ünü oluşturan moleküller dış bölgede daha düşük miktarda gözükmektedir [18]. Negatif yüklü bu polisakkarit molekülleri ozmotik şişmeye stimüle ederek kompresif kuvvetlere karşı direnç sağlamaktadır.

Sitolojik olarak bakıldığında, bölgesellik ve beslenmeye göre dokuda 4 farklı morfolojide hücreler tanımlanmaktadır. Menisküs dokusunda fibroblast benzeri, fibrokondrosit, fibrosit ve kondrosit benzeri hücre tipleri farklı olarak konumlanmış ve hücre bağlantılı matris yapısı da ilişkili olarak heterojenik özellik göstermiştir. Avasküler bölge olan iç kısımda bağlantıları olmayan, yuvarlak tipteki artiküler kondrosit benzeri hücreler görülürken, periferal kısımda fibroblast-benzeri olarak tanımlanan fibröz; iğsi veya oval yapıdaki hücreler gözlenmiştir. Geçiş bölgesi olan ve damarlanmanın iç bölgeye göre nispeten gözüktüğü orta kısımda yuvarlak veya oval morfolojideki fibrokondrositler bulunmaktadır [19]. Yüzeye yakın olan yerlerde ise

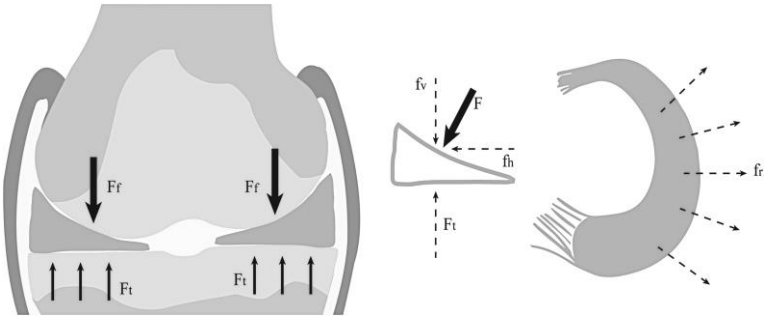
fibroblast benzeri hücreler iğsi ve hücre uzantıları olmayan bir morfoloji sergilemektedir. Şekil 2.4.teki morfolojiler bölgelere göre farklılık göstermektedir. Literatür çalışmalarında morfolojik farklılıkların yanı sıra hücrelerin gen ekspresyon profilleri de bölgelere göre değişiklik göstermiştir [20, 21].



Şekil 2. 4. Menisküs Dokusunda Görülen Hücre Morfolojileri.(a)- yüzeysel hücreler, (b)- fibroblast benzeri hücreler, (c)- fibrokondrosit benzeri hücreler, (d)- kondrosit benzeri hücreler [22].

2.1.3. Fonksiyonu ve Mekanik Özellikleri

Menisküs dokusunun ECM kompozisyonu ve ultrayapısı direkt olarak mekanik davranışını etkilemektedir. Temel olarak eklem stabilitesini sağlama, eklem lubrikasyonu, şok absorbsiyonu, gelen yüklerin dağıtılması ve artiküler kıkırdağın beslenmesini sağlama gibi eşsiz fonksiyonlara sahiptir. Diz eklemi normal aktivite sırasında vücut ağırlığının 5 katına kadar; zorlu antrenmanlarda da vücut ağırlığının 24 katına kadar yüksek kuvvetlere maruz kalmaktadır. Menisküs içindeki kolajen fiberler bu yüklerin %75'ini hoop (çember) gerilmelerine ileterek dokunun bu yüklere dayanmasını sağlamaktadır. LM ve MM diz ekstansiyonunda sırasıyla yüklerin % 70 ve %50'sini dağıtırken; 90ºC'lik bir fleksiyonda bu oran %85'e artmaktadır [23]. Üçgensel ve konkav yapısı sayesinde ve tibiofemoral eklemdeki temas yüzey alanını artırmasıyla tibial kıkırdak üzerindeki gerilimi azaltır.



Şekil 2. 5 . Menisküs dokusuna etki eden kuvvetler ve dağılımları [24].

Normal fizyolojik yüklenmeler altında, menisküs birincil olarak aksiyel tibiofemoral yüklerden olan (Fv) vertikal kuvvet ve (Fh) horizontal kuvvetleri tarafından sıkıştırılır. Vertikal kuvvet tibial platodan oluşan yukarı yönlü kuvvetle (Ft) ters düşerken; horizontal kuvvet menisküs ektrüzyonunu önlemek için boynuzlardan gelen bağlayıcı kuvvet (Fr) ile dengelenir. Ardından aksiyel bir sıkıştırma (Ff) Şekil 2.5.de verildiği gibi çekme gerilimlerine dönüşmektedir [24]. Böylelikle sirkümferansiyel hizalanmış kolajen fiberlerin çekme dayanımı (100-300 MPa) radyal olarak hizalanan fiberlere (10-30 MPa) göre 10 kat daha fazla olmaktadır. Aksiyel yöndeki young (elastik) modülüsü ise proteoglikanların varlığından dolayı 2 kat daha fazladır [25]. Menisküs dokusunda genel olarak kolajen fiber oryantasyonu çekme gerilimine, yüklerin dağıtılmasına ve rijiditesini katkı sağladığı bilinmektedir. Biyokimyasal kompozisyonu da viskoelastik davranış sergilemesine ve iyi bir şok absorbsiyonu özellikleri göstermesini sağlamaktadır.

Dokunun viskoelastik davranış göstermesinin nedeni yüksek su içeriğindeki sıvı (viskoz) faz ve kolajen-proteoglikanlardan oluşan katı fazların oluşturduğu bifazik özelliktendir. Menisküs dokusuna bir kompresif yükü uygulandığında, elastik faz başlayarak doku uygulanan yüke karşı elastik bir cevap sergiler. Senkronize olarak, deformasyon göstermeden viskoz faz başlar. Bu noktada dokunun geçirgenliği aksiyel yükler boyunca sıvının yavaşça ekstrüzyonuna ve meniskal şekil ve yapının korunmasına yardımcı olur. Bu mekanik davranışları sayesinde de yüke dayanım göstermekte ve iyi bir şok absorbsiyonu fonksiyonunu sağlamaktadır. Ayrıca sıvını salınmasıyla dokunun iç bölgelerinde beslenmeye yardımcı olma ve bununla beraber eklem lubrikasyonuna katkısı olmaktadır [26].

Dokuya radyal olarak yüklenme yapıldığında, kayma gerilimi de kolajen fiberler arasında uyarılmaktadır. Tibial plato ve femoral kondil arasında bulunan doku

sürtünmesiz temas yüzeyi yarattığından dolayı dokunun kayma gerilimi genellikle ihmal edilebilir [27].

2.2. Menisküs Yaralanmaları ve Tedavileri

Dünya genelindeki eklem rahatsızlıklarından en yaygın görüleni diz osteoartritidir. Gelişen ve gelişmekte olan ülkelerde artan nüfus yoğunluğu, obezite ve yükselen teknoloji ile değişen yaşam koşulları hastalığın görülme riskini artırmaktadır. Genellikle menisküs yaralanmalarıyla ilişkili olan ön çapraz bağ (ÖÇB) yırtılmalarında da osteoartrit görülme sıklığı %21-40 arasındadır. Menisküs onarımı yapılmayan/yapılamayan hastalarda ise normal insanlara göre hastalık riski 14 kat daha fazla olmaktadır [28].

Asemptomatik, dejeneratif yaralanmalar yaygın olarak yaşlılarda görülse de meniskal bozukluklar pediyatrik nüfüsta görülen diskoid menisküsten atletlerdeki travmatik yaralanmalara kadar her yaşa uzanmaktadır. Genel olarak futbol, kayak, basketbol, güreş gibi sporlarda yaralanma vakaları daha fazla görülmektedir [29].

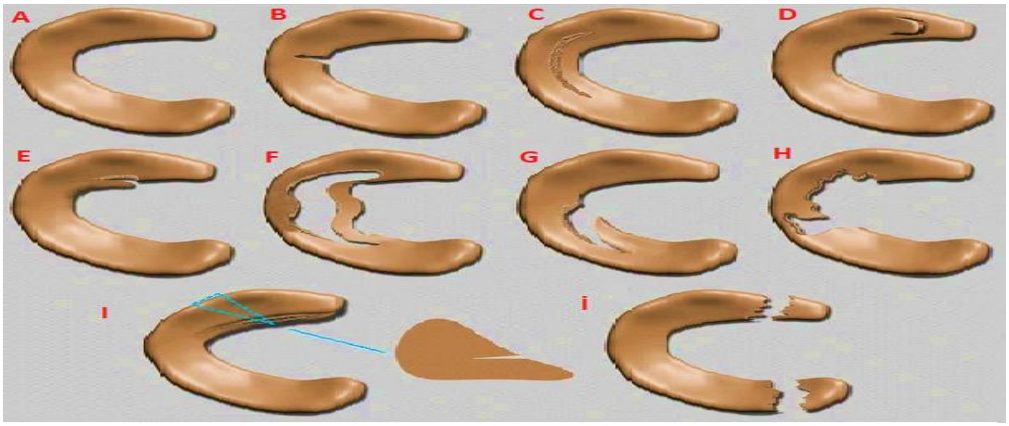
Bu yaralanmaların medyal menisküste lateral menisküse göre 2:1 oran sıklığında olduğu gözlenmiştir. Aşınmalar asemptomatik olabileceği gibi; ağrı, şişlik, dizde kitlenme, sallanma ve tutuklama gibi semptomlarını da gösterebilmektedir [30].

2.2.1. Yaralanma Tipleri

Menisküs dokusunda görülen vaskülerizasyonun heterojen olması nedeniyle oluşan yırtıkların iyileşme potansiyeli de değişiklik göstermektedir. Yırtığın lokalizasyonunun yanı sıra tipi ve boyutları da iyileşmeyi ve tedaviyi etkilemektedir. Özellikle periferal halkaya doğru olan yırtıklarda iyileşme daha fazla görülmektedir. Horizontal (yatay), kompleks, radyal, çevrimsel ve oblik menisküs yırtıkları ile sıklıkla karşılaşılmaktadır. Horizontal ve kompleks aşınmalar çok yaygın olmakla beraber genelde osteoartrit gibi dejeneratif hastalık spektrumlarıyla meydana gelmektedir. Radyal, çevrimsel, kova sapı ve oblik aşınmalar ise akut yaralanmalarda ve genç popülasyonda daha fazla görülmektedir [29].

Çevrimsel yırtıklar daha yaygın olarak karşılaşılan yaralanmalardır. Çevrimsel olan kolajen fiberler boyunca görülen bu yırtıklar 1 mm'den menisküs uzunluğuna kadar değişebilmektedir. Genellikle 5 mm'den daha az olan ve dokunun tek bir katmanında bir yırtık meydana gelmiş ise tedavinin gerekmediği ve biyomekanik olarak dokunun

işlevselliğine devam edebileceği gözlenmiştir [31]. Kova sapı yırtıkları, çevrimsel yırtıkların tüm katmanlarda gözüktüğü ve menisküs gövdesini ayırarak kıkırdak yüzeylerinin de aşındırıldığı yaralanmalardır. Radyal aşınmalar çevrimsel olarak hizalanmış kolajenlere dik bir biçimde gerçekleşen ve sıklıkla ÖÇB yaralanmaları ile meydana gelen yırtık türlerindendir. Beyaz bölgeden başlayan yırtıklar kırmızı bölgeye doğru ilerleyerek dokunun biyomekanik işlevini engellemektedir. Oblik yırtıklar radyal yırtıkların yana eğimiyle dokunun iç taraflarına doğru yırtıkların uzanmasıyla gerçekleşmektedir [32]. Horizontal yaralanmalar dokunun üst ve alt tabakalarının oluşturduğu kayma geriliminden kaynaklı olarak gelişmektedir. Daha çok yaşlı hastalarda görülen bu yırtıkların onarımı diğerlerine göre zor olmaktadır. Kompleks aşınmalar, menisküsün çoklu katmanlarındaki çoklu yırtıklar ile oluşmaktadır. Tedavisi zor olan bu yaralanmalar dejeneratif durumlarda ortaya çıkar ve menisektomi gerektirmektedir. Şekil 2.6'da da ayrıntılı olarak görülen kompleks aşınmalar osteoartrit ilerlemesine neden olur. Şekilde görülen flap yırtıkları menisküs yüzeyine yakın yerlerde horizontal ya da vertikal olarak belirebilmektedir. Bu yaralanmalar genel olarak travmalar sonucunda meydana gelirken iyileşmesi olanaksız görülen yırtık tiplerindendir. Boynuz yaralanmalarında posterior bölgede dejeneratif olarak karşımıza çıkmaktadır. Çevrimsel bir yırtık gözlendiğinde ise iyileşme potansiyelinin yüksek olmasından dolayı onarım yapılabilmektedir [33].

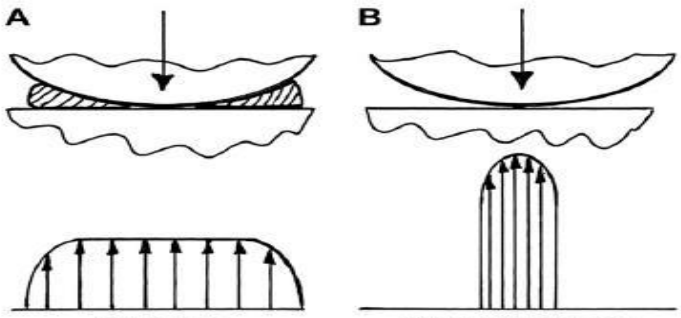


Şekil 2. 6. Menisküs yırtıklarının tipleri. (A) Normal menisküs, (B) Radyal yırtık, (C) çevrimsel yırtık, (D) Horizontal flap, (E) Vertikal flap, (F) Kova sapı yırtığı, (G) Oblik yırtık, (H) Kompleks yırtık, (I) Horizontal yırtık, (İ) Boynuz yırtıkları. [33].

2.2.2. Menisküs Yaralanmalarında Tedavi Yöntemleri

Yırtıkların derinliği, uzunluğu, boyutu, yaş ve semptomlar gibi hasta ile ilgili faktörler iyileşmeyi etkilemektedir. Doku onarımındaki bir diğer anahtar faktör ise hücrelerin ve inflamatör medyatörlerin yaralanma bölgelerine ulaşılabilirliğidir. Menisküs dokularındaki vaskülerizasyon farklılıkları doku iyileşmesi ve tedavi yöntemlerini de bölgelere göre değiştirmektedir. Kırmızı-kırmızı bölgelerdeki yaralanmalar daha kolay iyileşebilirken, iç bölgelere de doğru tedavi gereksinimi artmaktadır. Genel olarak kırmızı-kırmızı ve kırmızı-beyaz bölgelerdeki vertikal çevrimsel uzunluğu 5 mm'den daha az olan ve asemptomatiklik gösteren yaralanmalarda konservatif tedavilerin etkili olduğu ve bu yırtıkların biyomekanik özellikleri etkilemediği görülmüştür [34]. Horizontal, radyal, komplex aşınmalar avasküler bölgede meydana geldiğinden cerrahi işlem bu yaranmalar için kaçınılmaz olmuştur [35]. Cerrahi tedaviler artroskopik işlemlerden açık ameliyatlara kadar değişebilmektedir. Meniskal sütürler, vidalar ve fibrin yapıştırıcıları ile yırtıkların bir kısmı kapanabilmektedir. Sütür ve vidalar, aşınmaları sratbil konumda tutabilmekte fakat iyileşmeye katkı sağlayamamaktadır [36]. Ghadially ve arkadaşları kova sapı avasküler yırtıklarda sinoviyal ve fibrin yapıştırıcıların sütür ile tedavi edilen yaralara göre doku iyileşmesini desteklediğini göstermişlerdir. Fakat doğal dokuya benzer mekanik dayanımın altında olduklarından dolayı diğer tedavilere başvurulmaktadır [37]. Kısmi veya total olarak dokuyu eksize eden menisektomi artroskobik olarak yapılabilmektedir. Avasküler kısımdaki yaralanmalar, flep yaralanmaları, horizontal ve kompleks yaralanmalar gibi semptomik olanlarda menisektomi altın standart olarak kabul görür. Parsiyel (kısmi), subtotal ve total olarak yapılan menisektomide yırtık genişliği ve tipinden dolayı eksize edilen doku miktarı değişiklik gösterir [35]. Genel olarak kısmi menisektomi, biyomekaniği etkileyen semptomları azaltmada etkili olmasından dolayı, çok yaygın bir tedavi yöntemi olmuştur [38]. Ayrıca kısmi menisektomi yapılan semptomatik meniskal yaranmaların (flep yaralanmaları) büyük çoğunluğunda tedavide ilerlemeler gözükmüştür [39]. Kısa süre için meniskal yırtıkların semptomlarını hafifletmesine rağmen, menisektomi uzun vadede osteoartritin ilerlemesini hızlandırmaktadır. Menisektomi yapılmış bir diz eklemi 6 ay sonra incelendiğinde önemli derecede lokal artiküler kıkırdak dejenerasyonu gözlenmiştir [40]. Diz eklemindeki temas yüzey alanını artıran menisküs dokularının eksizasyonu ile temas gerilimlerinde artışa ve eklem boşluklarının daralmasına ve nihayetinde osteofit oluşumuyla subkondral

trabeküllerinin kırılmasına yol açarak osteoartritik değişiklikler yaşanması sebep olarak gösterilmektedir [41].



Şekil 2. 7. Hiç işlem görmemiş diz eklemi için tibial platonun üzerine düşen temas gerilimi (A), menisektomi yapılmış bir dizdeki gerilim büyüklüğünün küçük alanda toplanarak artması (B). [42]'den uyarlanmıştır.

2.2.3. Menisküs Allogreft Transplantasyonu (MAT) ve Ticari İmplantlar

Menisküs dokusunun eksikliğinde görülen osteoartiritin önlenmesi adına veya onarılamaz bir yırtık durumu gözlendiğinde transplantasyon teröpatik bir opsiyon olarak görülmektedir. Total menisküs allogreft transplantasyonu (MAT) ve aselüler iskeleler (ticari implantlar) ile kısmi menisküs replasmanları farklı indikasyonlara ve olasıklara sahip olmaktadır. MAT için total ya da subtotal menisektomi uygulamaları yeterli iken; kısmi menisküs replasmanında, ticari implantlar için, periferik kısım ve meniskal köklerin korunduğu kısmi menisektomi uygulanması gerekli olmaktadır [43]. Allogreftler taze, taze-dondurulmuş, kriyopreserve ve liyofilize edilmiş tipte bulunmaktadır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı taze dondurulmuş ve gliserol ile kriyopreserve edilmiş meniskal allogreftleridir [44]. MAT; ağrı azaltılması, işlevselliğin ve yaşam kalitesinin artırılmasında bir efektifliği kanıtlanmasına rağmen rejeksiyon riski ,pahalılığı ,uygun boyutun ayarlanamaması, hastalık bulaşma ve immün risk bakımından kısıtlamalara sahiptir [45].

Geniş bir kısmi menisektomi yapıldığında eğer meniskal periferal halka yapısını koruyor ise replasman için allogreftler tercih edilmemektedir. Klinik çalışmalarda kullanılan 'kolajen menisküs implant' (KMI, IVY Sports Medicine) ve 'ACTIFIT' (Orteq Bioengineering) adıyla ticarileşmiş menisküs implantları kısmi menisektomi sonrası replasman için tercih edilmektedir. Kronik kısmi menisküs defektlerinde

menisektomi sonrası replasmanları yapılan implantların kısa dönem çalışmaları umut vaat etmektedir [17]. Burada Menaflex ticari adıyla da bilinen kolajen implantları, glikozaminoglikanlarla birlikte tip I sığır kolajen matriksten üretilmiştir. Tamamıyla biyouyumlu olan implant, kısmi menisektomi öncesine göre hastaların ağrı seviyelerinde azalma, aktivitelerinde artış ve ileriki cerrahi prosedürlerlerin sayısında azalış göstererek tedaviye olumlu yanıt vermiştir [46]. Actifit menisküs iskeleleri gözenekli ve degrede olabilen (%80) poli(-ε-kaprolakton) ve (%20) poliüretan içeren kompozit implantlardır. 1 yıllık çalışma sonucunda implantın yerini hücrelerin kendi ECM'ini oluşturmasıyla menisküs dokusunun aldığı gözlenmiştir [47]. Kısmi menisküs replasmanları hem klinik çalışmalardaki başarıları hem de rekonstrüktif girişimdeki kolaylığı bakımından cerrahlar tarafından çokça tercih edilmektedir. Fakat uzun vadedeki çalışmalarda her iki iskelenin büzülmesi ile bir başarısızlık ve hatta MAT'a göre daha düşük operasyon ve başarıda azalış raporlanmıştır [48]. Kısmi replasman olarak, kısa ve orta dönemde hücre büyümesini desteklediği görülse de izotropik yapıları anzizotropik menisküsün işlevini tam olarak taklit edememesiyle bu iskeleler sınırlı olmaktadır.

Total menisküs replasmanı için MAT'a alternatif olarak anizotropik sentetik biyomalzeme faz I klinik çalışmalarına devam etmektedir. NUSurface (Active Implants) olarak bilinen bu implant polikarbonat üretan bazlı olup, polietilen ile güçlendirilmiştir. PCU meniskal implantların koyunlardaki çalışmasında artiküler kıkırdak dejenerasyonunu tamamıyla önleyememesi rapor edilmiş ve çalışmalara devam edilmesi gerektiği belirtilmiştir [49].

2.3. Menisküs Doku Mühendisliği

Langer ve Vacanti tarafından 1993 yılında doku mühendisliği, doku veya organların eksikliklerinde işlevlerini yerine getirebilen veya tamamen yerini alabilen ve destek olabilen biyolojik sistemlerin geliştirilmesi yönündeki multidisipliner bir araştırma alanı olarak tanımlamıştır [50]. Biyomalzemelerden oluşan doku iskeleleri, büyüme faktörleri ve hücreler doku mühendisliği yaklaşımlarında kullanılan majör unsurlardır. Menisküs doku mühendisliğinin rejeneratif tedaviler için menisküs dokusunda kullanımı geleneksel tedavilere potansiyel bir alternatif olmuştur. Menisküs dokusu için kullanılan biyomalzemelerde de sentetik ve doğal polimerler ya da bunların kombinasyonları

olarak kısmi ya da total menisküs replasmanları için çalışmaları hız kazandırmaktadır. Hücre ekilmiş sentetik ya da doğal iskeleler, hidrojeller ve hücresizleştirilmiş ECM yapıları genel olarak menisküs doku mühendisliği için geliştirilen stratejilerindendir. Başarılı bir doku iskelesinden mekaniksel ve biyolojik olarak dizin fonsiyonelliğini sağlama, konakçı doku integrasyonuna izin verme, degredasyonunun konakçı dokunun rejenerasyonuyla korelayona sahip olması, gözenek boyutunun hücre infiltrasyonuna izin vermesi, geniş skaladaki üretilebilir olması beklenmektedir.

2.3.1. Menisküs Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler

Biyoabsorblanabilir sentetik polimerler, esnek üretim teknikleri ile ayarlanabilen iskele geometrileri ve doğal doku ile eşleşebilen mekanik özellikleri sayesinde meniskal rejenerasyonda kullanımı umut vaat eder. Poliüretan (PU), poli(kaprolakton) (PCL), poli(glikolik asit) (PGA), poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), poli(laktik asit) (PLA) iskeleleri menisküs doku mühendisliğinde kullanılan en yaygın biyomalzemelerden olmaktadır. Bu iskeleler çeşitli metotlar aracılığıyla üretilebilirliği, gözenek boyutu ve fiber kalınlığının tasarım spesifikliği, menisküs dokusuna benzer mekanik özelliklerinin ayarlanabilmesi bakımından avantajlara sahiptir. Çizelge 2.1' de sentetik iskeleler kullanılarak menisküs dokusunda sentetik ve sentetik/doğal polimerler ile yapılan in vivo çalışmalar yer almaktadır.

Çizelge 2. 1. Menisküs doku mühendisliğinde çalışılan sentetik/biyolojik polimerler

Kullanılan Malzeme	Tür	İzlemi	Sonuçlar	Referans
PCL/HYAFF	Koyun	12 ay	Osteoartrit hücre ekilmiş grupta menisektomi yapılan gruba göre azaldığı gözlenmiştir. Fakat 12 ay sonunda iskelenin posterior bölgeden ekstrüzyonu gözlenmiştir.	[51]
PLGA	Köpek	12 hafta	Kolajen tip I, II ve agrekan artışı ile hyalin benzeri bölgelerde fibröz-kıkırdak oluşumu gözlenmiştir.	[52]
PLDLA/PCL-T	Tavşan	24 hafta	Kronik inflamasyon cevabı, enfeksiyon ve iskele rejeksiyonu gözlenmediği rapor edilmiştir.	[53]

CF-PU-PLLA	Köpek	20 hafta	Çalışmada sonucunda karbon partikülleri bulunmuştur.	[54]
Poly(l-lactik asit)/poli (p-dioksanon)	Tavşan	14 hafta	Kollajenöz doku iç büyümesi ve iskelenin kondroprotektif etkisi menisektomi yapılan dize göre gözlenmiştir.	[55]
PGA-PLGA	Tavşan	10 hafta	GAG, kolajen üretimi doğal menisküs dokusuna benzer fakat artiküler kıkırdak dejenerayonu devam etmiştir.	[56]
PGA-Hyaluronan	İnsan	3 hafta	Matriks protein ekspreyonuna artış ve kolejen X ekspresyonunda azalış görülmüştür.	[57]
PCL-PU	Köpek	26 hafta	Fibröz-kıkırdak oluşumu gözlenmiştir. Polimere sinoviyal reaksiyon ve makrofajların oluşumunun görüldüğü raporlanmıştır.	[58]

Sentetik polimerlerin zayıflığı olarak biyolojik aktivitelerinin eksikliklerinden dolayı yabancı cisim reaksiyonu gösterdiği çeşitli çalışmalardan görülebilmektedir. Doğal bazlı polimerlerden menisküs doku mühendisliği için ipek, jelatin, selülöz, kolajen yapıları çokça tercih edilmektedir. İpek doku iskelesi ile koyunlardaki 6 aylık in vivo çalışmasında enflamasyona rastlanmadığı ve iskelenin mekanik özelliklerinin doğal dokuya benzediği rapor edilmiştir. Bununla birlikte, replasmanı yapılan defektte implant ve konakçı arasında bir boşluğun oluştuğu ve sabitlenemediği gözlenmiştir [59]. Rezorbe olabilen kolajen menisküs iskeleleri klinik çalışmalardaki etkinliği ile menisküs rejenerasyonunda eşsiz bir biyomalzeme olarak yer almaktadır. Fakat KMI bir kez nemlendirildiğinde, kırılgan bir yapı sergileyerek cerrahi işlemleri daha zor hale getirmektedir [60]. Buradan her bir bileşenin ileriki optimizasyonlara ihtiyacı olduğu ve menisküs doku mühendisliği için araştırmaların devam ettiği söylenebilmektedir.

Hidrojeller yüksek oranda hidratlanmış, en az %30 su içeriğine sahip, doğal veya sentetik polimerik biyomalzemelerin bir sınıfıdır. Onların bu hidratlanmış karakteristikleri doğal ECM yapısını taklit etmesini sağlamakta ve bundan dolayı doku mühendisliği ve protein taşıma sistemlerinde yeni ve umut vaat eden birçok hazırlama

metotlarını geliştirmeye itmektedir. Hidrojel iskeleler, doğal menisküs dokusunun mikroçevresine benzerliği ve biyolojik olarak aktif menisküs iskelelerinin oluşturulmasına katkı sağlaması ile meniskal rejenerasyonlarda kullanılabilmektedir. Kolajen bazlı hidrojeller kısmi menisküs rekonstrüksiyonları için enjekte edilebilir hidrojel ya da implante edilebilen iskeleler gibi geliştirilmektedir [61]. Hidrojeller modifiye edilmeden kullanımlarının dokunun fiziksel ve mekaniksel ihtiyacına erişemediği ve bu da onların klinikte kullanımını kısıtlamaktadır [62]. Mekaniksel dezavantajlarının giderilmesinde genelde sitotoksik ajan olan çapraz bağlayıcılar kullanılmaktadır. Fonksiyonelliği de artıran daha az sitotoksik olan çapraz bağlayıcılar ile mekanik dayanım arasındaki en iyi dengenin sağlanmasını amaçlayan çalışmalar hidrojel iskeleleri için devam etmektedir.

Menisküs transplantasyonunda zenogeftler ile yapılan çalışmalar dokunun kolay ulaşılabilirliği yönünden popülarite kazanmaktadır. Fakat hücresel menisküs greftleri insanlarda bulunmayan alfa-gel epitpopu içermesiyle antikora bağlı hücresel sitotoksisite mekanizmasını harekete geçirmektedir [63]. Deselülerizasyon stratejisi ile aselüler doku grefti oluşturma ideolojisi, menisküs doku mühendisliğinde, diğer greftlere göre yapısal ve biyouyumluluk durumları karşılaştırıldığında daha avantajlı olmaktadır. Menisküs deselülerizasyon çalışmaları ve yöntemleri Bölüm 2.4'te ayrıntılı olarak verilmiştir.

2.3.1. Menisküs Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler

Doğal menisküs dokusunun heterojenik yapısından kaynaklı olarak farklı hücre tiplerinin kombinasyonu, menisküs doku mühendisliği ile oluşturulan menisküs iskelelerinin gerekliliğini oluşturmaktadır. Menisküs doku mühendisliği için kullanılan geleneksel iskelelerden ayrı olarak, hücrelerin kendiliğinden ECM oluşturması son yıllarda fonksiyonel kıkırdak ve fibroz-kıkırdak oluşumunda kabul kazanmaya başlamıştır. Bu yaklaşım, hücreleri ayaralanabilir mekanik özelliklere sahip bir matrise entegre etmeye teşvik etmektedir. Fibröz-kıkırdak dokuda kullanılan potansiyel hücre kaynakları olarak fibrokondrositler, kondrositler ve kök hücreler örnek olarak verilebilmektedir [64].

Kök hücreler arasından menisküs doku mühendisliğinde en yaygın olanı mezenkimal kök hücrelerdir. Kemik iliği ya da yağ dokusu gibi farklı doku kaynaklarından elde

edilebilen bu hücreler kondrojenik hücrelere spesifik besi ortamı eklenmesiyle farklılaşabilmektedir [65]. Murinlerde yapılan bir çalışmada mezenkimal kök hücrelerinin defekt bölgesine enjekte edilmesiyle kolajen II ekspresyonunun zamanla artmasıyla fibröz-kıkırdak oluşumu gözlenmiştir. Kök hücre morfolojilerinin meniskal hücrelere olan benzerlikleri rapor edilmiştir [66].

Kolajen tip II'nin yanı sıra kolajen tip I üretimini de sağlayabilmesi fibrözkondrositleri meniskal doku mühendisliğinde uygun fenotiplere sahip olmasında avantajlı kılmaktadır. Kondrositler ile ko-kültüründe doğal menisküs dokusunu taklit edebilen bir niş oluşturması ile mekanik bütünlüğün sağlandığı çalışmalar menisküs doku mühendisliği için umut vaat etmektedir [67, 68].

Menisküs doku mühendisliğinde hücreler ile yapılan yaklaşımlar sadece iskele bazlı yaklaşımlara nazaran daha hızlı iyileşme potansiyeli ve meniskal rejenerasyonu teşvik etmektedir. Fakat klinikteki kullanım için daha karmaşık prosedürler ve hücre kaynağı sıkıntısı yaşanmaktadır. Maliyet olarak iskele bazlı yaklaşımlar kullanıma hazır bir şekilde üretildiği için erişilebilirliği kolaydır. Hücresel yaklaşımların dış uyaranlar ile mekanik ve biyokimyasal özellikleri sağladığı fakat implantasyonun zor olduğu ve hazır raf ürünü bakımından regülasyonlar açısından limitasyonları olduğu bilinmektedir.

Literatürdeki menisküs doku mühendisliği çalışmalarına bakıldığında farklı malzemeler menisküs rejenerasyonu için incelenmiş olsa da ideal bir iskele henüz geliştirilmemiştir. Bu kapsamda transplantasyon için potansiyel iskelelere ihtiyaç hala devam etmektedir.

2.4. Doku Mühendisliğindeki Hücresizleştirme Yaklaşımı

ECM, çok hücreli organizmaların yapısal entegresini sürdürülmesi için sadece fiziksel bir iskele görevi görmekle kalmaz, aynı zamanda hücrelerin tutunması, organizasyonu ve farklılaşmasını destekleyecek biyokimyasal ve biyofiziksel sinyalleri sağlamaktadır. Deselülerizasyon, zenojenik ve allojenik donör dokulardan hücrelerin ve onların bileşenlerinin uzaklaştırılmasıyla, gerekli biyomekanik ve biyolojik özelliklerin korunabildiği non-immünojenik doku iskelesi üretime yöntemidir. Deselülerizasyon ile dokuya spesifik ECM iskelelerinin üretimi son yıllarda popüler olan top-down doku mühendisliği yaklaşımı olmaktadır. 1970'li yıllarda deselülerizasyon fikrinin ortaya çıkması ile deri, kalp kapakçıkları, arterler, ligamentler gibi yumuşak doku deselülerizayonları ve ardından tüm organ deselülerizasyon prosesleri geliştirilmeye

başlanmıştır. Efektif bir deselülerizasyon için ECM bazlı iskelelerin klinik kullanımı için gerekli kriterler çeşitli raporlarda yayımlanmıştır. Bunlar; (1) H&E ve DAPI gibi histolojik incelemelerde hiçbir hücre çekirdeğine rastlanmaması, (2) kalan çift sarmal DNA'nın 200 baz çiftininin üzerinde olmaması ve (3) çift sarmal DNA'nın her mg kuru doku başına 50 ng'dan az olması gibi kriterlerdir [69]. Deselülerizasyonun başarılı bir şekilde istenilen gerekliliklerine ulaşması için farklı ajanlar ve teknikler kullanılmaktadır.

2.4.1. Konvansiyonel Deselülerizasyon Ajanları ve Teknikleri

Hücresel ve sitoplazmik membranların çözülerek veya yıkılarak hücrelerin lizis edilmesinde fiziksel, kimyasal ve enzimatik muamelelerden yararlanılmaktadır. Prosesin gerçekleştirileceği dokunun kompaktlığı, yağ içeriği, kalınlığı gibi faktörler göz önünde bulundurulduğunda tek bir yöntemden ziyade farklı kombinasyon ve tekniklerin kullanımı deselülerizasyon başarısına katkı sağlamaktadır. Kullanılan her hücre uzaklaştırma ajanı ve yöntemleri ECM kompozisyonunda değişikliklere ve ultrayapısnının yıkımına yol açabileceği için deselülerizasyonun bu dezavantajlarının minimize edilmesinde farklı protokol çalışmalarına halen devam edilmektedir.

2.4.1.1. Fiziksel Teknikler

Fiziksel muameleler deselülerizasyon prosesinde kimyasal ya da enzimatik ajanların dokuya daha kolay penetre olmaları için kullanılmaktadır. Dondurma-çözme çevrimleri, hidrostatik basınç, ajitasyon/emdirme en çok kullanılan fiziksel metotlar arasındadır. Dondurma-çözme çevrimleri hücre içinde buz kristallerinin oluşumuna ve böylece hücresel membranın yıkıma uğratılarak hücre lizisine neden olmaktadır. ECM ultrayapısında minör değişiklikler gösteren bu yöntemde oluşan buz kristallerinin boyutu sıcaklık değimlerinin hızı ile kontrol edilebilir [70]. Hidrostatik basınç ile hücre lizisleme ajanlarının dokuya iletilmesi, hücresel kalıntıların uzaklaştırılmasındaki etkinliğinin hızlandırılması ve artırılmasını daha kısa sürede gerçekleştirmektedir. Basınç gradyanları uygulanan hücresizleştirmenin genelde içi boş olan kan damarları, ince bağırsak dokularında daha etkili olduğu kanıtlanmıştır [71]. Ajitasyon, emdirme ve sonikasyon tekniklerinin ise kimyasal deterjan ve/veya enzimatik solüsyonların daha

etkin bir biçimde hücre lizisine ve hücresel kalıntıların uzaklaştırılmasına katkı sağladığı rapor edilmiştir [72].

2.4.1.2. Kimyasal Ajanlar

Asitler nükleik asitleri yıkarak ve sitoplazmik bileşenleri çözdürerek ECM'den DNA'nın ayrışmasında kullanılmaktadır. Asetik asit kolajen yıkımına neden olarak dokunun mekanik özelliklerin azaltılmasına neden olmaktadır [73].

Bazlar kromozomal ve plazmid DNA'yı denatüre edebilmektedir. Dermis gibi dokularda sıklıkla kullanılan sodyum hidroksit, sodyum sülfit gibi bazlar matriste bulunan yapısal bileşenlerin degredasyonuna yol açabilmektedir [74].

Hipotonik (düşük tuz konsatrasyonu) ve hipertonik (yüksek tuz konsantrasyonu) solüsyonlar ozmotik şok etkisi ile hücre patlatmasını sağlamaktadır. Çoklu hipotonik ve hipertonik çevrimleri ile hücre lizisinin ardından kalıntıların da uzaklaştırılması mümkün olmaktadır [75].

İyonik, iyonik olmayan ve zwitteriyonik deterjanlar hücre membranlarını çözebilen ve proteinlerden DNA'yı ayrıştırarak dokudaki hücresel materyallerin uzaklaşmasında etkin rol oynayan ajanlardır. İyonik deterjanlardan olan sodyum dodesil sülfat (SDS), proteinler arasındaki kovalent bağların tahribi ile hücrelerin uzaklaştırılmasında etkin rol oynamaktadır. Fakat büyüme faktörleri, glikozaminoglikanlar gibi biyomoleküllerin eliminasyonuna sebep olarak doku biyomekaniğinde ve biyolojik aktifliğinde azalışa yol açmaktadır [76]. Bunun için araştırmacılar SDS ajanının kısa maruz kalma süresi veya düşük konsantrasyonlarda kullanımıyla çoklu yıkamalar da dezantajlarını minimize ettiklerini ortaya koymuşlardır [77] . Sürfaktan olarak da kullanılan Triton X-100 iyonik olmayan deterjanlardandır. SDS'e göre daha fazla ultrayapının korunduğu bu ajan ile hücresizleştirme başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir [78]. Zwitteriyonik deterjanlar akciğer gibi daha ince dokularda hücre uzaklaştırılmasındaki başarısı 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS) ajanı ile denenen deselülerizasyonda kanıtlanmıştır [79].

Tri(n-butil)fosfat (TnBP) protein-protein etkileşimlerini yıkan organik bir çözücüdür. Tendonlarda denenen bir çalışmada hücre uzaklaştırmada SDS kadar etkili olduğu ve ESM yapısının korunduğu rapor edilmiştir [80].

Alkollerin polar hidroksil grupları hücre içine difüze olarak hücre içindeki suyla yer değiştirip, dehidrasyon ile hücreleri lizis edebilmektedir. Ayrıca etanol veya metanol kalan nükleik asitlerin dokudan uzaklaştırılması için son yıkama adımı olarak kullanılabilmektedir.

2.4.1.3. Enzimatik Ajanlar

Nükleazlar, tripsin, kollajenaz, lipaz gibi enzimler deselülerizasyon protokollerinde sıkça kullanılan ve hücre kalıntıları ve istenmeyen ECM bileşenlerini uzaklaştırmada yüksek spesifiklik gösteren ajanlardır. Genelde tek başlarına kullanıldığında tüm hücrelerin uzaklaşmasında etkili olmaz iken kimyasal ve fiziksel ajitasyonlar ile kombinasyonları hücresizleştirmede etkin olmaktadırlar. Nükleazlar (DNAaz ve RNAaz) dokudaki hücre lizisinin ardından nükletotidlerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırmaktadır. DNA ya da RNA'nın uç zincirlerinin hidrolizi ile hücre uzaklaştırılmasına olanak sağlamaktadır [76].

Tripsin, serin proteazı olarak da bilinen, arginin ve lizin üzerindeki peptit bağlarının ayrılması ve hücre-matris adhezyonların yıkımı ile deselülerizasyon proseslerinde kullanılan enzimatik bir ajandır. Uzun inkübasyonları dokunun ultrayapısındaki değişikliklere ve elastin ve kolajen gibi bileşenlerin azalmasına neden olabilmektedir. Fakat yığın dokularda denenmiş çalışmada bu sürenin ayarlanarak penetrasyonu geliştirdiği ve hücrelerin tamamen uzaklaşabildiği kanıtlanmıştır [81].

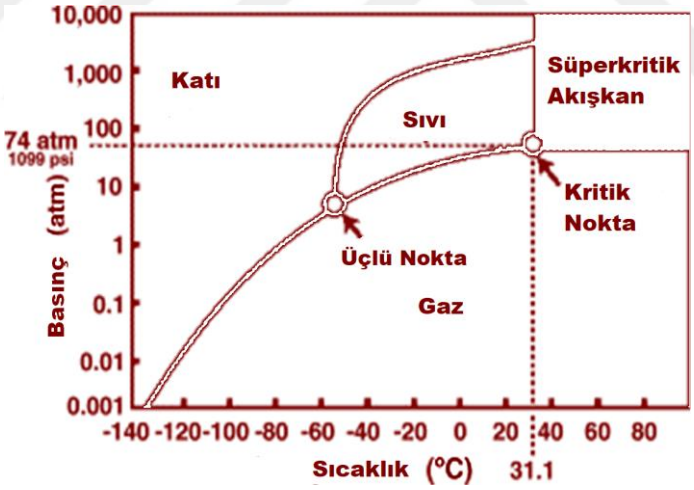
Kollajenaz, ECM ultrayapısının korunması ve kolajen yıkımının önemli olmadığı klinik durumlarda kullanılabilmektedir. Lipaz enzimi ise yağ dokusunun ayrılmasına yardım edebilen ve böylece hücresizleştirmede bir filtrasyon sağlayan ajandır [82].

Enzimatik tabanlı deselülerizasyonlarda dikkat edilecek bir diğer husus ise enzimlerden salınan ve ECM degredasyonuna yol açan proteazlardır. Proteaz inhibatörlerinin kullanımı ile inhibasyon sağlanabilmektedir. EDTA gibi şelasyon ajanları, aprotinin, PMSF deselülerizasyon protokollerinde kullanılan proteaz inhibitörlerindendir [83].

Bahsedilen deselülerizayon ajanları ve teknikleri konvansiyonel deselülerizasyon olarak da bilinmektedir. Gelişen teknoloji ile yeni deselülerizasyon yöntemleri de korele olarak ilerlemektedir.

2.4.2. Süperkritik Akışkan Teknolojisi ile Deselülerizasyon

Süperkritik karbondioksit ($scCO_2$) gıda ve ilaç endüstrilerinde çoğu proseste kullanılan ve aynı zamanda biyomalzemelerin sterilizasyonunda alternatif olarak umut vaat eden bir yaklaşım olmaktadır. Karbondioksit 31,1 °C sıcaklık ve 1099 psi (74 atm) basınçta süperkritikal duruma geçerek, gaz benzeri vizkozitesi ve difüzyonitesi; sıvı benzeri yoğunluğu ve çözücü özellikleri ile doku matrislerinden içeri kolayca nüfuz olabilmektedir. Bu kritik noktadaki sıcaklığın düşük olması onun sıcaklığa duyarlı biyomalzemelerdeki kullanımını avantajlı kılmaktadır. Şekil 2.8'de kritik noktanın bulunduğu grafik verilmiştir. Bunların dışında CO_2 kimyasal olarak inert olması, toksik özellik göstermemesi ve infaamasyon etkisinin olmaması gibi özellikleri ile yeşil üretim olarak çevreye zarar vermemektedir. Doğal zenginlik ve geri dönüştürülebilirlik açısından da ekonomik fizibilitenin endüstriyel boyutlarına katkı sağlamaktadır [84]. Süperkrititk CO_2'in bu avantajları dikkate alındığında doku mühendisliğindeki kullanımı son yıllarda revaçta olmaktadır.



Şekil 2. 8. Süperkrititk CO_2'in kritik noktasını gösteren grafik [85].

Aort dokusunun $scCO_2$ ile deselülerizasyonunda polar çözücü olarak etil alkol kullanılmış ve hücre nükleusları ve membranları 20 dk kadar kısa bir sürede etkili bir şekilde uzaklaştırıldığı rapor edilmiştir [86]. Aynı şekilde çözücü olarak alkol kullanımının fosfolipitlerin de dokudan uzaklaştırılmasına imkan sağladığı gözlenmiştir. Kornea ve aort dokularında ise $scCO_2$ deselülerizasyonunun mekanik özellikleri koruduğu ve ECM ultrayapısına zarar vermediği kanıtlanmıştır [87]. Süperkritik

akışkan CO_2'in difüzyonitesi sayesinde yığın dokulardaki deselülerizasyon çalışmaları devam etmekte olup menisküs gibi fibröz kıkırdak dokuların deselülerizasyonu ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Tez çalışması kapsamında konvansiyonel muamelelere nazaran $scCO_2$ teknolojisi kullanılarak deselülerizasyon gerçekleşecektir.

2.4.3. Menisküs Dokusu ile Yapılan Hücresizleştirme Çalışmaları

Menisküs onarımı ve rejenerasyonunda deselülerize iskelelerin hazırlanması nispeten yeni bir alan olmaktadır. Yüksek spesifiklik gösteren ECM yapısı kompleks biyolojik ve biyomekanik özelliklerini mimik edebilecek intakt menisküs iskelelerine ihtiyaç duyar. Yığın dokunun deselülerizasyon proseslerinde genelde fiziksel bir ön işlem, kimyasal ya da enzimatik ajanların penetrasyonuna izin verecek şekilde yapılmıştır. Çizelge 2.2'de intakt menisküs dokusunda kullanılan deselülerizasyon ajanları ve özellikleri verilmiştir.

Çizelge 2. 2. Menisküs Deselülerizasyon Çalışmaları

Tür	Deselülerizasyon Muameleleri	Sonuçlar	Biyomekanik Özellikler	Referans
Koyun	% 0,25 Tripsin, kolajenaz ve proteaz solüsyonları ile ajitasyon	Hücreler tamamıyla uzaklaştırılmış, GAG miktarında % 63'e kadar bir azalma görülmüş	Basma sertliğinde artış gözükmüş	[88]
Domuz	Fiziksel ön işlem, % 0,1 SDS ile ajitasyon	% 95 oranında genomik DNA azalışı, % 59 oranında GAG miktarında azalma	Basma modülünde azalış, basma geçirgenliğinde artış gözükmüş	[89]
İnsan	% 2 (a/h) SDS ile muamele	Histoloji çalışmalarında hücreler tamamıyla uzaklaştığı görülmüş	Basma özelliklerinde bir değişiklik gözlenmemiş	[90]
Koyun	% 0,05 tripsin/edta ile ajitasyon, % 2 Triton X-100 ile ajitasyon	% 55'e kadar genomik DNA'da azalış	Basma ve çekme özelliklerinde değişiklik gözlenmemiş	[91]

Sığır*	% 0,1 SDS ile sonikasyon	Hücrelerin % 92'ye kadar azaldığı, % 61 oranında da GAG miktarının azaldığı raporlanmış	Basma sertliğinde artış gözükmüş	[92]
Koyun	Fiziksel ön işlem, NaOH ile inkübasyon, guadinin klorür ve sodyum asetat ile ajitasyon	İn vivo çalışmasında meniskal allogreftlerin başarılı olduğu fakat proteoglikanların deselülerizasyon sonunda azaldığı görülmüş	Dinamik modüllüsünde azalış gerçekleşmiş	[93]
İnsan	%0,05 Tripsin/EDTA ile ajştasyon, % 2 Triton X-100 ile ajitasyon	Deselülerizasyon sonucunda hücrelerin efektif bir biçimde uzaklaştığı, insan yağ kökenli kök hücreleri ile kültürde hücresel infiltrasyonunun deselülerize NP iskelelerde gözüktüğü raporlanmış	Dinamik modüllüsünde yarı yarıya azalma gerçekleşmiş	[94]
Domuz	Fiziksel ön işlem, % 1 SDS ile ajitasyon	Genomik DNA'da % 90 azalış, % 50 GAG'da azalış	Kompresif özelliklerinde yarı yarıya azalış	[95]
Tavşan*	Fiziksel ön işlem, % 0,1 Triton X-100 ile ajitasyon, % 0,25 Tripsin ile ajitasyon	% 91 oranında genomik DNA'nın uzaklaştığı, % 90'dan fazla GAG kaybı yaşandığı gözlenmiş	-	[96]

*: intakt menisküsten ziyade 10x3x3 mm dokular üzerinde deselülerizasyon prosesleri gerçekleştirilmiştir.

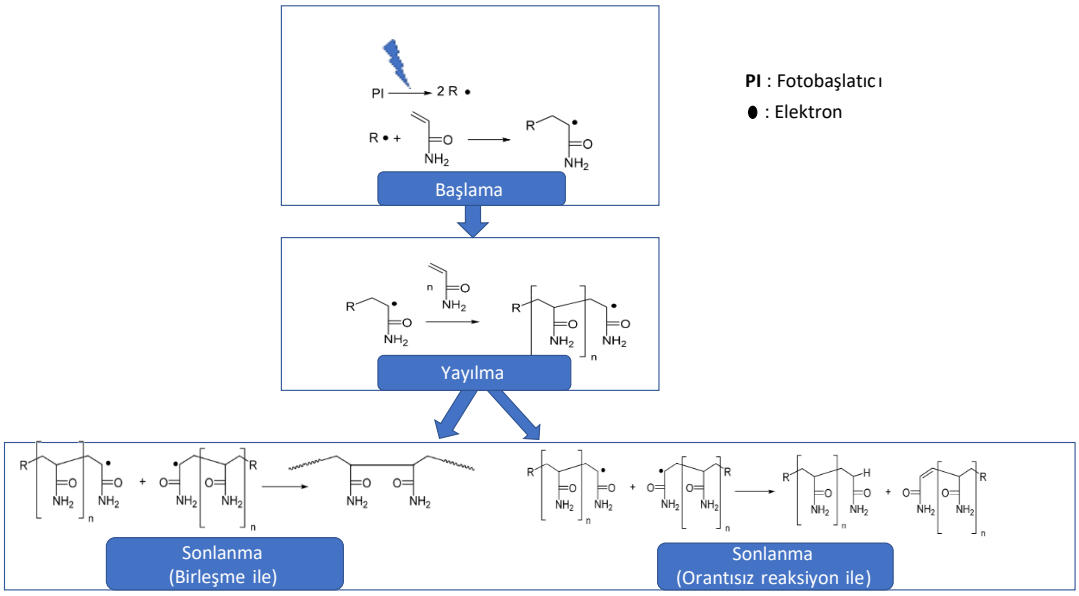
2.5. *In situ* Fotopolimerizasyon ve Özellikleri

Polimerizasyon prosesinde monomer zincirleri solüsyonda bulunan diğer monomer zincirleri ile reaksiyona girerek 3B ağ yapılarını oluştururlar. Polimerizasyon reaksiyon mekanizmalarına göre 2 tip oluşum vardır: basamak polimerizasyon (1) ve zincir büyüme polimerizasyonu (2). Zincir büyüme polimerizasyon metotlardan biri olan fotopolimerizasyon 10 yılı aşkın süredir biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Görünür ya da UV-ışık yardımı ile tersinir olmayan kovalent bağlar meydana getirilerek çapraz bağlanmış 3B yapılar *in situ* olarak gerçekleştirilmektedir [97]. Kimyasal olarak

çapraz bağlanmış olan ve bu proses ile oluşturulan yapılar fiziksel çapraz bağlanmış eşdeğerlerine göre daha iyi mekanik özelliklerin yanı sıra fizyolojik koşullar altında stabilitesi yüksek olması bakımından daha avantajlı olmaktadırlar. Bunun dışında ayarlanabilen UV dozajı ve toksik olmayan ajanların çapraz bağlama için kullanımı fotopolimerizasyonu doku mühendisliği, ilaç taşınımı ve biyosensörler için avantajlı kılmaktadır.

2.5.1. Polimerizasyon Mekanizması ve Fotobaşlatıcılar

Fotopolimerizasyon prosesi için polimerin metakrilat ya da akrilat gibi fotoreaktif gruplar ile modifiye edilmiş olması lazımdır. Bir fotobaşlatıcı aracılığıyla ve fotoreaktif polimerler ile *in situ* polimerizasyon sağlanmaktadır. Buradaki ışığa duyarlı olan foto başlatıcılar zincir polimerizasyonunu başlatmak adına modifiye polimerde bulunan karbon çift bağların serbest radikallere ayrışmasını sağlamaktadır [98]. Serbest radikal polimerizasyon 3 adımda ilerlemekte olup bunlar; (1) başlama, (2) yayılma, (3) sonlandırma adımlarıdır. Başlama adımında fotobaşlatıcı gelen ışığı absorblayarak serbest radikal üretmektedir. Üretilen bu serbest radikaller monomer zincirinde bulunan metakrilat ya da akrilat gruplarının karbon çift bağları (vinil gruplar) ile etkileşime girerek serbest radikal monomerler oluşturur. Yayılma adımında ise bu monomerlerden bir elektron polimer zincirindeki vinil gruplarındaki bir karbon ile tepkimeye girerek onlara bağlanır ve polimer zincirinin uzamasını sağlar. Bu aşama monomer kalmayıncaya dek devam eder ve sonlandırma adımına ilerlenir. Polimer zincirindeki iki eşleşmemiş elektronunun daha uzun bir polimer zinciri meydan getirmesi için birleştiğinde ya da kombinasyonunda sonlanma adımı başlar. Başka bir durum olarak, orantısız bir reaksiyon olarak bir polimer zincirindeki radikal merkez diğer polimer zincirindeki radikal merkeze aktarıldığında sonlandırma adımı oluşur [99]. Şekil 2.9'da serbest radikal polimerizasyondaki basamakların şematik hali verilmiştir.



Şekil 2. 9. Serbest Radikal Polimerizasyonun Basamakları.

Fotobaşlatıcılar foto-duyarlı bileşenler olup biyouyumluluklukları ile sıkça tercih edilmektedir. Serbest radikal polimerizasyon için Tip I ve Tip II fotobaşlatıcılar olarak başlama mekanizmasına göre sınıflandırılmıştır. 2-hidroksi-4'-(2-hidroksietoksi)-2-metilpropiofenon (Irgacure 2959) ve son yıllarda kullanımı daha sık olan lityum fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinat (LAP) ışık altında fotonları absorblayarak 2 serbest radikal üretimini sağlayan tip I fotobaşlatıcılardır. Eosin Y ve riboflavin ikincil radikallerin üretimi için hidrojen ektraksiyonunda yardımcı bir başlatıcıya ihtiyaç duyan tip II fotobaşlatıcılardır. Serbest radikal polimerizasyonda, ışık kaynağının emisyon spektrumu kullanılan fotobaşlatıcının absorbsiyon spekturumu ile çakışması gerekmektedir [100]. Fotobaşlatıcıların kinetiği, başlama hızı (Ri) için, eşitlik 1'e göre çapraz bağlanma verimi açısından önem teşkil etmektedir [101].

$$Ri = \frac{2\phi\varepsilon I f Ci}{N\,h\nu} \qquad \text{Eşitlik 1.}$$

Buradaki ϕ kuantum verimi, ε başlatıcının sönümlemem katsayısı, I başlangıç ışık yoğunluğu, Ci fotobaşlatıcı konsantrasyonu ve f fotobaşlatıcı etkinliğidir. Paydada bulunan N avogadro sayısını, h planck's sabitini ve ν ışığın frekansını temsil eder. Eşitliğe bakıldığında ışık yoğunluğu ve fotobaşlatıcının yoğunluk ve sönümleme katsayısının başlama hızını doğrudan etkilediği görülmektedir. Polimerizasyon hızı ise

başlama hızının karekökü ile doğrudan ilişkilendirilmektedir. Böylelikle fotopolimerizasyonun verimliliği UV ışık şiddetine, dalga boyunun frekansına, fotobaşlatıcının kinetiğine gibi parametrelere bağlı olmaktadır. Çapraz bağlama efektifliği de polimerizasyon hızı aracılığıyla büyük oranda belirlenebilip, optimizasyon için bir fikir vermektedir.

2.5.2. Fotoçapraz Bağlanabilen Polimerler

2.5.2.1. Fonksiyonelleştirilmiş Jelatin (GelMA)

Jelatin FDA (US Gıda ve İlaç Kurumu) tarafından doğal polimer olarak onaylanmış ve medikal uygulamalarda potansiyel kullanımı son yıllarda revaçta olmuştur. Kolajen molekülünde bulunan triple helix (üçlü halkasal) yapının tek moleküllere ayrışması ile jelatin sentezlenmektedir. Kolajen denatürasyonu ve hidrolizi denilen bu ayrışma sonucu oluşan jelatin molekülünde hücre yapışmasını sağlayan Arjinin- glisin-aspartik asit (RGD) protein sekansları denatürasyondan etkilenmez. Bu özelliği sayesinde de doku mühendisliğindeki kullanımları oldukça fazladır. Fakat jelatinin hızlı degredasyon oranı ve düşük mekanik dayanımı gibi dezavantajlarından dolayı çalışmalarda genellikle fonksiyonelleştirilerek kullanılmaktadır [102]. Serbest amin uçlarına mekakrilik anhidritin bağlanması ile fotoçapraz bağlama için serbest radikallerin oluşumuna izin verilir. Bu sayede serbest radikal polimerizasyonun gerçekleştirilmesine olanak tanır; hızlı ve in situ kürlemeyi sağlar [103]. Kıkırdak, kardiyovasküler, tendon vb. doku mühendisliğinde esnek ve ayarlanabilen özellikleri sayesinde GelMA polimerinin geniş bir kullanım ağı olduğu çalışmalarda kanıtlanmıştır [104-106].

2.5.2.2. Poli (etilen glikol) dimetakrilat (PEGDMA)

Poli etilen glikol (PEG) toksisitesi ve immünojenitesi olmayan, düşük maliyetli, hidrofilitesi sayesinde klinik uygulamalarda FDA tarafından olnay almış sentetik bir polimerdir. Kendi kendine polimerize olamayan bu molekülün hidroksil gruplarına akrilat ya da metakrilat gruplarının modifikasyonu ile ışık altında çapraz bağlanabilir yapılar sunmaktadır. Fonksiyonelleştirilmiş PEG polimerlerinin kullanımı monomer konsantrasyonu, molekül ağırlığının değiştirilmesi ile ayarlanabilir kimyasal ve mekaniksel özelliklerini sayesinde doku mühendisliği, dental uygulamalar ve ilaç

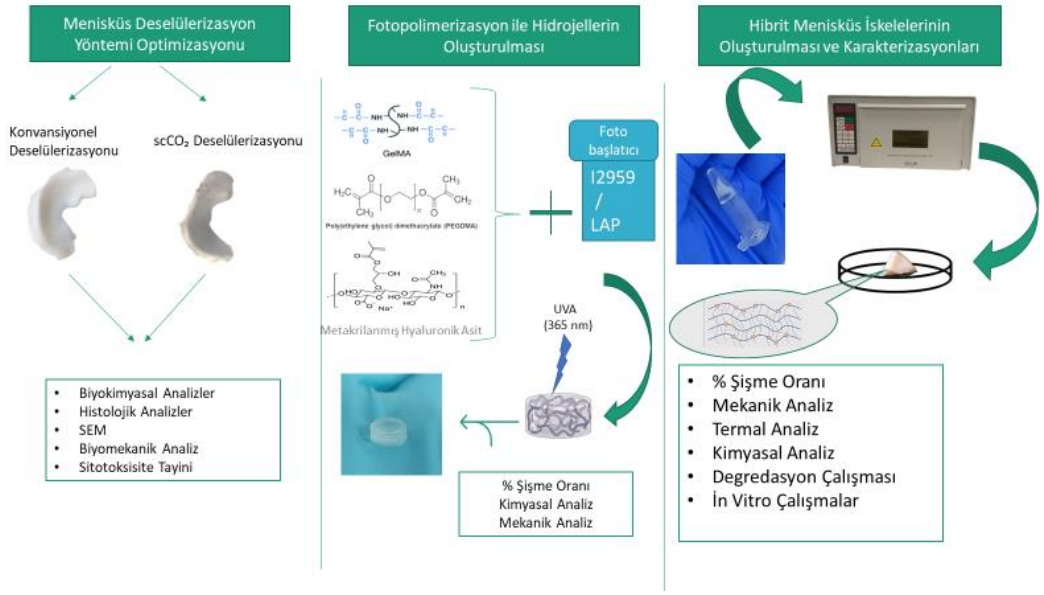
taşınımlarına kadar geniş bir alanda kullanımını avantajlı kılmaktadır [107]. Kemik doku mühendisliği için çalışmasında yüksek mekanik dayanım göstermesi onu ortopedik dokuların rejenerasyonu için kılavuz oluşturacağı bildirilmiştir [108]. Protein ve hücrelere karşı nonadeziv olmasına karşın GelMA polimerinin katılımıyla yüksek hücre yapışması ve proliferasyonu elde edilmiştir [109].

2.5.2.3. Metakrilanmış Hyaluronik Asit (HAMA)

Hyaluronik asit sülfatlanmamış glikozaminoglikanlardan biri olarak bilinen biyouyumluluğu, biyobozunurluğu ve kolay jelleşebilir özellikleri sayesinde tek başına ya da diğer polimerler ile kombinasyonları doku rejenerasyonu için kullanımını avantajlı kılmaktadır. Metakrilat gruplarının HA zincirindeki hidroksil ve reaktif amin gruplarına eklenmesi ile oluşturulan yapılar fonsiyonelleştirilmemiş HA hidrojellerine göre rijiditesini, degredasyon direncini yükseltirken biyouyumluluğunu da korumaktadır [110]. Fotoçapraz bağlanabilir olan HAMA polimeri kemik ve kıkırdak doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan, rejenerasyon kapasitesi yüksek, mekanik ve fiziksel özellikleri geliştirilmiş 3B yapılar oluşturabilmektedir[111, 112].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamındaki deneysel çalışmalar 3 ana adımdan oluşmaktadır. Menisküs doku mühendisliği için geliştirilen iskeleler her bir adımdaki prosese bağlı olarak optimize edilmiştir. Çalışmaların ilk kısmında menisküs deselülerizasyon protokollerinin geliştirilmesi; ikinci kısım olarak kullanılacak hidrojel sistemlerinin sentezi ila parametre optimizasyonu ve nihai hibrit iskele üretimi için karakterizasyonlarının tamamlanması son adımı oluşturmaktadır. Tez çalışmalarındaki adımlar Şekil 3.1'de şematik olarak verilmiştir.



Şekil 3. 1. Tez Çalışmasındaki Adımlar.

3.1. Tez çalışmasında Kullanılan Malzemeler

Deselülerizasyon proseslerinde kullanılan kimyasal ajan SDS Merck (Almanya); enzimatik ajanlardan olan Tripsin 1:250 Amresco (ABD) ve DNAaz I Invitrogen (ABD) firmalarından temin edilmiştir. Şelasyon ajanı EDTA Disodyum dihidrat tuzu Amresco (ABD); Hipotonik ve hipertonik çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan Tris baz tuzu Nzy Tech (Portekiz) firmasından alınmıştır. DNA miktarının tayini için Quant iT PicoGreen dsDNA Assay Kiti Invitrogen (ABD)'den ve Masson's Trichrome kiti ise ScyTek Laboratories (ABD) firmasından tedariği sağlanmıştır. Histoloji çalışmalarında kullanılan formaldehit VWR Prolabo (UK), Fast Green ve Safranin-O Sigma-Aldrich

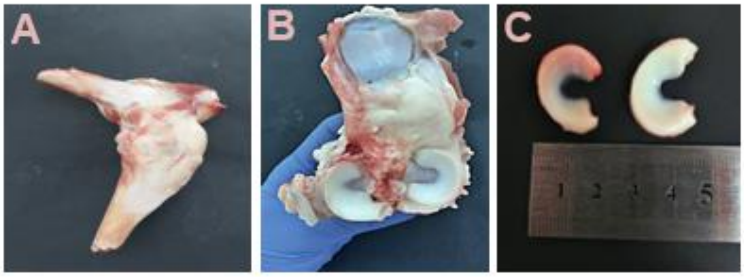
(ABD), DAPI (Ever Bite Handset Mounting Medium with DAPI) Biotium (ABD)'dan satın alınmıştır. Hidrojel sentezi için jelatin tip B (sığır jelatini), metakrilik anhidrit ve Irgacure 2959, LAP Sigma Aldrich (ABD) firmasından; PEGDMA 1000 Polyscience (ABD) ve HAMA Cellink (İsveç) firmalarından satın alınmıştır. Enzimatik degredasyonu sağlaması amacıyla kollajenaz A Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir. L929 Fare Fibroblast hücre hattı ATCC (ABD) bankasından alınmıştır. Düşük glikozlu Dulbecco besi ortamı (L-DMEM), Anbiyotik-Antimiyotik (100X) solüsyonu, Fetal sığır serumu (FBS), L-glutamin, Tripsin-EDTA (%0,25-w/PhenolRed) Capricorn (Almanya) firmasından temin edilmiştir. MTT ajanı Biovision (ABD); Alamar Mavisi Invitrogen (USA) firmalarından sağlanmıştır. Dimetilsülfoksit (DMSO) Sigma-Aldrich (ABD) firmasından sağlanmıştır.

3.2. Deselülerize Menisküs Dokularının Hazırlanması

Menisküs dokusunun deselülerizasyonunda insan menisküsüne benzer mekanik ve fiziksel özelliklere sahip hayvan türlerinden olan koyun diz eklemi ile çalışılmıştır. Diz eklemleri, menisküs dokusunun elde ediminde kullanılmak üzere, kazan mezbahasından alınmıştır. Doku diseksiyonunun ardından yaklaşık olarak aynı en-boy-uzunluklardaki medyal menisküsler hazırlanmıştır. Dokular bir sonraki işleme kadar PBS içerisinde -20ºC'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1. Menisküs Diseksiyonu

Mezbahadan alınan diz eklemleri uygun koşullarda lojistiği sağlanarak kesimden hemen sonra laboratuvara getirilmiştir. Diseksiyon işlemine ilk olarak patellanın diz ekleminden ayrılmasıyla başlanmış; eklem içinin gözükmesi için yağ dokular bisturi yardımıyla uzaklaştırılmıştır. MKL, LKL ve ardından ÖÇB ve AÇB ligamentleri kesilerek tibianın üzerindeki konkav menisküs dokularına ulaşılmıştır. Medyal menisküs dokusu boynuzlarından kesilerek ayrılmış ve boyutları ortalama olarak genişliği 9,12 ± 0,38 mm, uzunluğu 25,73 ± 1,01 mm ve yüksekliği 5,62 ± 0,48 mm olarak bulunmuştur. Tibia yüzeyine ait süperior görüntü ve disekte edilmiş menisküs dokuları Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3. 2. Menisküs diseksiyonununda (A) Diz ekleminin genel görüntüsü, (B) tibia yüzeyinin süperior görüntüsü, (C) disekte edilmiş menisküs dokuları.

3.2.2. Konvansiyonel Deselülerizasyon Protokollerinin Optimizasyonu

Konvansiyonel deselülerizasyon yöntemlerinde fiziksel, kimyasal ve enzimatik muamelelerin her biri veya kombinasyonu ile çalışılmıştır. Fiziksel deselülerizasyon için dondurma-çözme, ozmotik değişimler; kimyasal ajitasyon için SDS ile yıkama ve tripsin ve nükleaz ile de enzimatik ajitasyon menisküs dokularında denenmiştir. Toplam 7 grup ile çalışılmış ve kimyasalların maruz kalma sürelerinin kısaltılması için gruplardaki parametrelerde sırasıyla iyileştirilme yapılmıştır. Çizelge 3.1' de grupların parametreleri ayrıntılı olarak verilir. Menisküs gibi kompakt bir dokuda hücrelere kimyasalların daha kolay ulaşılabilmesi için ön işlemler uygulanmıştır. Fiziksel ajitasyon ile hücre membranlarının parçalanması ve böylece hücrelerin lizis edilmesi amaçlanmaktadır.

Çizelge 3. 1. Konvansiyonel Deselülerizasyon Protokolleri

Gruplar	G-1.Grup	G-2.Grup	G-3.Grup	G-4.Grup	G-5.Grup	G-6.Grup	G-7.Grup
Fiziksel Ajitasyon	Dondurma/ Çözme	PBS Yıkama	Dondurma/ Çözme	PBS Yıkama	Dondurma/ Çözme	Dondurma/ Çözme	Dondurma/ Çözme
	Hipotonik İnkübasyon		Hipotonik İnkübasyon		Hipotonik İnkübasyon	-	-
	Hipotonik Ajitasyon		Hipotonik Ajitasyon		Hipotonik Ajitasyon	Hipotonik Ajitasyon x2	Hipotonik Ajitasyon
Enzimatik Ajitasyon	-	-	-	-	-	Tripsin/EDTA ajitasyonu	Tripsin/EDTA ajitasyonu
Kimyasal Ajitasyon	%2(a/h) SDS ile yıkama (24 saat)	%2(a/h) SDS ile yıkama (24 saat)	%0,5(a/h) SDS ile yıkama (24 saat)	%2(a/h) SDS ile yıkama (48 saat)	%0,5(a/h) SDS ile yıkama (24 saat)	%0,5(a/h) SDS ile yıkama (24 saat)	%0,5(a/h) SDS ile yıkama (24 saat)

PBS Yıkama Süresi	48 saat	48 saat	48 saat	48 saat	48 saat	48 saat	120 saat

Buradaki dondurma-çözme çevrimleri 3 tekrar olacak şekilde sıvısız ve ardından sıvılı ortam içinde yapılmıştır. Hipotonik çözelti olarak Tris tampon çözeltisi pH 8.0 ve 10 mM olacak şekilde hazırlanmıştır. Her bir protokolde PBS yıkaması öncesinde DNAaz enzimi ile 3 saat 37°C'de bir çalkalama işlemi yapılmıştır. Bu işlemin dışındaki tüm işlemlerde aynı karıştırma hızında (110 rpm) orbital çalkalayıcı (Thermoshae Gerhardt, Almanya) ile ajitasyon yapılmıştır.

Ön işlemlerin etkisinin incelenmesi için 1.ve 2. Gruplardan faydalanmıştır. Fiziksel ajitasyonun deselülerizasyona etkisi için %2 (a/h) SDS oranları ve 24 saat maruz kalma süreleri sabit tutulmuştur. 1.grupta ozmotik şok için hipotonik çözelti ile inkübasyon ve ardından ajitasyon oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. 2. Grup için ise SDS muamelesi öncesi 24 PBS yıkaması dokudan fazla kan ve vücut sıvılarının uzaklaştırılması için yapılmıştır.

SDS deterjan oranlarının deselülerizasyona ve dokunun bütünlüğüne etkisinin incelenmesinde 1. Grup ile 3. Grup kullanılmıştır. Burada %2 SDS (a/h) oranına karşılık %0,5 SDS (a/h) gibi düşük bir miktar denenerek hücre uzaklaştırmasına etkisi gözlemlenmiştir.

Kimyasal deterjana maruz kalma süresi artıkça hücre uzaklaştırmasının efektifliği ve ECM bütünlüğüne etkisinin olup olmadığı 2. ve 4. gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Ön işlem prosesi ve SDS oranları değiştirilmemiştir. 4. gruptaki maruz kalma oranı 48 saat olarak belirlenmiştir.

Kimyasal ajanların artan sıcaklıklarda uygulanması ile hücre uzaklaştırılmasında daha etkili olması 3. grup ve 5. gruplar ile kanıtlanmıştır. 3. grubun oda sıcaklığındaki SDS ajitasyonuna karşın 5. grupta bu işlem 45°C'de gerçekleştirilmiştir.

Tripsin enziminin deselülerizasyon başarısına etkisi 5. Grup ile 6. grup kullanılarak gösterilmiştir. 5. Gruptaki ön işlemlerden sonra % 0,05 (a/h) Trispsin/EDTA ajitasyonu 6. grup için 37°C'de uygulanmış olup diğer parametreler stabil olmuştur. Proseste EDTA tripsin enziminin aktivitesini artırmak amacıyla solüsyona eklenmiştir.

Deselülerizasyon sonrası hücre ve hücre artıklarının etkili bir şekilde uzaklaştırılmasının kanıtı olarak PBS ile yıkama süreleri değerlendirilmiştir. 6. Grubun devamı niteliğinde bulunan 7. Grupta 120 saat PBS ile yıkama 24 saatte bir çözelti değiştirilmesi suretiyle yapılmıştır.

3.2.3. Süper Kritik Akışkan Teknolojisi ile Deselülerizasyon Protokollerinin Optimizasyonu

Süper kritik akışkan teknolojisi ile deselülerizasyon laboratuvarımızda bulunan yarı-kesikli reaktör ($scCO_2$ Inc., ABD) aracılığıyla yapılmıştır. Bu reaktördeki odanın iç sıcaklığı ısıtmalı ceket ile sağlanırken; monitör ile sıcaklık değeri dışarıdan kontrol edilmiştir. Prosese başlamadan önce istenilen sıcaklık ve basınç değerleri yine monitör yardımıyla ayarlanmıştır. Menisküs dokusu paslanmaz çelikten oluşan delikli kafes sistemine yerleştirilmiş ve odanın içine konulmuştur. Proseste co-solvent olarak %70 etanol yaklaşık 150-200 ml civarlarında reaktör kanalını doldurmuştur. Sistemin içerisine karbondioksit pompa yardımıyla aktarılmış olup, 37°C sıcaklık 4500 psi (306,21 atm) basınç değerine ulaşıldığında süperkritik karbondioksit deselülerizasyonuna başlanmış kabul edilmiştir. Menisküs gibi yığın dokunun proses öncesi ön işlemlerin deselülerizasyona katkısı ve böyle bir fibröz-kıkırdak dokuda ilk defa denenen süper kritik akışkan teknolojisinin hücresizleştirmeye etkisi için 6 adet grubun optimizasyonuyla gidilmiştir. $scCO_2$ ile yapılan deselülerizasyon gruplarındaki basınç değerleri önceki çalışmalar baz alınarak belirlenmiştir [113]. Aşağıda bulunan çizelge 3.2'de grupların protokolleri yer almaktadır.

Çizelge 3. 2. Süperkritik akışkan teknolojisi ile yapılan deselülerizasyon grupları.

	SK-1	**SK-2**	**SK-3**	**SK-4**	**SK-5**	**SK-6**
Ön işlemler	Dondurma-Çözme	Dondurma-Çözme	Dondurma-Çözme	Dondurma-Çözme	Dondurma-Çözme	Dondurma-Çözme
	-	-	-	NaOH ile inkübasyon	-	-
	Hipotonik Ajitasyon	Hipotonik Ajitasyon	Hipotonik Ajitasyon	Hipertonik Ajitasyon	Hipotonik Ajitasyon	Tripsin/EDTA ile Ajitasyon

	Hipertonik Ajitasyon	Hipertonik Ajitasyon	Hipertonik Ajitasyon	Hipotonik Ajitasyon	Hipertonik Ajitasyon	Hipertonik Ajitasyon
					Dondurarak Kurutma	Hipotonik Ajitasyon
$scCO_2$ Muamelesi	4500 psi, 1 saat	4500 psi, 3 saat	4500 psi, 1 saat	4500 psi, 1 saat	4500 psi, 1 saat	4500 psi, 1 saat
PBS yıkaması	24 saat	24 saat	120 saat	120 saat	120 saat	120 saat

Hipotonik ajitasyon için çözeltideki bileşim oranları aynı kalırken, hipertonik ajitasyon için 50 mM Tris-HCI ile NaCI karıştırılarak kullanılmıştır. Liyofilizatör (dondurarak kurutma) işlemi doku tamamen kuruyana kadar gerçekleştirilmiştir. Tripsin/EDTA ile ajitasyonda %0.05 (a/h) oranı ve 37ºC sabit kalmıştır. CO_2'nin 31°C ve 1071,8 psi (7,39 MPa) üzerinde süperkritik akışkan olarak davrandığı için sıcaklık ve basınç parametreleri bu değerler üzerinde tutulmuştur. Proses boyunca sıcaklık 37-40°C arasında olmuştur. Menisküs dokusunun büyüklüğü ve kompakt yapısından dolayı yüksek basınç değerinde çalışılmıştır. Basınç değerleri sabit tutularak süre ve ön işlemlerin hücresizleştirmedeki etkisi incelenmiştir.

3.2.4. Deselülerize Menisküs Dokularının Karakterizasyonları

Menisküs deselülerizasyonu için optimum yöntem ve protokolün belirlenmesi adına çeşitli karakterizasyonlar konvansiyonel ve $scCO_2$ grupları arasında uygulanmıştır. Deselülerizasyonun başarı ölçütlerine, gruplar arasında histolojik çalışmalar gerçekleştirilerek kalitatif analizine ve biyokimyasal çalışmalar ile de kantitatif analizlerine uygulanarak bakılmıştır. En verimli deselülerizasyon yönteminin belirlenmesi adına yüzeysel görüntüleme, morfolojik, biyomekanik analizler ve sitotoksisite testleri konvansiyonel ve $scCO_2$ deselülerizasyon grubunun karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır.

3.2.4.1. Histolojik Analizler

Hücresizleştirmenin efektifliğini gösteren hücre çekirdekleri ve kalıntılarının dokudan tamamen uzaklaşmış olmasının kanıtı olarak Hematoksilen&Eozin (H&E) ve 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) boyamaları gerçekleştirilmiştir. Bu boyamalar ile

hem hücre çekirdeklerine hem de sitoplazma bileşenleri ve ECM bütünlüğüne bakılmıştır. Menisküs dokusundaki ana bileşen olan kolajen yapıları Masson Trichrome boyaması ile görüntülenmiştir. Dokuya viskoelastik özelliği sağlayan glikozaminoglikan yapılarının bağlı olduğu proteoglikanların görüntülenmesinde Safranin-O/Fast Green boyamasından yararlanılmıştır. Menisküs dokusundaki bölgesel farklılıklarında görülmesi için cross- section (enine) bir kesit alınarak histolojik çalışmalara devam edilmiştir. Her bir gruptan alınan kesitler % 10 formalin ile fikse edilmiş ve fiksatif ajanın uzaklaştırılması için çeşme suyu yıkaması 1-2 gün suretiyle yapılmıştır. Bu işlemin ardından, dehidrasyon süreci için, % 70 alkolden % 100 absolute alkole doğru bir inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ksilende 1 saat bekletildikten sonra parafin serisi dokulara uygulanmış ve ardından parafin bloklamaya geçilmiştir. Boyamalar için 5 mikron kalınlığında örnekler mikrotom yardımıyla alınmış ve 1 gece etüv içinde (60°C) bekletilmiştir.

3.2.4.1.1. Hematoksilen & Eozin (H&E) Boyaması

Bazik bir boya olan Hematoksilen DNA/RNA gibi hücre çekirdek materyallerini boyamaktadır. Eozin ise asidik boya olması nedeniyle sitoplazma yapılarını boyayarak deselülerizasyonun verimi için bilgi vermektedir. Deparafinizasyonu yapılan örnekler boyama için ksilen ve ardından %100'den %80'e doğru azalan bir alkol serisinden geçirilmiştir. Hemotoksilen şalesinde 2-3 dk bekletildikten sonra asit alkol ile matlaştırılma sağlanmıştır. Hemen akabinde eozinde 15 dk duran örnekler dehidrasyona tabi tutularak entallan ile kaplanmıştır. Bu boyamada hücre çekirdekleri mavi/mor renkte gözükürken; ECM yapıları pembe/kırmızı renge bürünmektedir. Işık mikroskobisi (Leica Microsystems, Almanya) ile her bir gruptan görüntüler alınmıştır.

3.2.4.1.2. 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) Boyaması

Menisküs dokusundaki hücre çekirdekleri ve ECM bütünlüğüne DAPI boyaması ile de bakılmıştır. Dapi, hücre genetik materyeli olan DNA'nın adenin-timin bölgelerine bağlanarak bir florasan kompleksi oluşturmaktadır [114] . Bu sayede hücre çekirdek ve kalıntıları mavi renk olarak görülmektedir. Deparafinizasyonu tamamlanan örnekler 5 dk dapi boyaması ile karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Florasan ataçmanlı ışık mikroskobunda her bir grup için görüntü çekilmiştir.

3.2.4.1.3. Masson Trichrome Boyaması

Menisküs dokusundaki kolajen fibrillerin oryantasyonu ve ultrayapısının gözlenmesi amacıyla Masson Trichrome boyaması yapılmıştır. Kit şeklindeki boyanın kendi protokolü uygulanmıştır. Öncelikle parafini eritilen kesitler alkol serisi ile rehidre edilmiştir. Weigert's iron Hematoksilen ile 10 dk kadar bir muamele ardından akan çeşme suyunda yıkanmıştır. Biebrich scarlet-acid fuchsin ile 10-15 dk bekletilen örneklere phosphomolybdic-phosphotungstic asit damlatılmıştır. Kesitlerdeki kırmızılık geçene kadar bekletilmiş ve anilin mavisi ile 10 dakika kadar boyama sağlanmış ve asetik asit solüsyonun 3 dk bekletilmesiyle farklılaşma olmuştur. Distile su ile yıkanan örnekler dehidrasyon için alkol serisine tabi tutularak entallan ile kaplanmıştır. Bu boyamada hücre çekirdekleri siyah, kolajen yapıları mavi ve sitoplazma kırmızı renkte görülmektedir. Görüntüler ışık mikroskobisi ile alınmıştır.

3.2.4.1.4. Safranin/Fast Green Boyaması

Katyonik bir boya olan Safranin O glikozaminoglikanların yanı sıra proteoglikanları kırmız/pembe renge boyamaktadır. Hücre çekirdekleri Weigert’s iron hematoksilen A-B boyaması ile koyu kırmızı/siyah rengini vermektedir. Fast Green ile de sitoplazma yeşil/gri-yeşile bürünmektedir. Parafini eritelen kesitler diğer boyamalardaki gibi ksilen ve azalan alkol serisinden geçirilmiştir. Çekirdekleri Weigert’s iron hematoksilen A boyası ile Weigert’s iron hematoksilen B boyası aynı oranda karıştırılıp preparatların üzerine damlatılmıştır. İşlemin ardından çeşme suyu yıkaması fazla boyanan akıtılması için yapılmıştır. Fast Green ile kesitlerin boyanmasının ardından %1 (h/h) asetik asit ile 10-15 saniye muamele edilmiştir. %0,1 (a/h) Safranin O boyası ile 5 dakika kadar bekletilmiş ve ardından %95-100 alkol serisi uygulanmıştır. Ksilende kesitler bekletildikten sonra entallan uygulanarak kesitler mikroskop altında görüntülenmiştir

3.2.4.2. Biyokimyasal Analizler

Hücresizleştirmedeki etkinlik histolojik boyamalar dışında biyokimyasal analizlerin yapılması ile desteklenmiştir. İşlem görmemiş (doğal menisküs) ve deselülerize gruplara genomik DNA ölçümü, kolajen miktar tayini için hidroksiprolin analizi ve

toplam glikozaminoglikanların miktarının belirlenmesinde kullanılan DMMB analizi yapılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

3.2.4.2.1. Genomik DNA Tayini

Deselülerizasyon proseslerinde sonra menisküs dokusundaki artık genomik DNA miktarı Picogreen analizi ile tespit edilmiştir. Kullanılan test kiti dokuda bulunan tek ya da çift sarmal yapıdaki DNA'ların tayinini yapabilmektedir. İşlem görmemiş (kontrol) ve deselülerize gruplardaki dokular 1 gece liyofilizatörde kurumaya bırakılmıştır. Dokuların orta kısmından olacak şekilde 10 mg tartılarak % 70'lik etanol ile sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Etanolün uzaklaşması için PBS ile yıkamayı takiben 1 gece liyofilizatörde kurutulmuştur. Steril örnekler ependorflara yerleştirilmiş ve üzerlerine 1 mg/ml Proteinaz K içeren amonyum asetat çözeltisi eklenmiştir. Dokuların parçalanması için 60°C'ye ayarlanmış etüv içerisinde 1 gece boyunca bekletilmiştir. Picogreen analizi için DNA stok solüsyonu artan konsantrasyonlarda hazırlanarak kalibrasyon grafiği için değerler oluşturulmuştur. Kit içerisinde verilen protokolün talimatları ile örneklerden 50 µL alınmış ve 96 kuyucuklu kültür kabına eklenmiştir. Üzerlerine picogreen boyası 50 µL olacak şeklide eklenerek karanlık ortamda çalışma gerçekleşmiştir. Hazırlanan standart ve örnekler 485-520 nm'de mikroplate okuyucuda her gruptan 3 okuma olacak şekilde absorbansları okunmuştur.

3.2.4.2.2. Toplam Kolajen Miktar Tayini

Doğal menisküs ve deselülerizasyon işlemi sonrasında dokulardaki kolajen miktar değişiminin saptanması hidroksiprolin kiti ile gerçekleştirilmiştir. Hidroksiprolin kolajen yıkımıyla ortaya çıkan bir aminoasittir. Bu da deselülerizasyonun kolajen fiberler üzerinde bir etkisini incelemeye olanak sağlamaktadır. 10 mg tartılan kontrol (doğal menisküs) ve deselülerize dokular (n=3) 10N HCI ile 3 saat muamelenin ardından 10 µL ekstrakt alınarak 96 kuyucuklu kültür kaplarına konulmuştur. 1 gece etüv içerisinde 60°C'de kurutulan örneklerin üzerine sırasıyla kloramin T ve DMAB ajanı eklenmiş 60°C'de 90 dk inkübasyonu sağlanmıştır. Standart olarak yine hidroksiprolinin farklı konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hidroksiprolin Analizi 560 nm'de mikroplate okuyucuda gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.2.3. Toplam GAG Miktar Tayini

Deselülerize gruplar ve kontrol grubundaki GAG miktarları kalorimetrik olarak 1,9 dimetilmetilen mavisi (DMMB) ile incelenmiştir. 10 mg tartılan kuru dokular 1 mg/mL Proteinaz K aracılığıyla enzimatik olarak parçalanmıştır. Metakromatik boya olan DMMB hazırlanışında 500 mL amonyum asetat, 8 mg 1,9-Dimetil-metilen mavisi çinko klorür çift tuzu, 40 mM Sodyum klorür (NACI), 40 mM Glisin, 0,1 M HCl (Hidroklorik asit) kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyon 0,45 mikron filtre ile süzdürülerek karanlık ortamda bekletilmiştir. Kalibrasyon grafiğinde kullanılmak üzere kondroitin sülfat amoyum asetat içerisinde çözündürülerek artan konsantrasyonları standart olarak hazırlanmıştır. 40 µL örnekler 96 kuyucuklu kültür kabına yerleştirilmiş ve ardından 200 ul DMMB test solüsyonu eklenmiştir. 525 nm dalga boyu ile mikroplaka okuyucuda absorbansları okunmuştur.

3.2.4.3. Yaş ve Kuru Ağırlık Değişimleri

Hücresizleştirme işleminin dokulardaki su tutma kapasitesine etkisini incelemek için yaş ve kuru ağırlık farklarından yararlanılmıştır. İşlem görmemiş doğal doku ve deselülerize grupların yaş ağırlıkları (n=4) hassas terazide tartılmış ve ardından 1 gece dondurarak kurutulmuş ağırlıklarına bakılmıştır. Su tutma kapasitesinin tayini için eşitlik 2.'den yararlanılmıştır [115].

$$Su\ Tutma\ Kapasitesi = \frac{Ws\ -\ Wd}{Ws} \times 100 \qquad \text{Eşitlik 2.}$$

Burada Ws dokuların ıslak ağırlıklarını, Wd kuru ağırlıklarını ifade etmektedir.

Deselülerizasyon yönteminin dokudaki ağırlık kaybı ile ilişkisini belirlemek amacıyla konvansiyonel ve $scCO_2$ optimum deselülerize grupları arasında bir ağırlık karşılaştırılması yapılmıştır. Doğal menisküs dokusu işlem öncesinde tartılmış ve her bir deselülerizasyon aşamasından sonra ağırlık değişiminin incelenmesi için tartım alınmıştır.

3.2.4.4. Morfolojik Analiz

Doğal menisküs ve aselüler gruplar arasında hücresizleştirme prosesinin fiziksel görünümündeki değişimleri için morfolojik olarak görüntü makroskobik olarak alınmıştır.

3.2.4.5. Taramalı Elektron Mikroskobi (SEM) Analizi

Menisküs deselülerizasyonu ile dokuda heterojenik bir hizalanış gösteren kolajen fiberler ve oryantasyonundaki değişimler SEM analizi ile incelenmiştir. Analiz yapılacak işlem görmemiş (kontrol) grubu ve hücresiz gruplar 1 gece liyofilizatörde kurutulmuştur. Kurutulan örneklerden, dokunun 3B kolajen ultrayapısı ve sirkümferansiyel hizalanmadaki dizilişin görüntülenmesi adına, cross-section (enine) ve boyuna kesitler alınmıştır. Hazırlanan kesitlere altın-paladyum (Au-Pd) kaplaması yapıldıktan sonra taramalı elektron mikroskobisinde (Tescan, Çekya) görüntülenmiştir. Görüntüleme 250x-5000x arasında yapılmıştır.

3.2.4.6. Biyomekanik Analizi

Menisküs dokusunun anizotropik olan biyomekanik özelliklerinde 3B kolajen ultrayapısı ve GAG içeriği büyük rol oynamaktadır. Deselülerizasyon prosesleri ile dokunun biyomekanik özelliklerdeki kayıpların incelenmesi adına basma (Kompresif) testleri yapılmıştır. İşlem görmemiş (kontrol) ve deselülerize grupların posterior bölgesinden (n=3) 6 mm biopsi punch yardımıyla kesilerek 6 x 5 mm bir silindirik yapılar analiz için oluşturulmuştur. Örnekler analize kadar PBS içerisinde bekletilmiş olup, 1000N yük hücresi ile basma analizi (Instron 5944, ABD) gerçekleştirilmiştir. Stress-strain grafiği bulunan değerler ile oluşturulup, elastik modülüsü grafik eğrisinden hesaplanmıştır. Analiz konvansiyonel ve süperkritik CO_2 deselülerizasyonundaki optimum gruplar ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.7. Sitotoksisite Analizi

Aselüler menisküs dokularının hücre canlılığındaki sitotoksik etkisini incelemek amacıyla 3-(4,5-dimetiltiyazol2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) analizi kullanılmıştır. ISO standardadına göre in direkt MTT (elüsyon metodu) ile

gerçekleşmiştir. Azot tankından bulunan L929 hücre hattı %10 fetal sığır serumu (FBS), % 1 antibiyotik-antimiyotik ve % 1 L-glutamin içeren DMEM besiyeri kullanılarak T75 flasklarda kültüre edilerek çoğaltılmıştır. Dondurulmuş hücreler öncelikle 37°C sıcaklıktaki su banyosunda (Memmert, Almanya) çözdürülmüştür. Ardından 5 mL besiyer içeren çöktürme ortamına çözdürülen hücre eklenmiştir. 2500 rpm'de 3 dk santrifüjleme işleminden sonra çözeltinin süpernatantı atılmıştır. Hücre pelletleri 1 mL besiyer eklenmesiyle homojen çözelti elde edilmiştir. T75 flasklarına 11 ml konulan besi ortamının için hücre süspansiyonu eklenerek CO_2 etüvde (Memmert, Almanya) kültüre edilerek çoğaltılmıştır.

Hücreler konfluens olduğunda Tripsin/EDTA solüsyonu kullanılarak yüzeyden kaldırılmış ve 2500 rpm'de 3 dk santifüjlenmiştir. Süpernatant dökülerek kalan hücre pelletleri üzerine besi ortamı eklenmiş ve homojen çözelti elde edilmiştir. Hemotosimetre ile hücre sayımı yapıldıktan sonra 24 kuyucuklu kültür kaplarına $2x10^4$ hücre ekilmiş ve 24 saat inkübasyonu sağlanmıştır. Bu esnada her iki deselülerizasyon metodu için dokuda kalabilecek hücre artığı ya da deterjan kalıntıları için 2 gün DMEM yıkaması gerçekleşmiştir. % 70 etanol sterilizasyonuna ve 2 saat arkalı önlü UVC ışık altında sterilizasyondan sonra örnekler 0,8 g doku (n=4) her bir grup için tartılmıştır. Ekstraksiyon metodu uygulanan MTT analizinde steril malzemeler 0.2 g başına 1 mL DMEM besiyeri olacak şekilde toplam 4 ml antibiyotik içeren DMEM içinde 1 gece CO_2 etüvde inkübe edilmiştir. 24 saat sonra kuyucuklardaki beisyer uzaklaştırılıp % 100 ekstraksiyon ortamı eklenmiştir. 1 gün sonra kuyucuklara formazan kristallerinin oluşturması adına 2,5 mg/mL MTT solüsyonu 600 µL DMEM ile karanlık ortamda koyulmuş ve 3 saat CO_2 etüvde bekletilmiştir. Formazan kristallerinin çözülmesi için solüsyon uzaklaştırılarak 405 µL DMSO koyulmuştur. Süpernatanttan alınan 200 µL 96 kuyucuklu kültür kabına 5 okuma olacak şekilde aktarım yapılarak 570/620 nm dalga boylarındaki absorbansları ölçülmüştür.

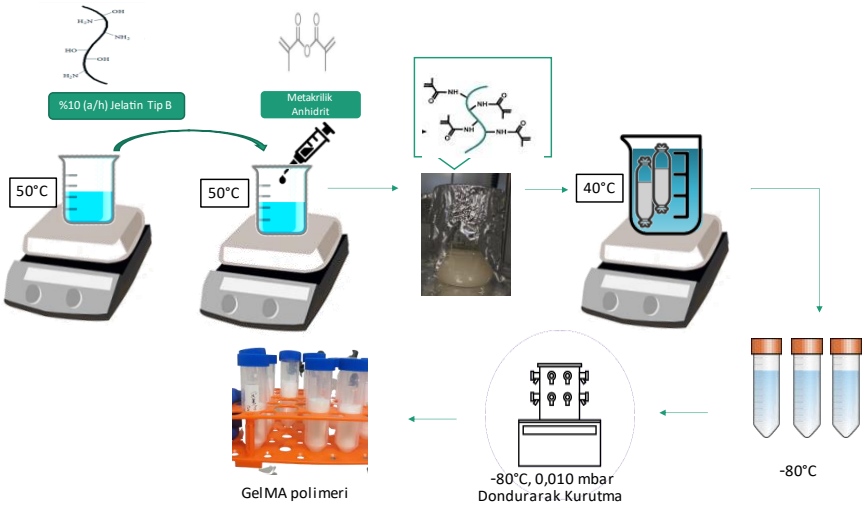
3.3. Foto Çapraz Bağlanabilen Hidrojellerin Hazırlanması

Hibrit doku greftlerinin hazırlanmasında öncelikle deselülerize menisküs dokularından, çapraz bağlama etkinliğini incelemek amacıyla, 5 mm genişliğinde iskeleler posterior bölgeden alınmıştır. Medyal menisküs dokusunda posterior bölge dokunun diğer kısımlarına göre daha düşük dayanım göstermesi ile yaralanmalarda yüksek prevelans

göstermektedir [116]. Bu yüzden bu bölge ile tez çalışmalarına devam edilmiştir. Burada, öncelikle ayrı bir çalışma olarak hibrit hidrojellerin sentezi ve karakterizasyonu foto çapraz bağlama için parametre optimizasyonu yapılmıştır. Ardından deselülerize iskeleler ile birleşimi sağlanarak UVA ışık altında çapraz bağlanmıştır.

3.3.1. Metakrilanmış Jelatinin Sentezi (GelMA) ve Fonksiyonelleşme Derecesinin Hesaplanması

Jelatinin UV ışık altında çapraz bağlanabilmesi için, polipeptit zincirindeki lizin ve hidroksil lizin grupları ile doymamış metakriloil monomer grupları arasında reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Laboratuvarımızda öncesinde optimizasyonu yapılan GelMA protokolü modifiye edilerek hazırlanmıştır [117]. Öncelikle %8-10 (a/h) oranında jelatin PBS (pH=7.4) içinde 30 dakika kadar çözdürülmüştür. Karışım için sıcaklık 50°C'de tutulmuş ve balık ile manyetik karıştırıcıda devam ettirilmiştir. Metakrilik anhidrit %8-10 (h/h) oranında 0,5 mL/dk sabit akış hızıyla çözeltiye eklenerek reaksiyon homojen bir apak çözelti olana kadar sürdürülmüştür. 10-12 kDa cut-off değerine sahip diyaliz membran kullanılarak fazla metakrilik anhidritin uzaklaştırılması için diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemi 4 hafta kadar 40°C'de sürekli karışarak ve gün aşırı yıkama solüsyonu değiştirilerek devam etmiştir. Saflaştırma işlemi ardından örnekler toz haline gelmesi için liyofilize edilmiş ve bir sonraki işleme kadar -80°C'de saklanmıştır. GelMA polimerinin hazırlanmasındaki adımlar Şekil 3.3'te görsel olarak verilmiştir.



Şekil 3. 3. GelMA polimerinin sentez aşamaları.

Sentezlenen GelMA'nın metakrilasyon derecisinin hesaplanması için serbest amin gruplarına bağlanan metakrilat gruplarının fonksiyonelleşmemiş jelatine göre yer değiştirilmesi ölçülmüştür. Bu kapsamda hem metakrilasyon derecesinin tayini hem de yan ürün olan metakrilik asidin varlığını belirlemek için proton nükleer manyetik spektroskobisi (^{1}H-NMR) kullanılmıştır. Bunun için jelatin ve GelMA numuneleri 15 mg/ml olacak şekilde dötoryum oksit (D_2O) içinde çözündürülmüş ve analiz 300 MHz Bruker Biospin cihazında gerçekleştirilmiştir. Metakrilasyon derecesinin (MD) hesabı eşitlik 3.'e göre yapılmıştır.

$$MD\ (\%) = 1 - \frac{\int Lizin\ metilen\ piki\ GelMA}{\int Lizin\ metilen\ piki\ jelatin} \qquad Eşitlik\ 3.$$

3.3.2. Hibrit İskelede Kullanılacak Hidrojellerin Optimizasyonu ve Karakterizasyonları

Tez çalışmasında kullanılacak hidrojeller için foto başlatıcı bileşeni ve farklı polimer karışımları incelenmiştir. Öncelikle I2959 foto başlatıcı PBS (pH:7.4) içerisinde % 0,5 (a/h) olacak şekilde 40ºC'de çözündürülmüştür. GelMA %10 (a/h) oranında stok çözeltiye eklenmiş ve termal jelleşmenin önlenmesi için 40°C sıcaklıkta soniklenmiştir. Homojen bir çözelti elde edilene kadar devam edilen bu işlem ardından prepolimer 5x5 mm silindirik disklere konulup UV ışık (UVP CL-1000L,) altında çapraz bağlanmıştır. Hibrit hidrojellerin oluşturulması adına PEGDMA % 10 (a/h) oranında çözeltiye eklenmiştir. I2959 foto başlatıcısı ile 810 µJ/cm² ışık şiddetinde 9 dakikada jelleşme gözükmüştür. Reaksiyona girmeyen polimer ve foto başlatıcı 1X PBS yıkaması ile uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Foto başlatıcı optimizasyonu için LAP % 0,1 (a/h)'de PBS içinde çözdürülüp stok solüsyonu hazırlanmıştır. GelMA ve GelMA/PEGDMA hidrojelleri aynı konsantrasyonları sabit kalacak şekilde stoktan hazırlanarak yapılmıştır. LAP foto başlatıcısı ile 810 µJ/cm² ışık şiddeti ile 5 dakikada jelleşen hidrojeller sonrasında 1X PBS yıkaması yapılmıştır.

Literatürde ilk defa denenecek olan GelMA/PEGDMA/HAMA (PGH) karışımında HAMA ağırlıkça % 2 oranında karışıma eklenmiştir.

3.3.2.1. UV Absorbans Analizi

I2959 ve LAP foto başlatıcılarına 365 nm deki absorbans derinliği ve molar sönümleme katsayısının hesaplanabilmesi adına UV absorbans ölçümü yapılmıştır. Her iki foto başlatıcı ajanın 3 mL'lik homojen stok çözeltileri hazırlanmıştır. Ağırlıkça %1 'den % 0,1 (a/h) 'e doğru azalan konsantrasyonlar stok solüsyondan hazırlanmıştır. Hazırlanan numuneler 4 ml'lik quartz küvetlerine konularak 200-500 nm dalga boyundaki absorbansları UV/Vis Spektrofotometre cihazı (Agilent Technologies, ABD) ile ölçüm alınmıştır. Beer-Lambert yasasına göre 365 nm'deki absorbansına göre molar sönümleme katsayısı Eşitlik 4'e göre hesaplanmıştır [118].

$$A = \varepsilon . L . C \qquad Eşitlik\ 4.$$

Burada A absorbansı, ε molar sönümleme katsayısı(1/M.cm), L solüsyon derinliğini (cm) ve C fotobaşlatıcının molar konsantrasyonunu (M) temsil etmektedir.

3.3.2.2. Şişme Testi ve Sol Fraksiyon Analizi

Hidrojellerin şişme özelliklerinin değerlendirilmesi fizyolojik koşullardaki yapısal stabilitelerinin korunmasının yanı sıra zamanla yapı ve şeklin uygunluğunu korumasını belirlemek için de yapılmaktadır. UV ile çapraz bağlanan hidrojeller 1 gece liyofilizatörde başlangıç kuru ağırlıklarının (W_o) tayini için kurutulmuştur. Bunu takiben şişme analizi için numuneler PBS (pH:7.4) içinde denge şişme modülü elde edilene kadar tutulmuştur. Belirlenen zaman aralıklarında ıslak ağırlık için tartım yapılmış ve 24. Saat sonunda denge modülüne ulaşılmıştır. Numunelerin ıslak ağırlıkları (W_1) için filtre kağıdında fazla suyu alınarak tartılmıştır. Şişme oranı eşitlik 5 ile hesaplanmıştır.

$$Şişme\ Oranı\ (\%) = \frac{W_1 - W_o}{W_o}\ x\ 100 \qquad Eşitlik\ 5.$$

Sol fraksiyonu oluşturulan hidrojellerdeki çapraz bağlanmamış monomerlerin miktarını verebilen ve çapraz bağlama etkinliğini gösteren analizdir. Fotopolimerizasyon sonrasında hidrojeller 1 gece boyunca kurutulmuş ve ilk kuru ağırlıkları (W_1) tartılmıştır. Ardından numuneler PBS tamponu içerisinde 37°C'de inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda alınan numuneler tekrar dondurularak kurutulmuş ve son kuru ağırlık tayini (W_2) için tartım yapılmıştır. Sol fraksiyonu Eşitlik 6'da verildiği gibi belirlenmiştir [119].

$$Sol\ Fraksiyon\ (\%) = \frac{W_2}{W_1}\ x\ 100 \qquad Eşitlik \quad 6.$$

3.3.2.3. Biyomekanik Analiz

Fotobaşlatıcı seçimi, polimer karışımları gibi ayarlanabilen fotopolimerizasyon parametrelerinin etkinliğini belirlemek adına mekanik analiz gerçekleştirilmiştir. Hidrojel grupları çapraz bağlandıktan sonra analize kadar PBS ortamında bekletilmiştir. Mekanik özelliklerinin saptanmasında 50 N yük hücresine sahip olan bir mekanik analizör (Cell Scale, Kanada) ile basma testi uygulanmıştır. 6 mm çap ve 5 mm yükseklikteki hidrojeller 1 mm/dk basma hızına maruz bırakılmıştır. Elastisite modülleri çekme-uzama grafiğinin eğiminden elde edilmiştir.

3.3.2.4. Kimyasal Analiz

Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi (FTIR) analizi ile hidrojellerin kimyasal yapılarındaki değişimler tespit edilmiştir. Hidrojel grupları analizden önce -80°C'de dondurularak kurutulmuştur. 4000-600 cm^{-1} spektrum aralığındaki FTIR Spektrofotometre (Agilent, ABD) cihazı ile analiz yapılmıştır.

3.4. Hibrit Doku İskelelerinin Hazırlanması

Deselülerizasyon işleminde başarılı olan gruba çapraz bağlanabilirliği ve i*n situ* polimerizasyonunun menisküs iskelesindeki etkinliğini ölçmek için oluşturulan jel yapıları emdirilmiştir. Hücresiz menisküs dokuları ilk olarak liyofilize edilmiştir. 5 mm

kalınlığındaki posterior bölgeden alınan iskeleler gelma hidrojeli aracılığıyla emdirme optimizasyonuna tabi tutulmuştur. Burada, kalınlığa göre emdirilecek prepolimerin hacmi ve emdirme yöntemleri optimize edilmiştir. Morfolojik bir görüntüleme sağlaması amacıyla gıda boyası prepolimere eklenmiş ve inkübasyon sağlanmıştır. Kantitatif bir analiz olarak şişme testi ve sol fraksiyon analizine (n=3) bakılmıştır. Çizelge 3.3'te grupların emdirilme yöntemleri verilmiş ve bu 4 grup üzerinden başarılı protokole gidilmiştir.

Çizelge 3. 3. Jel emdirme yöntemlerinin prosesleri

	1	**2**	**3**	**4**
EMDİRME YÖNTEMLERİ	72 saat inkübasyon	4 saat inkübasyon + 4 saat sonikasyon	4 saat inkübasyon + 3X vakum	4 saat sonikasyon + 1 gece inkübasyon

Emdirme yöntemlerindeki inkübasyon 37ºC'de gerçekleşmiş olup jelin vizkozitesinin azalan sıcaklıkla arttığı gözlenmiştir. Sonikasyon işlemi de 37ºC sıcaklığa ayarlanarak sonikatör (ElmaSonic, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir. Düşük vakum uygulanması ile jelin hapsolma eetkinliği vakumlu etüv cihazı (Memmert, Almanya) ile araştırılmıştır.

3.4.1. Hibrit Doku İskelelerinin Karakterizasyonları

Jelin, kuru doku içerisinde efektif olarak hapsolduğu grup ile nihai hibrit iskele için karakterizasyonlara devam edilmiştir. Tez çalışmasındaki hibrit menisküs iskeleleri parametreleri optimize edilen hidrojellerin emdirilmesi ile oluşturulmuştur. Doğal menisküs ve deselülerize dokudan karşılaştırma amaçlı 5 mm kalınlığında kesilmiş iskeleler ve hibrit menisküs iskelelerine kimyasal, termal, mekanik, morfolojik, sitotoksitite analizleri ve in vitro çalışmaları uygulanmıştır.

3.4.1.1. Morfolojik Analiz

In situ foto çapraz bağlanan iskeleler ile işlem görmemiş ve deselülerize iskeleler arasındaki morfolojik değişimler karşılaştırılmıştır. Hibrit iskelelerin işlem sonrasındaki ağırlık değişimleri de kontrol ve pozitif kontrol olarak sırasıyla doğal ve deselülerize menisküs iskeleleri baz alınarak saptanmıştır.

3.4.1.2. FTIR Analiz

Hidrojel yapılarının menisküs iskelesi içindeki formunun incelenmesi ve kimyasal yapısındaki değişikliklerinin saptanması Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) (Agilent, ABD) cihazı ile test edilmiştir. 4000- 600 cm^{-1} dalga boyu aralığında çalışmalar yapılmış ve elde edilen spektrumlar karşılaştırılmıştır.

3.4.1.3. Şişme Testi ve Sol Fraksiyon Analizi

Hibrit iskelelerin çapraz bağlanmasıyla su tutma kapasitelerindeki değişim şişme testi ile analiz edilmiştir. Hiç işlem görmemiş (kontrol), deselülerize iskeleleri ve hibrit gruplar (n=3) analiz öncesinde –80°C'de dondurularak kurutulmuştur. Başlangıç kuru ağırlıklarının hassas terazi ile tartımı (Wo) yapılmıştır. Ardından iskeleler 3 ml PBS (pH:7.4) solüsyonu içerisinde 37°C'de inkübasyonu yapılmıştır. 1., 6., 12. ve 24. saat sonlarındaki ıslak ağırlıkları tartılmıştır (Ws). Sol fraksiyon testi için 24 saat şişen iskeleler tekrar -80°C'de liyofilize edilmiştir. Son kuru ağırlıklarının tartımı yapılmıştır (W_1). Kütlece şişme oranı ve sol fraksiyonu sırasıyla Eşitlik 7 ve 8'de verilmiştir.

$$Şişme\ Oranı\ (\%) = \frac{Ws - Wo}{Wo}\ x\ 100 \qquad Eşitlik\ 7.$$

$$Sol\ Fraksiyonu\ (\%) = \frac{W_1}{Wo}\ x\ 100 \qquad Eşitlik\ 8.$$

3.4.1.4. Mekanik Analiz

Tez çalışmasında iddia edilen, hidrojeller ile kolajen bazlı menisküs iskelesinin birleşimi ile artacak mekanik dayanım bu analiz ile test edilmiştir. Doğal menisküs dokusu ve deselülerize menisküs iskeleleri kontrol olarak hibrit iskelelerin mekanik özelliklerini iyileştirebildiğinin kanıtı olarak basma testi uygulanmıştır. Burada, her bir gruptan n=3 olacak şekilde 5 mm çap ve 6 mm yüksekliğe sahip iskeleler 5 mm biopsi punch yardımıyla kesilmiştir. Analize ıslak doku iskelelerinin götürülmesi gerektiği için tampon çözelti içinde örnekler ıslatılmıştır. Basma testi için 2 kN yük hücresi kullanılarak 1 mm/dk sabit hız ile analiz kompresif mekanik analizör cihazı (Instron 5944, ABD) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonundaki yer değiştirmeye bağlı olarak verilen kuvvet ile gerilim-gerinim grafiği çizilmiştir. Grafiğin eğiminden elastisite modülü hesaplanmış ve % uzama, kompresif modülüs, elastisite modülüsleri tablo şeklinde verilmiştir.

Bulunan basma modulüslerinden aselüler hibrit yapıların çapraz bağlama yoğunluğu Flory teorisi kullanılarak Eşitlik 9'a göre hesaplanmıştır [120] .

$$n = \frac{E}{3RT} \qquad Eşitlik\ 9.$$

Burada n molar çapraz bağlamam yoğunluğunu (mol/m³), E hibrit yapıların kompresif modulüsünü (N/m²), R gaz sabitini (Nm/mol.K) ve T mutlak sıcaklığı (K) ifade etmektedir.

3.4.1.5. Termal Analiz

Hiç işlem görmemiş ve aselüler iskelelerin sıcaklığa bağlı olarak kütlesinde meydana gelen değişimler termogravimetrik analiz (TGA) ile ölçülmüştür. Örnekler 1 gece liyofilizatörde kurutulmuştur. 10-12 mg menisküs dokusunun orta bölgesinden alınmıştır. 25-600°C sıcaklık aralığında 10°C/dk ısıtma hızıyla, azot ortamında, Q600 SDT (TA Instruments, ABD) cihazi ile analiz gerçekleştirilmiştir.

Menisküs iskelelerindeki termal değişikliklerin incelenmesi için diferansiyel taramalı kalorimetrik analiz (DSC) yapılmıştır. Kontrol (doğal menisküs), deselülerize ve hibrit

iskeleler liyofilizatörde 1 gece kurutulmuş ve 10 mg kırmızı-beyaz bölgeden alınmıştır. Numuneler ardından 10°C/dk ısıtma hızıyla, hava ortamında, 10 - 600°C sıcaklık aralığında ısıtılmıştır. Termal özellikler DSC Q2000 (TA Instruments, New Castle, DE, ABD) cihazı ile ölçülmüştür.

3.4.1.6. SEM Analizi

Hibrit iskelelerin içindeki hidrojel sistemi ve kolajen fiberler arasındaki dağılımının mikroskobik görüntülenmesi SEM analizi GAIA3+Oxford XMax 150 EDS,Tescan (ABD) ile yapılmıştır. Deselülerize ve hibrit kuru iskelelerden cross-section (enine) ve çevrimsel kesitler alınarak altın-paladyum ile üzerleri kaplanmıştır. Kesitler üzerinde taramalı elektron mikroskobisi ile görüntüleme 250X-5000X arasında alınmıştır.

3.4.1.7. Degredasyon Testi

Greftlerin çapraz bağlanması ile hızlı enzimatik degredasyon engellenerek dokunun ileriki tedavilerdeki fizibilitesine katkı sağlanır. Çapraz bağlanmanın ve polimer karışımlarının menisküs iskelelesindeki degradasyon hızına etkisi PBS ve enzimatik solüsyonlar içindeki kütle kaybı ile incelenmiştir. Enzimatik degradasyon için, hiç işlem görmemiş doku, deselülerize ve hibrit iskeleler liyofilizatörde kurutulmuştur. Başlangıç kuru ağırlıkları (Wo) tartılan iskeleler 1U/mL kolajenaz A içeren 3 ml solüsyon içerisine alınmıştır. 37°C'de 30 rpm çalkalama hızıyla 24 saat boyunca enzimatik dgredasyon gerçekleştirilmiş ve belirlenen zaman aralıklarında alınan iskeleler PBS içerisinde yıkanarak liyofilize edilmiştir. Kurutulan örneklerin son kuru ağırlıkları tartılarak (W_1) Eşitlik 10 aracılığıyla yüzdece kütle kaybı hesaplanmıştır.

$$\%\ Kütle\ Kaybı\ = \frac{Wo - W_1}{Wo}\ x\ 100 \qquad Eşitlik\ 10.$$

PBS içerisinde degredasyon analizi için doğal doku, deselülerize doku ve hibrit yapılar aynı şekilde kurutulmuştur. Başlangıç kuru ağırlıkları (Wo) tartıldıktan sonra PBS (pH:7.4) içine alınan örnekler 28 gün boyunca 30 rpm çalkalama hızıyla 37°C'de degredasyona maruz bırakılmıştır. 1., 7., 14., 21. ve 28. gün sonlarında iskelerin son

kuru ağırlık (W_1) tayini için dondurularak kurutulmuştur. Eşitlik 10 ile degredasyon oranı hesaplanmıştır.

3.4.2. *In Vitro* Çalışmalar

Tez çalışmasında kullanılan hidrojeller ile çapraz bağlanan menisküs iskelelerinin hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerindeki etkisi Alamar Mavisi analizi ile incelenmiştir. Hücre kültür çalışmalarında L929 Fare Fibroblast hücre hattı kullanılmıştır.

3.4.2.1. Hücrelerin Kültürü ve Ekimi

Deselülerize ve sentezlenen hibrit iskeleler nihai sterilizasyonu için 2 saat %70 (h/h)'lik etanol içerisinde bekletilmiştir. Malzemeler daha sonra PBS ile muamele edilerek etanolün iskelelerden uzaklaştırılması sağlanmıştır. 2 saat UV ışık altında (254 nm) arkalı önlü olarak steril edilmiştir. Sterilizasyonu sağlanan iskeleler pens yardımıyla 24 kuyucuklu kültür kaplarına alınmıştır.

L929 fibroblast hücresi için öncelikle besi ortamı hazırlanmıştır. Bölüm 3.2.4.7'de belirtildiği gibi besiyeri hazırlanmıştır. Hücreler çoğalana kadar kültüre edilmiş ve 2 günde bir besi ortamı yenilenmiştir. Hücreler konfluens olduğunda tripsin-edta solüsyonu aracılığıyla yüzeyden kaldırılması için 5 dk inkübasyonu CO_2 inkübatörde yapılmıştır. Enzimin aktivitesini inhibe etmek için besi ortamı çözeltiye eklenerek santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılarak hücre pelletleri 1 mL besi ortamı ile karıştırılarak homojen çözelti elde edilmiştir.

Hücre sayımı hematosimetre ile yapılmıştır. Hücre süspansiyonundan 10 mikrolitre alınmış ve hematosimetreye konulmuştur. $2x10^4$ hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür kabındaki her bir steril iskelelerin (n=3) yüzeyine ekim yapılmıştır. Burada kontrol olarak aynı miktarda hücre boş kuyucuğa ekilmiştir. Hücrelerin yapışması için CO_2 inkübatöre kaldırılmış ve 3 saat beklenilmiştir. 3 saat sonunda 1 mL besi ortamı 24'lü kültür kaplarına eklenerek CO_2 etüve kaldırılmıştır.

3.4.2.2. Hücre Canlılık Analizi

Alamar mavisi analizinde aktif bileşenlerden resazurin hücre içine girerek resofurine indergenmektedir. Resofurinin florarasans ışımasıyla 570 nm dalga boyunda absorbans okunabilmektedir. 24 kuyucuklu kültür kaplarındaki RGD sekansı bulunan hibrit iskelelerin ve deselülerize iskelelerin 1., 4. ve 7. günlerde Alamar Mavisi analizi yapılmıştır. Analiz için, protokodeki gibi 1:10 Alamar Mavisi : Besi Ortamı karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda bekletilerek iskelelerin üzerine 1 mL eklenmiştir. 4 saat CO etüvde inkübe edildikten sonra kuyucuklardan 200 µL alınarak 96 kuyucuklu kültür kaplarına aktarılmıştır. 570/620 nm arasında n=5 okuma olacak şekilde mikroplaka okuyucuda absorbansları ölçülmüştür.

3.5. İstatistiksel Çalışmalar

Çalışma kapsamında bulunan sayısal değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlandırılması için Graphpad Prism 8 programından yararlanılmıştır. Anova tek yönlü analiz yöntemi ile tukey çoklu karşılaştırma ve sidak testleri ile anlamlılık dereceleri ölçülmüştür. Anlamlı farklılık seviyesi % 95 olarak alınmıştır. ($p<0.05$).

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması üç ayrı basamaktan oluşmuş olup, bu basamaklardaki parametreler incelenerek optimizasyona varılmıştır. Bu bölümde (1) menisküs deselülerizasyon metotlarının incelenmesine, (2) fotopolimerizasyon ile hidrojellerinin oluşturulması ve parametrelerinin optimizasyonuna, (3) nihai hibrit menisküs iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonlarına ait sonuçlara yer verilmiştir.

4.1. Deselülerize Menisküs Dokularının Hazırlanması

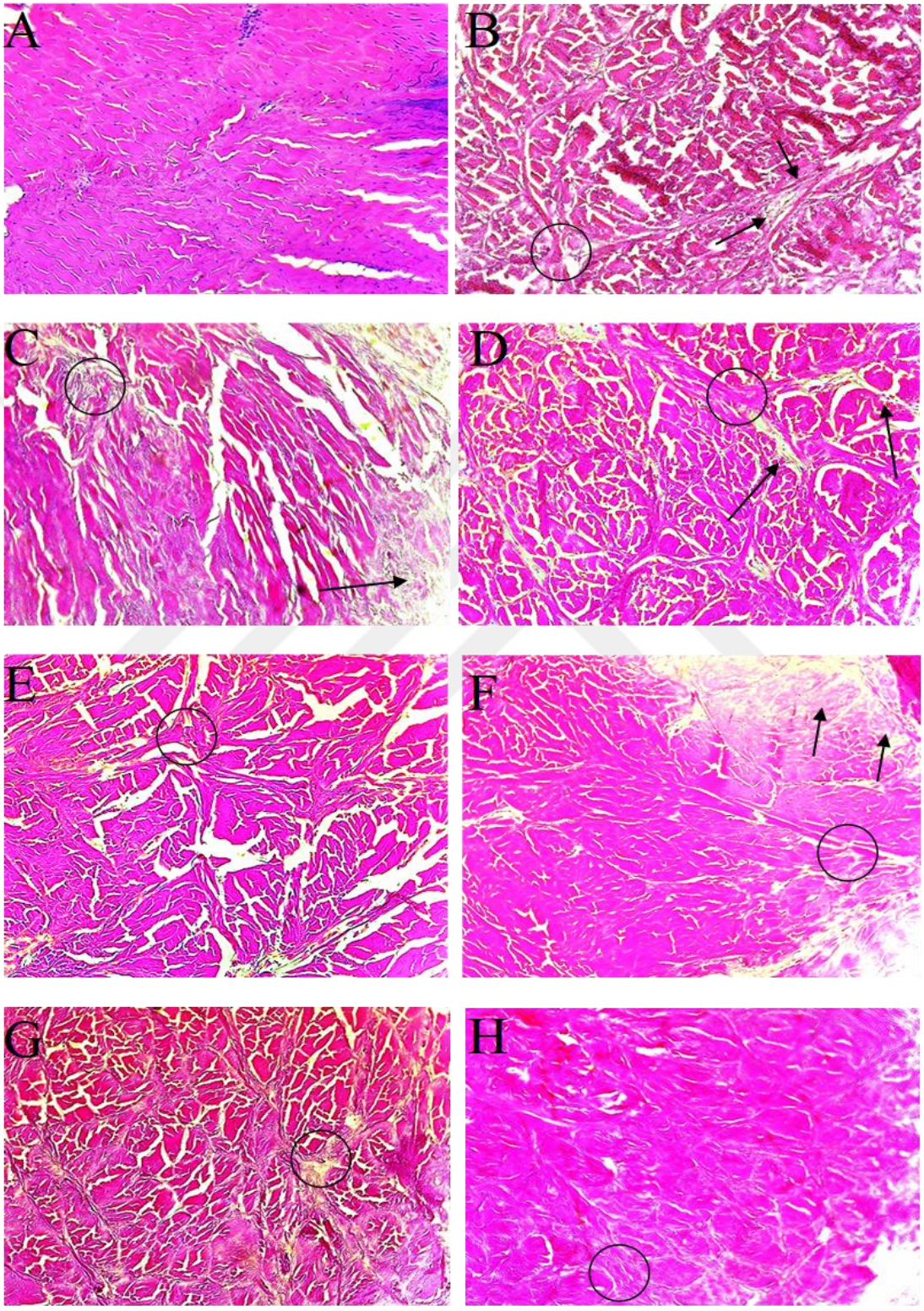
Biyomekanik özellikleri ve ultrayapısıyla anizotropik olan menisküs dokusunun rejenerasyonu için hücresizleştirilmiş iskeleler biyomimetik olması yönünden avantajlı olmaktadır. Menisküs deselülerizasyonu için başarılı bir protokolün oluşturulması adına yapılan çalışmalarda farklı metotlar ve ajanlar kullanılmıştır. Hem hücrelerin etkin bir biçimde uzaklaşması hem de dokunun ultrayapısının korunarak minumum derecede hücre dışı bileşenlerini etkilemesinde çeşitli parametreler denenmiştir. Konvansiyonel ve süper kritik akışkan teknolojisi kullanılarak yapılan deselülerizasyonda başarılı olan gruplar histoloji çalışmaları ve biyokimyasal analizler ile incelenmiştir.

4.1.1. Konvansiyonel Yöntemlerle Deselülerize Edilen Grupların Karakterizasyonları

4.1.1.1. Histolojik Çalışmalar

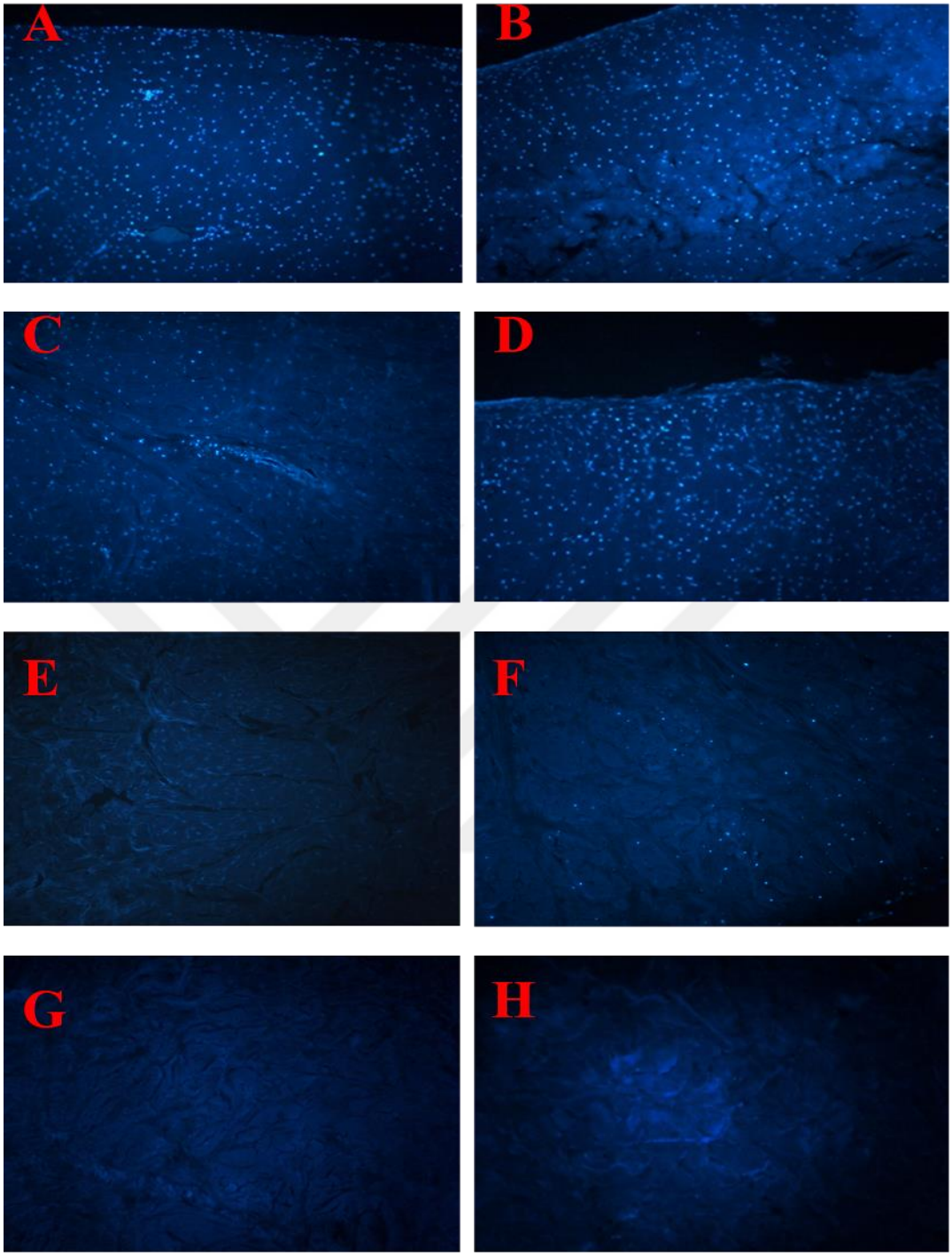
Deselülerizasyon proseslerinin başarı ölçütü dokudan genomik DNA ve hücre artıklarının etkili bir biçimde uzaklaştırılmasıdır. H&E ve DAPI boyamaları hücre çekirdeklerinin uzaklaştırılmasının kanıtında kalitatif olarak kullanılan çalışmalardandır. İlk olarak konvansiyonel deselülerizasyon olarak da bilinen fiziksel, kimyasal ve enzimatik ajitasyonların kombinasyonuyla oluşturulmuş metot için işlem görmemiş (doğal doku) doku ve Tablo 2.1'de verilen gruplar üzerinde H&E ve DAPI boyamaları yapılmıştır. Şekil 4.1. de verilen (A) kontrol dokuyu temsil ederken; (B) G-1. grubu (ön işlemli+%2 SDS (a/h)), (C) G-2. grubu (sadece %2 SDS (a/h), 1 gün), (D) G-3. Grubu (ön işlemli + %0,5 SDS (a/h)), (E) G-4. Grubu (%2 SDS (a/h), 2 gün), (F) G-5. Grubu (ön işlemli + %0,5 SDS (a/h), sıcaklık değişimli), (G) G-6. Grubu (ön işlemli + %0,5 SDS (a/h) sıcaklık değişimli, %0,05 (a/h) tripsin/edta), (H) G-7. Grubu (ön işlemli +

%0,5 SDS (a/h) sıcaklık değişimli, %0,05 (a/h) tripsin/edta, ekstra PBS yıkamalı) temsil etmektedir.



Şekil 4. 1. İşlem görmemiş menisküs dokusu (kontrol) ve deselülerizasyon gruplarının H&E boyamaları. (A)-kontrol, (B)-G-1, (C)-G-2, (D)-G-3, (E)- G-4, (F)-G-5, (G)-G-6, (H)-G-7 (10X).

Şekilde siyah oklar ile gösterilen kısımlarda (B, C, D, F) hücre çekirdeklerinin tam olarak uzaklaştırılamadığı ama kontrol grubuna göre bu gruplarda hücrelerin azaldığı görülmüştür. Literatürdeki verilere bakıldığında menisküs hücrelerinin genelde kolajen fibrillerin arasında kümelendiği bilinmektedir. [121]. Burada, deselülerizasyon prosesi sonunda kolajen fibrillerinin gevşemesiyle bu yapılara bağlı olan GAG'ların azalması ile hücrelerin açığa çıktığı ve daha kolay uzaklaştırılabildiği hipotezi doğrulanmıştır. Hücrelerin E, G ve H figürlerinde gözükmediği ve bu yapıların deselülerize olduğu gözlenmiştir. H&E boyaması ile hücre çekirdeklerinin durumu gözlenirken ECM bütünlüğüne de bakılmıştır. Yuvarlık içinde işaretlenen radyal bağ fiberlerin tüm gruplarda da gözükmesi matris histoyapısının deselülerizasyon ajanlarına rağmen sürdürüldüğünü kanıtlamıştır. Şekil 4.2' de kontrol grubu olarak işlem görmemiş menisküs dokusu (A) ve deselülerize grupların (B) G-1, (C) G-2, (D) G-3, (E) G-4, (F) G-5, (G) G-6, (H) G-7 DAPI boyamaları verilmiştir. H&E boyamasındaki sonuçlar DAPI boyamasında da tasdik edilmiştir.



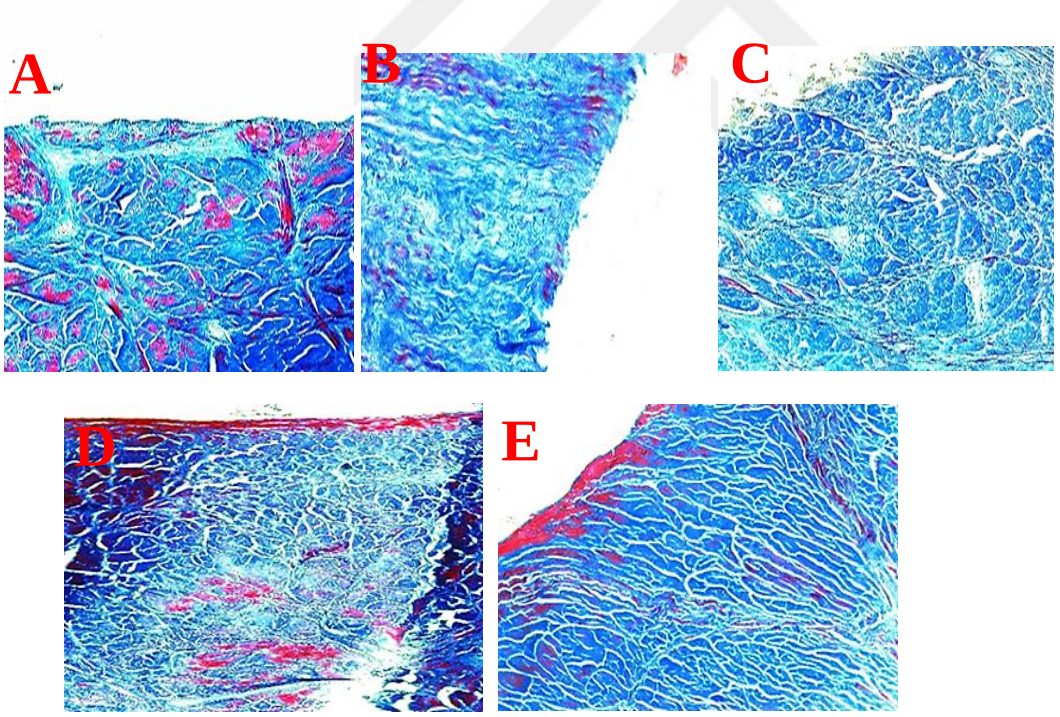
Şekil 4. 2. İşlem görmemiş (kontrol) ve deselülerize grupların DAPI boyamaları. (A)-kontrol, (B)-G-1, (C)-G-2, (D)-G-3, (E)-G-4, (F)-G-5, (G)-G-6, (H)-G-7. (10X)

H&E boyamasındaki Şekil 4.1' de verilen B, D ve F figürlerindeki çekirdeklerin DAPI boyamalarında da bulunduğu gözlemlenmiştir. Buradaki şekillerde (A) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında E, G ve H görüntülerinde hücreye rastlanmadığı ve deselülerize

olduğu H&E ve DAPI boyamalarında örtüşmüştür. Bölüm 3.2.2'de verilen ön işlemin deselülerizasyon üzerindeki etkisinin incelenmesinde H&E ve DAPI boyamalarından faydalanılmıştır. Şekil 4.1 ve 4.2'deki B (G-1) ve C (G-2) figürlerinde ön işlemin menisküs deselülerizasyonu için yetersiz kaldığı görülmüştür. Dondurma ve çözmenin buz kristalleri yaratmasıyla ECM yapısında küçük boşluklar oluşturduğu her iki şekilde (B) figüründe görülebilmektedir. Ön işlemsiz %2 SDS (a/h) oranın (C-şıkkı) muamele süresi 24 saat olsa bile dokudaki ECM bütünlüğünün kaybına yol açtığı da söylenebilmektedir. SDS oranlarının deselülerizasyon üzerindeki etkisinin incelenmesi için B (G-1) ve D (G-3) figürlerinden yararlanılmış ve deterjan konsantrasyonunun azaltılması hücresizleştirme de tek başına efektif olmadığı sonucuna varılmıştır. Fakat SDS miktarının %2'den (a/h) %0,5'e (a/h) düşürülmesiyle ECM bütünlüğünün daha iyi korunabildiği sırasıyla (B) ve (D) figürlerinden anlaşılabilmektedir. Her iki şekilde de (C) ve (E) figürlerinde SDS'e maruz kalma süresinin sırasıyla 24 saatten 72 saate çıkarılmasının deselülerizasyon üzerindeki etkisi incelenmiştir. SDS maruz kalma süresinin uzatılmasıyla dokunun deselülerize olduğu görülmüştür ve bu sonuçlar literatürdeki veriler ile örtüşmüştür [90]. Fakat her iki görüntüde de ECM yapı bütünlüğünün bozulduğu bunun da iyonik bir deterjan olan SDS'in ECM yapısına zarar verdiği gözlenmiştir. Şekilde 4.2 ve 4.3'teki (C) ve (F) şıklarında artan sıcaklık değişiminin deselülerizasyon üzerinde olumlu bir etki gösterdiği H&E ve DAPI boyamalarından anlaşılmıştır. Burada sıcaklık artışının lipit yapıdaki hücre membranlarını çözen SDS'in daha efektif bir şekilde çalışabildiğini göstermiştir. Ayrıca 45 ºC'nin kolajen yapılarında herhangi bir olumsuz etki sağlamağı şekildeki görüntülerden anlaşılmaktadır. Hücre çekirdeklerinin bu grupta azalmış olmasına rağmen menisküs deselülerizasyonu için bu protokol tek başına yetersiz bulunmuştur. Tripsin/EDTA ajanı penetrasyon artırıcı olarak ve enzimatik deselülerizasyonu da sağlamak için G-6 ve G-7. Gruba eklenmiştir. (F) ve (G) figürlerinden tripsin/edta eklenmesinin deselülerizasyon üzerindeki karşılaştırılması sağlanmıştır. Hücre uzaklaştırılmışının tamamıyla sağlandığı ve ECM yapılarına zarar vermediği (F) ve (G) figürlerinden anlaşılmaktadır. (G) ve (H) figürlerinde ise menisküs deselülerizasyonunu sağladığı görülmüştür. Penetrasyonun artırılması ile SDS konsantrasyonunda azalış ve 24 saat maruz kalma süresi hem dokudaki ECM yapısının korunmasıyla hem de hücre çekirdeklerinin etkili bir şekilde uzaklaştırılmasıyla menisküs deselülerizasyonu için optimal bir protokolü oluşturmuştur. Hücre artıklarının ve kimyasal ajanların etkili bir şekilde uzatılabilmesi için G-7 Grubunda (H) ekstra PBS yıkaması denenmiş ve G-

6.gruba (G) göre herhangi bir yan etki sağlamadığı ve kalıntıların daha iyi uzaklaşabildiği görülebilmektedir. H&E ve DAPI boyamalarına bakıldığında menisküs dokusunda hücrelerin G-1 ve G-3 gruplarında tam olarak uzaklaşmadığı görülmüş olup bu gruplar deselülerizasyon için yetersiz bulunmuştur. G-4. Gruptaki protokolün deselülerizasyonu sağlamasına rağmen ECM bütünlüğünün korunmaması dolayısıyla seçilmemiştir. Menisküs deselülerizasyonu için optimal gruplar olarak G-2, G-5, G-6 ve G-7 protokolleri belirlenmiş ve diğer histolojik çalışmalar bu gruplara yapılmıştır.

Masson's Trichrome kiti ile yapılan kollajen boyamasında deselülerizasyon sonucu dokudaki kolajen fibrillerin varlığı tespit edilmiştir. Şekil 4.3'te İşlem görmemiş ve deselülerize menisküs dokularının kolajen boyamaları verilmiştir. Burada (A) kontrol grup olarak kullanılmış ve G - 2, 5, 6, 7 grupları sırasıyla (B), (C), (D) ve (E) figürleri kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır.

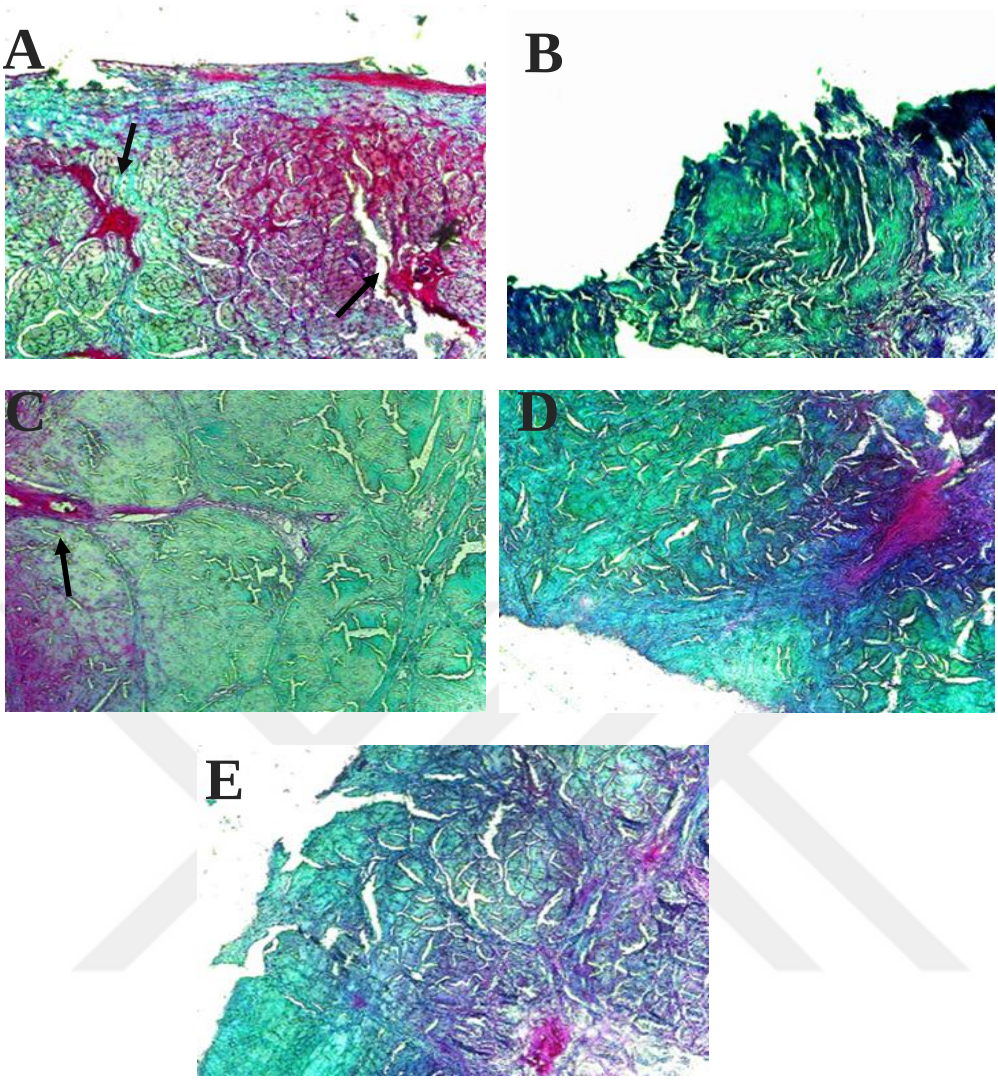


Şekil 4. 3. Kontrol ve Deselülerize Menisküs Dokularının Masson Trichrome boyaması. (A)-kontrol, (B)- G-2.Grup, (C)-G-5.Grup, (D)-G-6.Grup, (E)-G-7.grubun (10X).

Kolajen demetlerinin maviye boyandığı bu boyama ile kolajenlerin varlığı tespit edilmiştir. (A) figürü ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda deselülerizasyon sonrasında

kolajenler arasında ufak bir gevşeme gözükmüştür. Histo-yapıya etki etmeyen bu gevşemenin kolajen fiberlerin hizalanmasına ve azalışına da etki etmemiştir. Ayrıca menisküs deselülerizasyon protokollerinde kullanılan sıcaklık artışı ve tripsin enzimin kolajen fiberlere zarar vermediği (C), (D) ve (E) figürlerinden anlaşılmaktadır. Heterojenik bir kolajen hizalanmasına sahip olan menisküs dokusunda deselülerizasyon sonucunda ECM-kolajen yapısının değişmediği bu histolojik çalışma ile gösterilmiştir.

Proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar (GAG) olarak adlandırılan merkezi bir proteinden oluşmaktadır. Safranin-O Boyası proteoglikanları pembe/kırmızı renge boyarken, Fast Green sitoplazmayı yeşil rengine boyamaktadır. Şekil 4.4'te doğal dokudaki (A) proteoglikanların doku içerisinde yayıldığı gözlenmiştir. Şekildeki siyah ok ile belirtilen kısımda proteoglikan kümelenmesi farklı yönlerde hizalanmış kolajen fiberlerin kesiştiği bölge olmakta ve buradaki hücre kümelenmesini de açıklamaktadır

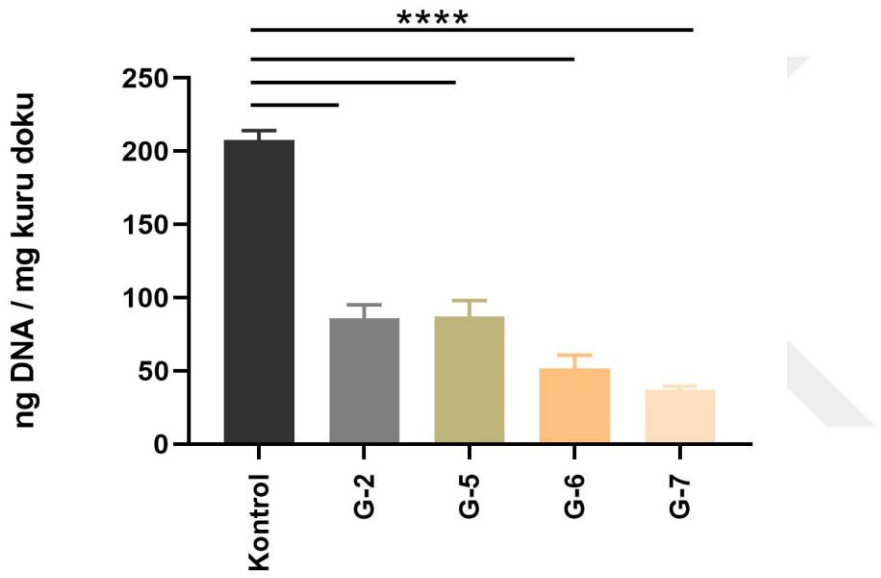


Şekil 4. 4. İşlem görmemiş doku (kontrol) ve optimal deselülerizasyon gruplarının Safranin-O/FCF boyaması. (A) Kontrol, (B) G-2, (C) G-5, (D) G-6, (E) G-7 (10X).

Deselülerizasyon gruplarına bakıldığında dokuda proteoglikanların azalmasının olduğu söylenebilmektedir. Fakat bazı protokollerde bu yapılarını korunabildiği (C) şıkkında gözükmektedir. Siyah ok ile damarlanmanın etrafındaki proteoglikan kümelenmesi görülmektedir. B, D, E şıklarında doğal dokuya göre azalma yaşandığı ama genel olarak bakıldığında doku içerisinde hücresizleştirme sonucu proteoglikanların olduğu sonucuna varılmıştır.

4.1.1.2. Biyokimyasal Analizler

Hücresizleştirme protokollerinin verimine histolojik çalışmalar dışında biyokimyasal analizler ile de incelenmiştir. Öncelikle genomik DNA'nın kantitatif tayini ile 50 ng altında kalınıp kalınmadığına bakılmıştır. PicoGreen kiti ile yapılan analizde hücresizleştirme sonucunda kalan artık DNA miktarı menisküs dokularının kuru ağırlıkları üzerinden hesaplanmıştır. Şekil 4.5'te genomik DNA miktarları histogram grafiği şeklinde verilmiştir. Kontrol grubu olarak doğal menisküs dokusu baz alınmıştır. Tek yönlü Anova analizi kontrol ve deselülerize gruplarda arasında yapıldığında anlamlı derecede fark bulunmuştur.



Şekil 4. 5. İşlem görmemiş menisküs dokusu ve konvansiyonel deselülerize grupların DNA miktarını gösteren histogram grafiği. **** P <0.0001.

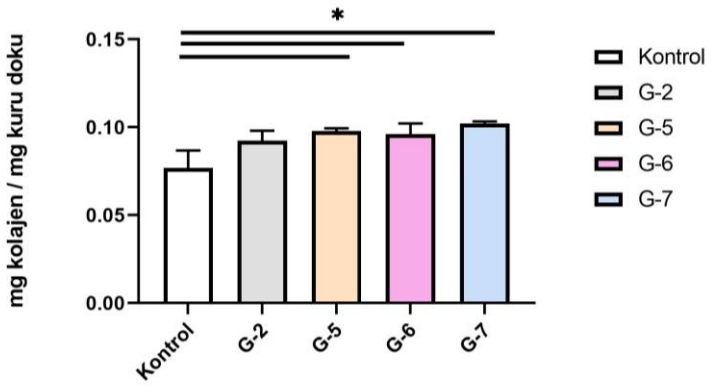
Çizelge 4.1'de verilen sonuçlara bakıldığında G-6 ve G-7 gruplarının menisküs deselülerizasyonunu sağladığı ve artık DNA miktarının istenilen seviyede olduğu gözükmektedir. H&E ve DAPI boyamalarında da bu gruplar için histoloji boyamaları tutarlılık göstermiştir. Histoloji görüntülerinde G-2. ve G-5. Grupları için hücre çekirdeklerinin tam uzaklaşmadığı buradaki kantitatif analizde de doğrulanmıştır. % 2 SDS ile yapılan 24 saatlik ajitasyonun (G-2) hücrelerin uzaklaştırılmasında yetersiz kaldığı görülmüştür. Ön işlem yapılarak SDS konsantrasyonunun % 0,5'e indirildiği ve artan sıcaklıklarda uygulanan deselülerizasyonda (G-5) ise efektif bir deselülerizasyonun sağlanamadığı ve tek başına yetersiz kaldığı saptanmıştır. Stabile ve

arkadaşları Tripsin/EDTA ve ardından Triton X-100 ajanları ile yaptıkları menisküs deselülerizasyonunda % 55 DNA azalmasını raporlamıştır [91]. Sunulan tez çalışmasındaki G-6. ve G-7. Gruplar da fiziksel ön işlem ardından Tripsin/EDTA ve SDS ajanları artan sıcaklıklarda uygulanarak genomik DNA azalması %70 üzerinde olmuştur. Buradan menisküs gibi kompakt bir dokuda penetrasyon artırıcı ajanların ve ön işlemlerin kullanımı ile hücresizleştirmenin etkili bir şekilde yapılabildiği sonucuna varılmıştır. Kontrol grubuna göre en fazla DNA azalması G-7 grubunda saptanmıştır. PBS yıkamasının uzun tutulması sayesinde artık DNA'nın daha fazla uzaklaştığı kanıtlanmıştır. Konvansiyonel menisküs deselülerizasyonunda kullanılan protokollerden G-7. Grup 50 ng altındaki genomik DNA miktarı ve tamamıyla hücresiz histolojik çalışmaları ile optimum grup olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4. 1. İşlem görmemiş (kontrol) ve deselülerize gruplarında kalan artık DNA miktarı ve yüzde azalışı.

	Kuru dokudaki genomik DNA miktarı (ng)	**Yüzde Azalma Miktarı (%)**
Kontrol	207,52 ± 6,64	-
G-2	86,01 ± 9,02	59
G-5	87,15 ± 10,78	58
G-6	51,85 ± 8,82	75
G-7	36,99 ± 2,04	82

Kuru menisküs iskelesinin %72'sini kolajen yapıları oluşturmaktadır. Dokudaki kolajen miktar tayini için hidroksiprolin miktarı baz alınarak hesaplanmış ve 100 mg kolajenin %12,5'u hidroksiprolini ifade ettiği verisinden yararlanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Konvansiyonel deselülerize gruplarının kolajen miktar tayini sonuçları histogram grafikleri şeklinde Şekil 4.6'da sunulmuştur.

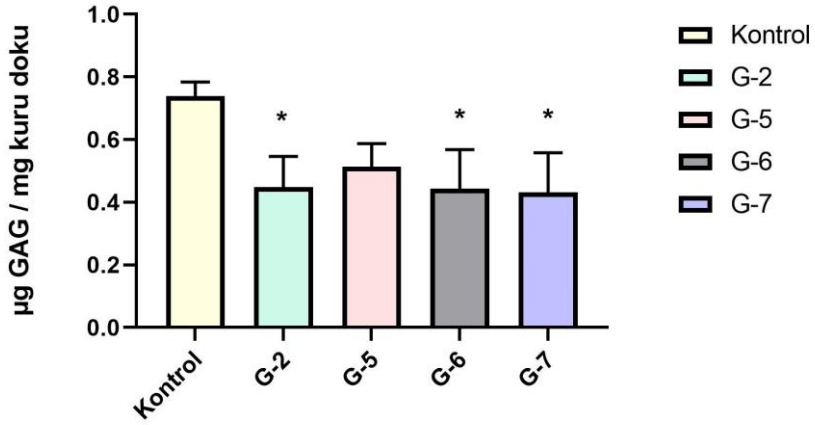


Şekil 4. 6. Konvansiyonel deselülerize gruplarının kolajen miktar tayinini gösteren histogram grafiği (*p<0,05).

Burada işlem görmemiş menisküs dokusu (kontrol) 0,071 ± 0,01 mg kolajen içerirken; konvansiyonel gruplar da sırasıyla 2. grup 0,092 ± 0,005 mg, 5. grup 0,097 ± 0,001 mg, 6. grup 0,098 ± 0,007 mg ve 7. grup 0,102 ± 0,001 mg kolajen içeriği tayin edilmiştir. Tek yönlü Anova Analizi yapıldığında deselülerize gruplar ile doğal doku arasında anlamlı bir artış bulunmuştur. Burada deselülerize grupların işlem görmemiş dokudan (kontrol) daha yüksek miktarda kolajen içeriği literatürdeki menisküs deselülerizasyonlarında da gözükmüştür [95]. Deselülerizasyon sırasında dokuda kolajen matrisinin kalması ve diğer hücresel proteinlerin kaybı dolayısıyla kolajen miktarı hücresizleştirmeden sonra kuru ağırlığın bir yüzdesi olarak artma eğiliminde olmuştur. Deselülerizasyon sonucunda dokunun kolajen içeriğinde kayıp olmaması histoloji çalışmalarıyla da örtüşmektedir. Özellikle Masson Trichrome boyamasındaki kolajenlerin deselülerize gruplarda başarılı bir şekilde boyanması bu durumun kalitatif sonucunu göstermektedir.

Dokunun içerisindeki glikozaminoglikanların tayini için DMMB Analizinin sonuçları Şekil 4.7’ de histogram grafiği şeklinde verilmiştir. İşlem görmemiş doğal dokuda (kontrol) 0,742 ± 0,047 µg GAG, G-2’de 0,448 ± 0,098 µg GAG, G-5 grubunda 0,513 ± 0,074 µg GAG, G-6 grubunda 0,443 ± 0,125 µg GAG ve G-7 grubunda 0,432 ± 0,127 µg GAG içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Tek yönlü Anova analizi grupların karşılaştırılması için yapıldığında G-5 grubu ile doğal doku (kontrol) arasında anlamlı

bir fark görülmemiştir. Sunulan veriler Safranin-O/Fast Green boyaması ile de tutarlılık göstermiştir.



Şekil 4. 7. Konvansiyonel deselülerize gruplarının GAG içeriğini gösteren histogram grafiği.

Literatürdeki deselülerizasyon verilerinden bakıldığında SDS muamelesi nedeniyle gruplarda GAG azalması beklenmiştir [122]. G-2 grubundaki protokolde %2 SDS (a/h) oranının %40 GAG azalmasına neden olduğu analiz edilmiştir. G-5 grubunda ise SDS oranın % 0,5 (a/h) konsantrasyonuna düşürülmesi ile % 31 GAG azalışı göstermiş ve bu da SDS konsantrasyonunun artıkça proteglikanlara zarar verdiğini ortaya koymuştur. G-6 ve G-7 gruplarında sırasıyla %41 ve %42 azalma olduğu tespit edilmiş ve buradaki tripsin enziminin GAG azalmasında rol oynadığı ancak SDS oranının % 0,5'e (a/h) düşürülmesi ile glikozaminoglikanların miktarlarındaki azalış minumum derecede tutulmaya çalışılmıştır.

Fiziksel, kimyasal ve enzimatik muamelelerin kombinasyonu ile yapılan protokollerden DNA miktarının istenilen seviyede olması ve ECM ultra-yapısının korunması gibi parametreler göz önünde bulundurulduğunda 7. Grup optimum grup olarak seçilmiştir.

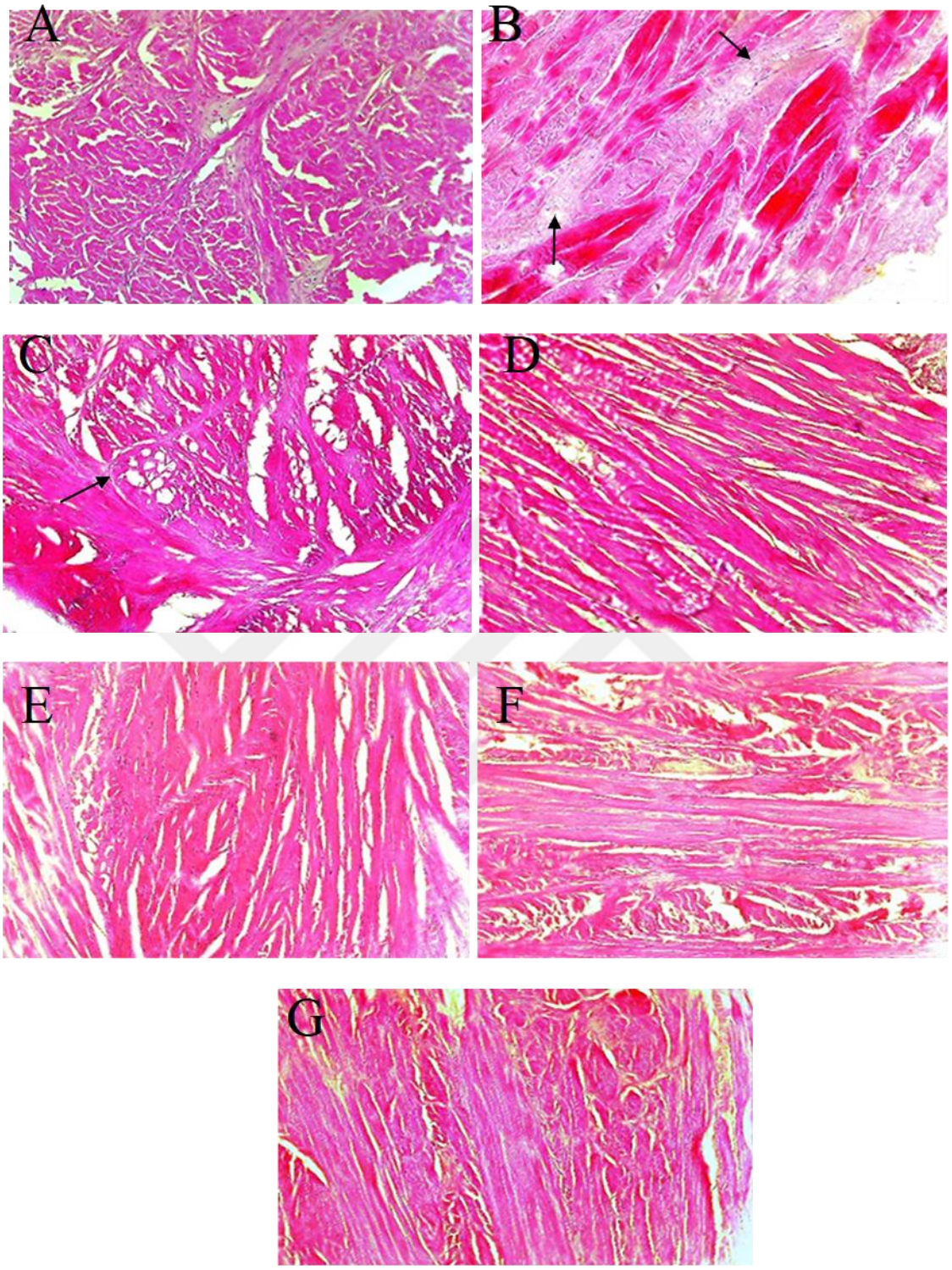
Tez çalışması kapsamında, menisküs dokusunun konvansiyonel deselülerizasyonu sonrasındaki DNA ve GAG miktarının azalması dokuda boşluklu yapıların oluşmasında etkin rol oynamıştır. Bu boşluklar da hibrit menisküs iskelesinin üretilmesi adımında jel emdirme işleminin kompakt yapı içerisine daha kolay yapılmasını kolaylaştıracağı düşünülmüştür.

4.1.2. Süperkritik Akışkan Teknolojisi ile Deselülerize Edilen Grupların Karakterizasyonları

$scCO_2$ ile muammele görmüş menisküs dokularındaki gruplar üzerinde deselülerizasyon protokollerinin başarısı için karaterizasyonlar yapılmıştır. ECM yapısının ve hücre çekirdeklerinin görüntülenmesi için histolojik çalışmalar; dokudaki artık DNA miktarının kantitatif analizi olarak Picogreen Analizi uygulanmıştır. DMMB testi ve Hidroksiprolin Analizi GAG ve kolajen içeriğinin tayini için gerçekleştirilmiştir.

4.1.2.1. Histolojik Çalışmalar

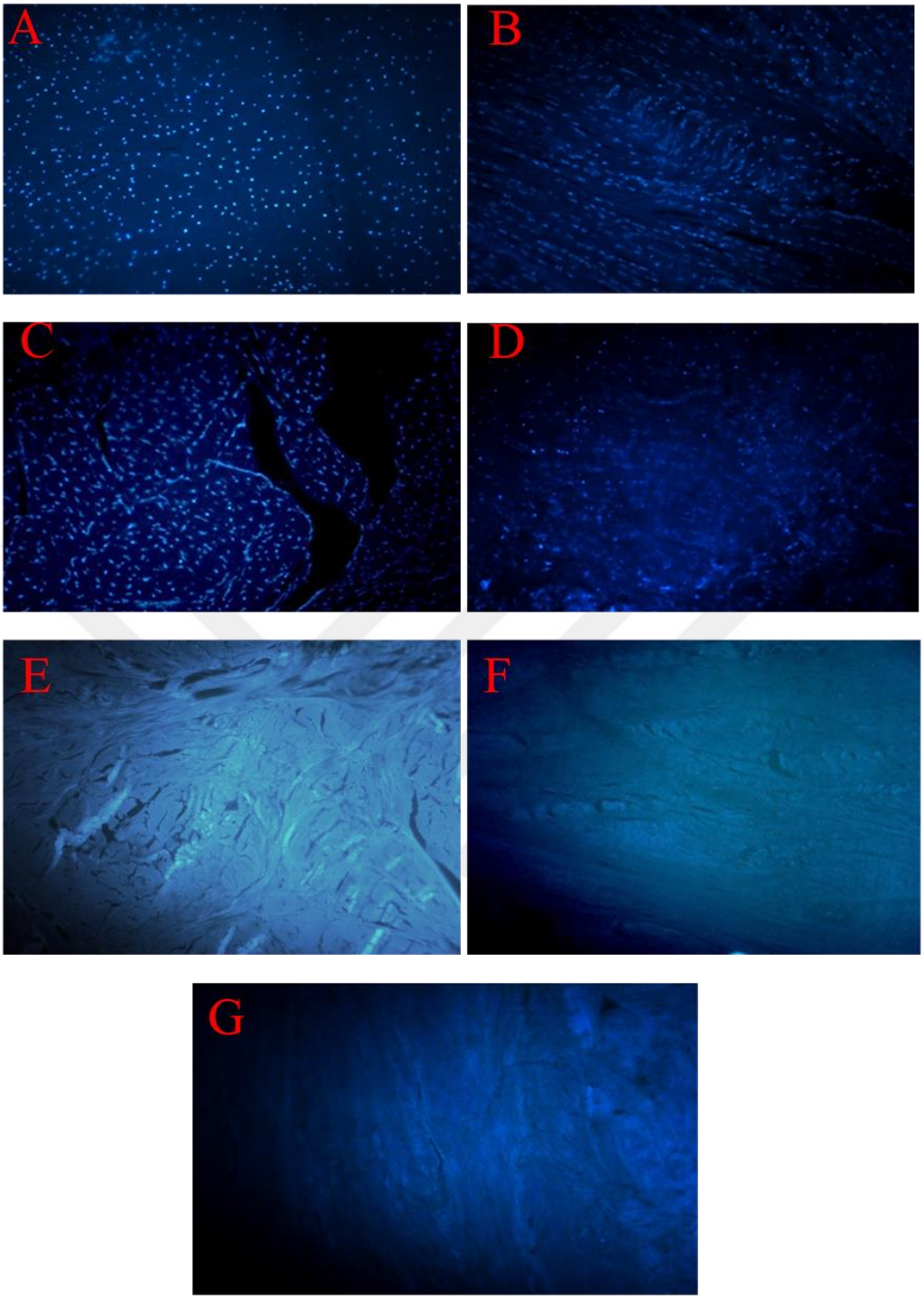
Çizelge 2.2'de verilen 6 adet deselülerizasyon protokollerinin hücresizleştirilme etkinliğinin belirlenmesinde H&E ve DAPI boyamalarından yararlanılmıştır. Şekil 4.8'de (A)-işlem görmemiş menisküs dokusunu (kontrol), (B)- SK-1 grubunun (4500 psi-1 saat), (C)- SK-2 grubunun (4500 psi- 3 saat), (D)- SK-3 grubunun (4500 psi, 1 saat, ekstra PBS yıkaması), (E)- SK-4 grubunun (4500 psi, 1 saat, NaOH ön işlemli), (F)-SK-5 grubunun (4500 psi, 1 saat, liyafilizatör ön işlemli), (G)-SK-6 grubununun (4500 psi, 1 saat, tripsin ön işlemli) H&E boyamalarını temsil etmektedir.



Şekil 4. 8. İşlem görmemiş (kontrol) ve $scCO_2$ deselülerize menisküs dokularının H&E boyamaları. (A)- kontrol, (B)- SK-1, (C)- SK-2, (D)- SK-3, (E)- SK-4, (F)- SK-5, (G)- SK-6 (10X).

Şekil 4.8'de bulunan (B) ve (C) şıklarındaki siyah ok ile işaretlenen kısımlarda hücreler tespit edilmiştir. Fiziksel ön işlemin ardından 4500 psi basıncın uygulandığı bu protokollerde $scCO_2$ teknolojisi ile hücresizleştirme menisküs dokusu için tam olarak etkili olmamıştır. (B) figüründeki 1 saat muamele (C) figüründe 3 saate çıkartılmış fakat hücreler ve artıkları yığın yapı sergileyen menisküs dokusunun içerisinde hapsolmuştur. Buradan uygulanan basınç süresinin artıkça hücrelerin daha da derinlere ulaşması yorumuna ulaşılmıştır. (D) şıkkındaki hücre çekirdeklerinde olan azalma PBS yıkamasının uzun tutulması ile yaşanmıştır. (E), (F) ve (G) şıklarından ise hücre çekirdeklerinin ekstra ön işlemin etkisi ile uzaklaştığı anlaşılmaktadır.

Şekil 4.9'da doğal doku ve $scCO_2$ deselülerize grupların DAPI boyalamalarına yer verilmiştir. H&E boyamasındaki sonuçlar DAPI boyaması ile uyuşmuştur.

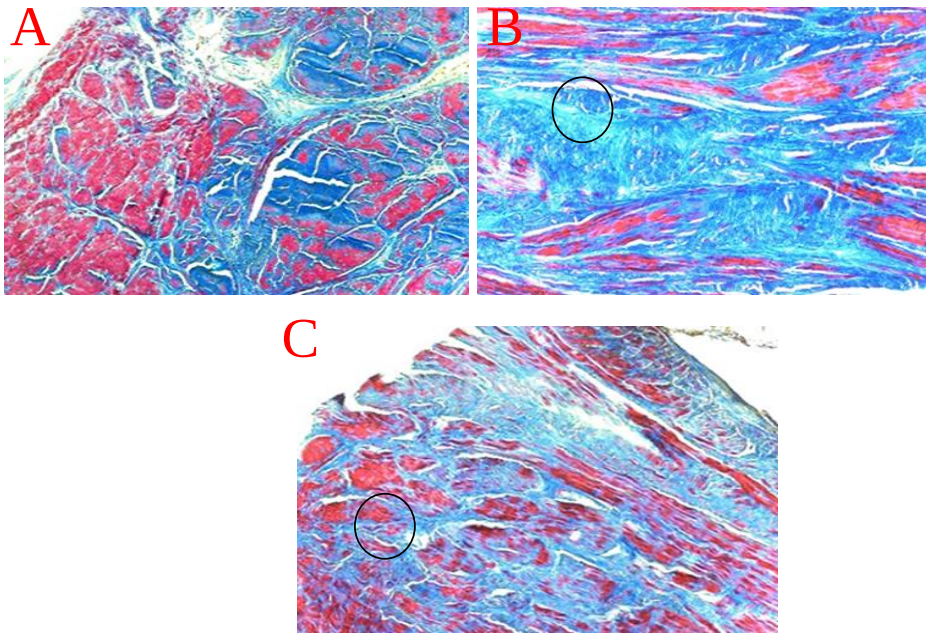


Şekil 4. 9. İşlem görmemiş (kontrol) ve $scCO_2$ deselülerize menisküs dokularının DAPI boyamaları. (A)- kontrol, (B)- SK-1, (C)- SK-2, (D)- SK-3, (E)- SK-4, (F)- SK-5, (G)- SK-6 (10X).

Her iki şekilde de (E), (F) ve (G) figürlerinde etkili bir hücre uzaklaştırılması gözükmektedir. SK-4. Grubun ön işleminde NaOH ile inkübasyon doku bütünlüğüne

zarar vermiştir. Burada NaOH inkübasyonu çözücü geçirgenliğini artırarak süperkritik akışkanın dokunun içine daha iyi penetre olmasını sağlamıştır. Fakat literatürde de verildiği gibi kolajen fibrillerin yıkımıyla ECM yapısını bozmaktadır [123]. Bu sebeple bu protokol ile diğer çalışmalarda devam edilmemiştir. SK-5. ve SK-6. grubun ön işlemleri ve ardından 4500 psi etkili bir menisküs deselülerizasyonunu sağladığı (F) ve (G) şıklarından görülebilmektedir. Menisküs dokusunda ilk defa denenen $scCO_2$ teknolojisi ile hücresizleştirme prosesinin uygulanmasında fiziksel ve enzimatik ön işlemlere ihtiyaç duyulduğu bu çalışma ile kanıtlanmaktadır. % 70 (h/h) etanolün ko-solvent olarak kullanıldığı $scCO_2$ teknolojisinde dokunun dondurularak kurutulması ve sürecin kuru doku üzerinden ilerlenmesi hücresizleştirme başarısını artırmıştır. Yine ekstra bir ön işlem olarak tripsin enzimi ile muamele (SK-6 grubu) sıkı paketlenmiş kolajen fiberlerin gevşemesine ve süperkritik CO_2'in hücre uzaklaştırılmasındaki efektifliğini sağlamıştır. $ScCO_2$ teknolojisi kullanılarak yapılan deselülerizasyonda H&E ve DAPI boyamaları sonucunda SK-5 ve SK-6 gruplarının protokolleri etkili olduğundan dolayı diğer analizlerde bu gruplar üzerinden gidilmiştir.

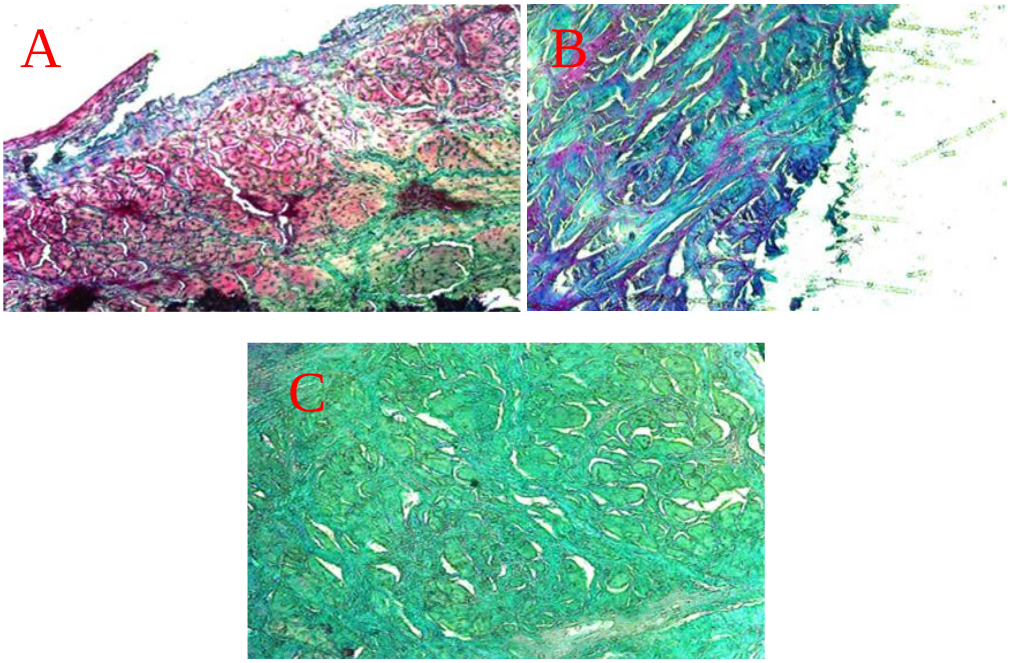
Deselülerizasyon sonucu kolajen demetlerinin görüntülenmesinde Masson Trichrome boyamasından yararlanılmıştır (Şekil 4.10.)



Şekil 4. 10. İşlem görmemiş doku (kontrol) ve $scCO_2$ deselülerize gruplarının Masson Trichrome boyamaları. (A)- kontrol, (B)- SK-5 , (C)- SK-6 (10X).

Süperkritik akışkan teknolojisi ile yapılan hücresizleştirme işleminde doğal dokuya göre kolajen hizalanmasının değişmediği görülmüştür. Konvasiyonel yöntemlerle yapılan deselelülerizasyona benzer şeklide bu proseste de ECM proteinleri ve hücre azalmasına bağlı olarak kolajen demetlerinin daha fazla açığa çıktığı görülmektedir. Kontrol grubundaki (A) radyal fiberlerin korunduğu (B) ve (C) figürlerindeki yuvarlak işaretli bölgelerden anlaşılabilmektedir. $ScCO_2$ ile yapılan hücresizleştirme sonrasında ECM bütünlüğünün korunmasında yardımcı kolajen yapılarının sürdürülebildiği ve dokuya zarar vermediği literatürdeki veriler ile de uyuşmuştur [124].

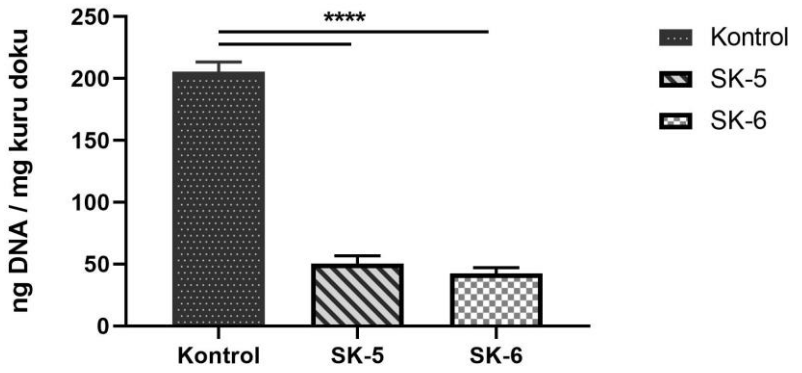
Safranin-O/Fast Green boyaması ile proteoglikanların kontrol ve deselülerize gruplar arasındaki azalışına bakılmıştır. Şekil 4.11' de işlem görmemiş doku (A), SK-5 ve SK-6 grupları ise sırasıyla (B) ve (C) figürlerinde verilmiştir. Kontrol (A) grubuna göre deselülerizasyon sonunda dokuda proteoglikanların azaldığı gözlemlenmiştir. SK-6 grubunda (C) en çok azalmanın gerçekleştiği ve tripsin/EDTA ön işlemiyle $scCO_2$ akışkan teknolojisinin birleştiğinde dokudaki proteoglikanların daha fazla götürüldüğü sonucuna varılmıştır. Bu kapsamda, menisküs dokusunun ECM'indeki kolajen fibrillerin arasına sıkışmış proteoglikanlar süperkritik akışkan teknolojisindeki yüksek basınçtan dolayı konvansiyonel deselülerizasyon gruplarına göre daha çok etkilenmiş oldukları çıkarımı yapılmıştır.



Şekil 4. 11. İşlem görmemiş doku (kontrol) ve $scCO_2$ deselülerize gruplarının Safranin-O/FCF boyamaları. (A)- kontrol, (B)- SK-5 , (C)- SK-6 (10X).

4.1.2.2. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizlere histoloji çalışmalarında başarılı gruplardan SK-5 ve SK-6 ile devam edilmiştir. Kalitatif analizlerde hücre çekirdeklerinin görünmediği bu gruplar üzerinde genomik DNA miktarı Picogreen analizi ile ölçülmüştür. Kuru doku üzerinden hesaplamalar yapılarak mg doku başına düşen DNA miktarı ng cinsinden standart sapmayla birlikte verilmiştir. Histogram grafiği aracılığıyla genomik DNA miktarları kontrol ve deselülerize gruplar için Şekil 4.12'de verilmiştir. Sonuçlar burada tek yönlü Anova analizi ile karşılaştırılmıştır.

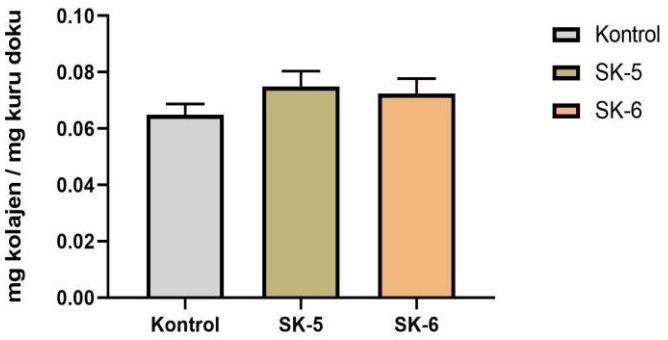


Şekil 4. 12. İşlem görmemiş doku (kontrol) ve $scCO_2$ deselülerize grupların DNA miktarını gösteren histogram grafiği. **** $p < 0.0001$

Burada SK-5. grup 50,46 ± 6,34 ng DNA içeriğine sahip iken SK-6 grubunda 42,53 ± 4,18 ng DNA miktarı bulunmuştur. SK-5 grubu kontrol grubuna göre %75,44 ve SK-6 grubu da %79,3 DNA azalması gerçekleştirmiştir. Daha önceki çalışmalarda tripsin/edta ön işleminin kullanılmasıyla tendon graftlerinde başarılı bir $scCO_2$ deselülerizasyonu gerçekleştirilmiş olduğu görülmüştür [125]. Literatürde verilen parametrelerde menisküs dokusuna göre düzenlemeler yapıldığında, süperkritik akışkan teknoloji kullanılarak, hücresizleştirme için, optimal bir protokol bulunmuştur. Kantitatif DNA analizinde bulunan değerler $scCO_2$ deselülerizasyon gruplarında H&E ve DAPI boyamaları ile de örtüşmektedir. SK-5. grubun sınırda bir artık DNA miktarına sahip olduğundan SK-6. grubundaki ön işlemin menisküs deselülerizasyonu için daha verimli olduğu sonucuna varılmıştır. Konvansiyonel deselülerizasyon yönteminde de kullanılan tripsin ajanı fibröz kıkırdak yapıdaki dokuların hücresizleştirmesinde kullanılacak ajanların penetrasyonunu artırarak daha etkin olduğu hipotezi doğrulanmaktadır.

Sunulan verilerden süperkritik akışkan teknolojisinin menisküs deselülerizasyonu için kullanılabileceği sonucu çıkarılmıştır.

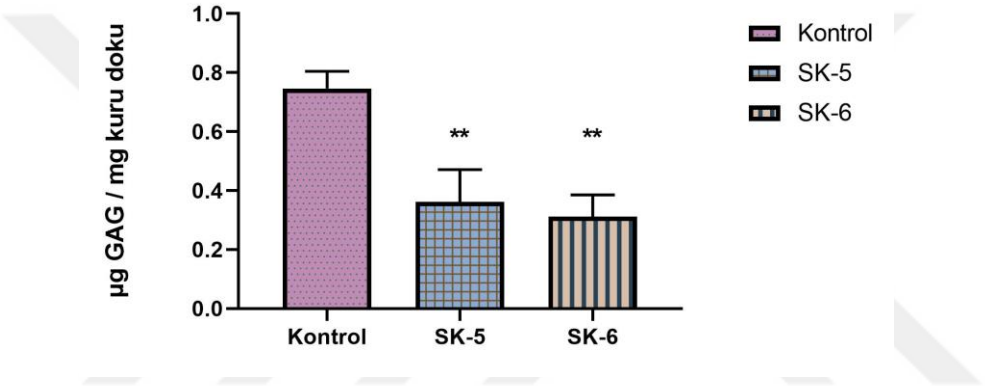
Menisküs dokusundaki majör bileşen olan kolajenin miktar tayininde Hidrosiprolin kiti kullanılmıştır. İşlem görmemiş dokuya göre karşılaştırıldığında $scCO_2$ deselülerize grupların kolajen miktarlarında Tek yönlü Anova Analizinde anlamlı derecede bir fark bulunmamıştır. Şekil 4.13'de doğal menisküs dokusu (kontrol) 0,071 ± 0,01 mg kolajen içerirken, $scCO_2$ deselülerize gruplarınn kolajen değerleri sırasıyla SK-5 grubunda 0,075 ± 0,005 mg ve SK-6 grubunda 0,072 ± 0,005 mg olarak bulunmuştur. Deselülerize grupların işlem görmemiş dokudan daha yüksek miktarda kolajen içeriği önceki bölümde verilen konvansiyonel menisküs deselülerizasyonunda da görülmüştür. $ScCO_2$ deselülerizasyonunun kolajen fiberlerde herhangi bir yıkıma sebebiyet vermemesi Masson Trichrome boyamasının yanı sıra kolajen miktar tayini ile de gösterilmiştir. SDS, Triton X-100 gibi kimyasal deterjanların ECM-kolajen yapılarını bozduğu çalışmalardan görülmektedir. $ScCO_2$ teknoloji kullanılarak yapılan deselülerizasyon ile bu zararın minimize edildiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4. 13. $scCO_2$ deselülerize grupların kolajen miktar tayinini gösteren histogram grafiği (*p<0,05).

Dokunun içerisindeki glikozaminoglikanların tayini için yapılan DMMB Analizi sonuçları Şekil 4.15'de histogram grafiği şeklinde verilmiştir. İşlem görmemiş doğal dokuda 0,742 ± 0,047 µg GAG; $scCO_2$ deselülerize gruplarında sırasıyla SK-5 grubunda 0,362 ± 0,110 µg GAG ve SK-6 grubunda 0,312 ± 0,073 µg GAG miktarı bulunmuştur. Tek yönlü Anova analizi yapıldığında doğal dokuya göre anlamlı derecede azalma belirlenmiştir. $scCO_2$ deselülerize optimal gruplarında 5. ve 6. gruplar için sırasıyla %51

ve %58 GAG içeriğinde azalma olmuş ve bu kantitatif sonuçları Safranin-O/FCF boyamasındaki kalitatif sonuçlar desteklemiştir. Burada deselülerizasyon sonucunda dokudaki GAG azalması konvansiyonel deselülerizasyon protokollerine göre daha fazla olmuştur. GAG zincirleri ECM boşluklarının çoğunu doldurmaktadır ve süperkritik akışkan teknolojisinde dokuya yüksek basıncın girmesi ile GAG zincirlerindeki kovalent bağ yıkımları takriben ECM yapısından basıncın boşaltılmasıyla bu yapıların yüksek miktarda uzaklaşabildiği sonucuna varılmıştır. Huang ve arkadaşları kornea dokusunda denediği $scCO_2$ deselülerizasyonu sonucu GAG miktarlarında yarı yarıya azalış bulmuştur [126]. Bu da sıkı paketlenmiş kolajen fiberlere bağlı olan proteoglikanların basınçtan daha fazla etkilendiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4. 14. $scCO_2$ deselülerize gruplarının GAG miktar tayinini gösteren histogram grafiği (**p<0,01).

Elde edilen verilerden $scCO_2$ teknolojisi ile de başarılı bir menisküs deselülerizasyonu yapılabildiği ortaya konulmuştur. Farklı ön işlemlerin bulunduğu protokoller arasından 6. Grup 50 ng altında DNA içeriğine sahip olması ve menisküs histoyapısının korunmasından dolayı $scCO_2$ teknolojisi ile yapılan deselülerizasyondan optimal protokol olarak belirlenmiştir.

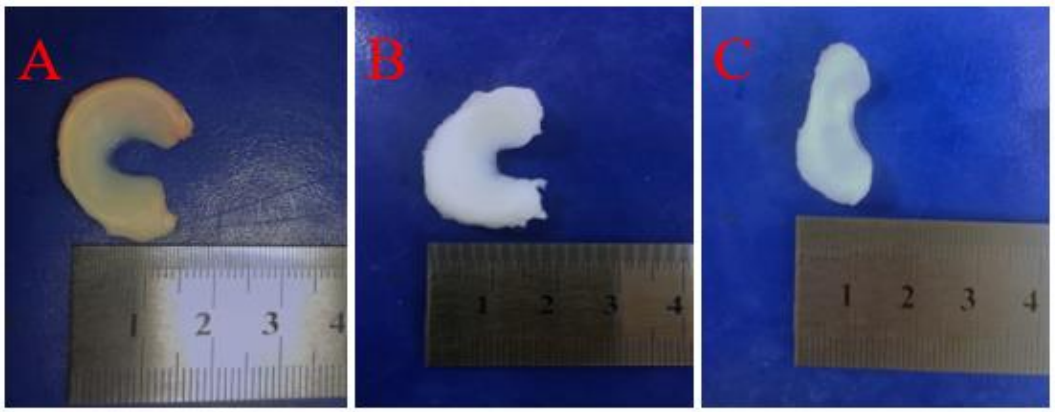
4.1.3. Menisküs Deselülerizasyonunda Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması

Deselülerizasyon yöntemlerinde verimli olan gruplar arasında karşılaştırmalı analizler yapılmıştır. Doku morfolojisinin proses sonundaki değişimleri, taramalı elektron mikroskobisi ile kolajen fiberlerin görüntülenmesi, su tutma kapasitesi ve ağırlık değişimleri, mekanik özelliklerindeki azalışın tayinleri konvansiyonel deselülerizasyon

grubundaki 7. Grup (G-7) ve $scCO_2$ deselülerizasyon grubundaki 6. Grup (SK-6) arasında yapılmıştır.

4.1.3.1. Morfolojik Analiz

Dokunun genel yapısının gözlenmesi için morfolojik analiz doğal dokuya göre deselülerize dokular arasında gerçekleşmiştir. İşlem görmemiş doku (kontrol) ve başarılı deselülerize grupların morfolojik analizleri Şekil 4.15' de verilmiştir.

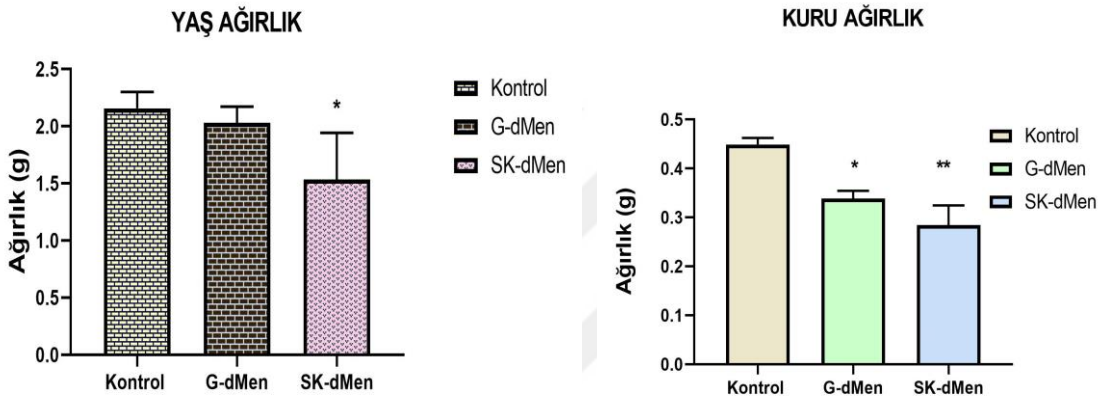


Şekil 4. 15. İşlem görmemiş doku (kontrol) ve deselülerize gruplarının morfolojik görüntüleri. (A) İşlem görmemiş doku, (B) Konvansiyonel Deselülerize grubu, (C) $scCO_2$ Deselülerize grup.

Deselülerizasyon sonununda dokularda kontrol grubuna göre renk değişiminin (beyazlaşma) olduğu gözlenmiştir. Bu morfolojik değişimin de menisküs deselülerizasyonun efektif bir şekilde gerçekleştiğinin kanıtı olmuştur. Deselülerizasyon işlemleri sonunda menisküs dokusu genel şeklini ve mimarisini koruyabilmiştir ve bu da yöntemlerin dokuya az zarar verdiğini göstermiştir. $ScCO_2$ deselülerizasyonunda dokunun iç bölgesinde bir küçülme yaşandığı (C) figüründe görülmüş ve bunun nedeni olarak basınç ve co-solvent'in iç bölgelerdeki bağ dokunun amorf kısımlarında daha fazla kayıp yaşattığı çıkarımı yapılmıştır.

4.1.3.2. Su Tutma Kapasitesi ve Ağırlık Değişimleri

Deselülerizasyon öncesinde yaş ağırlıkları tartılan (n=3) menisküs dokularının proses sonundaki ağırlık değişimleri histogram grafiği şeklinde verilmiştir (Şekil 4.16.). Konvansiyonel yöntemlerin uygulandığı grupta % 3'lük bir ağırlık kaybı ile anlamlı derecede bir fark bulunmamıştır. $scCO_2$ akışkan teknolojisinin ise dokuda % 32'lik kayıp ile anlamlı derecede bir fark bulunarak analiz morfolojik görüntüler ile bağdaşmıştır.



Şekil 4. 16. İşlem görmemiş doku (kontrol) ve deselülerizasyon gruplarının yaş ve kuru ağırlık tayinini gösteren histogram grafikleri (*p<0.05) (**p<0.01).

Hücresizleştirme proseslerinden sonra liyofilize edilen dokular arasında da Tek yönlü Anova analizi ile anlamlandırılmıştır. Doğal dokuya göre her iki grupta da kuru ağırlıklarında bir azalma gerçekleşmiştir. Kolajen fiberlerin gevşemesine bağlı olarak gerçekleşen DNA ve yapısal olmayan proteinlerin kaybı $scCO_2$ deselülerize grubunun kuru ağırlığında daha çok fark edilmiştir.

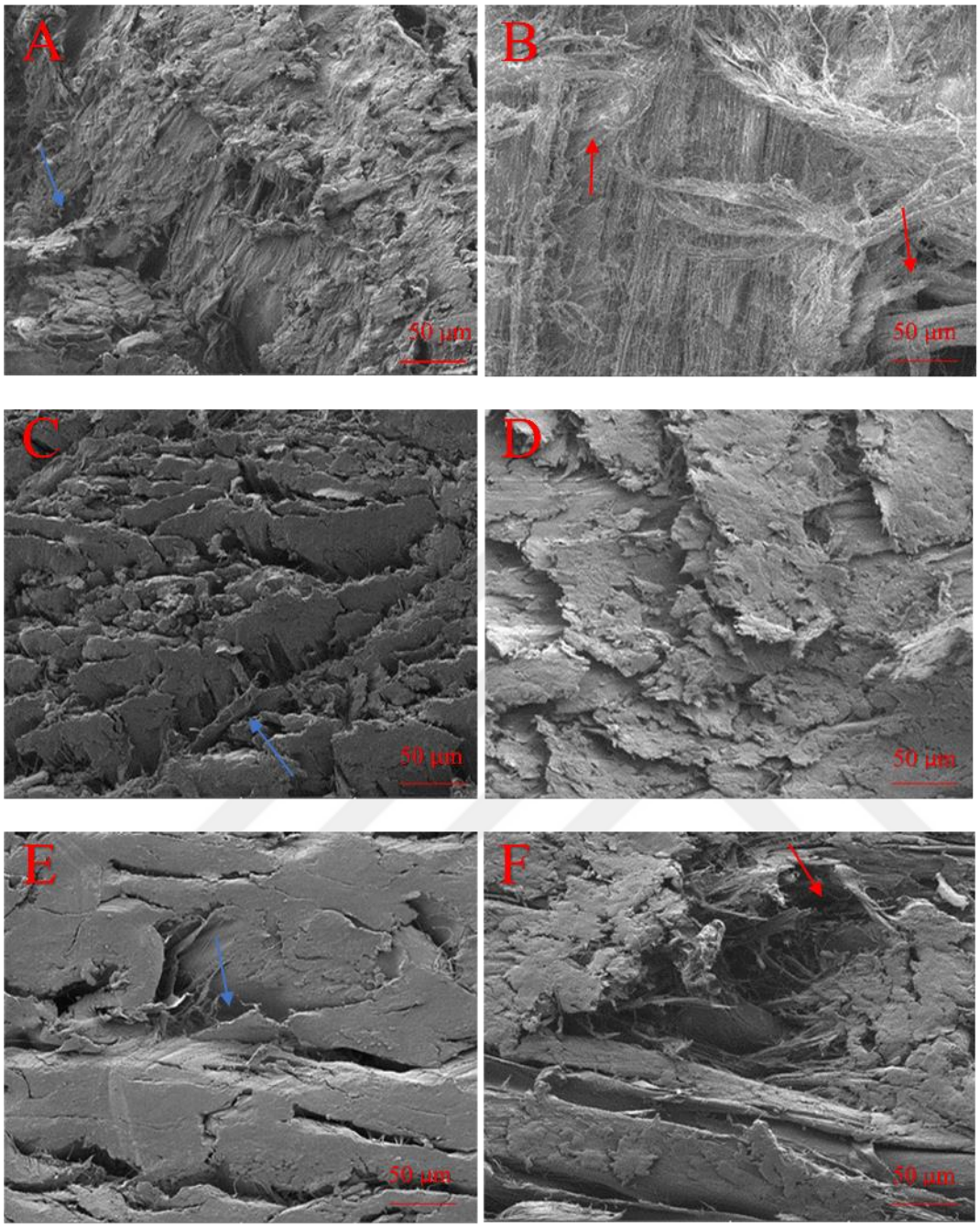
Menisküs dokusunun hidrasyon homeostazını sürdürebilmesinde sülfatlanmış glikozaminoglikanlar önemli derecede rol oynamaktadır. Bu sebeple GAG içeriğinde meydana gelen azalma da dokunun artan su içeriği ve serbest su moleküllerinin salınımı ile sonuçlanabilmektedir. [127]. Bunun dışında sıkı paketlenmiş kolajen fibrillerin ağ örgüsünün açılması ya da mekanik olarak zarar görmesi su içeriğini artıracak bir şişme fenomenine yol açabilmektedir [128]. Bölüm 3.1.5.4'te verilen denkleme göre kontrol

ve deselülerize grupların su tutma kapasiteleri hesaplanmıştır. Doğal dokuda % 78 su kapasitesi bulunurken konvansiyonel ve $scCO_2$ deselülerize gruplarda sırasıyla % 79 ve % 81 oranında bulunmuştur. Gözenekli yapının artmasıyla da ilişkilendirilen bu durum ileriki çalışmalarda yapılacak hibrit malzeme için pre-jeller için geçirgenlik sağlayacağı düşünülmüştür.

4.1.3.3. Taramalı Elektron Mikroskobisi (SEM) Analizi

Taramalı elektron mikroskobisi ile işlem görmemiş doku (kontrol) ve başarılı deselülerize grupların dokudaki kolajen fiberlerin düzeni ve oryantasyonuna bakılmıştır. Şekil 4.17'deki (A), (C), (E) figürlerinde menisküs dokusundan enine kesit alınmasıyla kolajen oryantasyonun görüntüsü sağlanmış olup; (B), (D), (F) figürlerinde boyuna kesit ile sirkümferansiyel fiberlerin hizalanışı ve 3B yapısı gösterilmiştir.

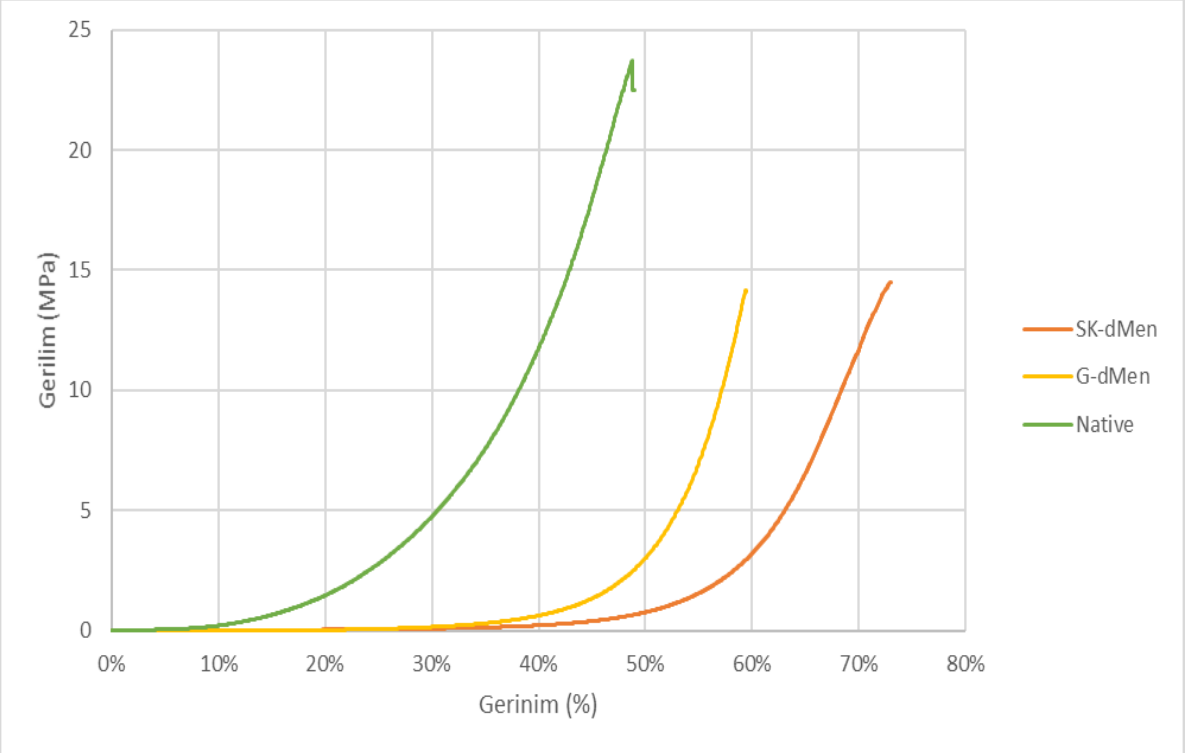
Enine kesit alınan bölgelerde dokunun radyal olarak hizalanmış kolajen fiberlere sirkümferansiyel fiberlerin onlara dik bir şekilde hizalanma gösterdiği mavi oklarla (A, C, E) belirtilmiştir. Yoğun bir şekilde paralel hizalanmış çevresel fiberlerin yarıda kesildiği enine kesit figürlerinden anlaşılmaktadır. Boyuna kesit alınan bölgelerde ise yatay olarak hizalanmış kolajen fibrillerin doğal dokuda (B) figüründe sıkıca paketlendiği gözükmüştür. Bu paketlenmede, menisküs dokusunun üst katmanlarından kesit alındığı için, radyal fiberlerinde rol aldığı ve 3B yapı sergilediği kırmızı ok ile vurgulanmıştır. (D) ve (F) figürlerinde çevresel fiberlerin doğal dokuyla aynı oryantasyonu sergilediği ve deselülerizasyon sonucu kolajen yapısında bir değişme olmadığı görülmüştür. Kolajen oryantasyonunun kontrol grubuna göre (A, B) hem konvansiyonel hem de $scCO_2$ deselülerizasyonu sonrası 3B yapısının bozunmadığı ve fiberlerin çok az zarar aldığı SEM analizi ile sonuçlanmıştır. Konvansiyonel deselülerizasyon (C, D) ve $scCO_2$ deselülerizasyon işlemlerinin (E, F) kolajenin 3B yapısını bozmadığı, sadece kontrol grubuna göre $scCO_2$ grubunun boyuna kesit alındığı bölgede biraz daha fazla ECM fiberlerinin gevşemesiyle kolajen demetlerinin ayrıştığı gözlenmiştir. (A), (C) ve (E) figürlerinde doğal dokuda ECM'deki kompakt yapıda deselülerizasyon sonucu boşluklar olduğu görülmüştür. Kolajen demetlerinde görülen bu minör gevşeme ileriki çalışmalarda iskeleye jel emdirmede yararlı olacağından bu çalışmada önemli rol oynamıştır. Bu kapsamda, hidroksiprolin analizindeki ve Masson Trichrome histoloji çalışmalarındaki deselülerize gruplardaki kolajen miktarı ve ultrayapısının değişmediği SEM analizi ile de desteklenmiştir.



Şekil 4. 17. İşlem görmemiş (doğal) dokunun enine ve boyuna kesitlerinin (A, B); Konvansiyonel optimal deselülerize grubun enine ve boyuna kesitlerinin (C, D); $scCO_2$ optimal deselülerize grubun enine ve boyuna kesitlerinin (E, F) SEM görüntüleri. (1000X)

4.1.3.4. Mekanik Analiz

Aniztropik yapıdaki menisküs dokusunun mekanik özelliklerini 3 ortogonal yönde incelemek daha anlamlı olmaktadır. Sirkümferansiyel, radyal ve aksiyel yönlerdeki mekanik davranışları değişebilmekte ve dayanımlarını kolajen fiberlerin oryantasyonu ve ECM içeriğine göre sağlamaktadır. Kompresif yüklere maruz kalan tek yön aksiyel olduğu için tez çalışmasında bu yöndeki basma dayanımı ve elastik modülüsleri için kompresif analizler yapılmıştır. 2 kN yük hücresi uygulanan kontrol (doğal doku) ve deselülerize menisküs gruplarının gerilim-gerinim eğrisi Şekil 4.18'de verilmiştir. Buradan doğal dokuya göre deselülerize grupların rijiditelerinde azalma olduğu görülmüştür. Gerinim-gerinim grafiğinin lineer bölgesinden dokunun elastik (young) modülüsü hesaplanmış; kompresif modülüsü ve % uzama miktarları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

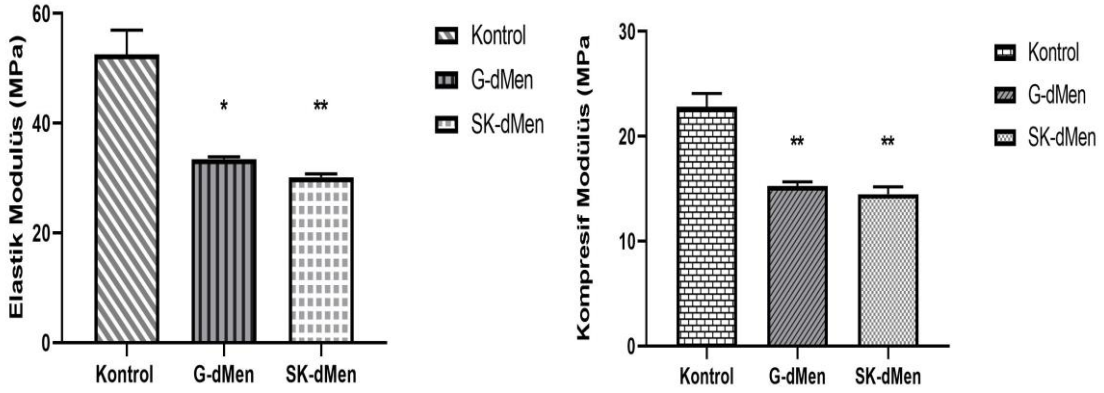


Şekil 4. 18. İşlem görmemiş (doğal menisküs) ve deselülerize grupların gerilim-gerinim eğrisi.

Çizelge 4. 2. Doğal ve deselülerize menisküs dokularının mekanik özellikleri.

	Doğal Menisküs	**G-dMen**	**SK-dMen**
Elastik (Young's) Modulüs (MPa)	52,59 ± 3,10	33,45 ± 0,28	30,16 ± 0,42
Kompresif Modulüs (MPa)	22,8 ± 0.91	15,26 ± 0,28	14,49 ± 0,48
% Uzama	% 48,95	% 60,73	%72,96

Deselülerizasyon sonucu dokuda gelen mekanik kayıpta GAG azalmasının etkin rol oynadığı düşünülmektedir. GAG zincirleri fizyolojik ortamda doğası gereği negatif yüklüdür ve itme yüklerinden dolayı bir şişme basıncı (Donnan ozmotik basıncı) yaratır. Basma sırasında dokudaki negatif yüklü GAG'lar, dokular arası sıvı içindeki pozitif iyonları çeker ve böylece glikozaminoglikanlar yönünden zengin bölgelerde sıvıyı tutmalarına neden olur. Dokunun bu viskoelastik özelliği yapısal olmayan proteinlerin kaybıyla azalmış ve kompresif ve elastik modülüslerinde doğal dokuya göre Tukey çoklu karşılaştırma analizi ile bakıldığında anlamlı derecede bir fark meydana gelmiştir (Şekil 4.19). Bursac ve arkadaşları menisküs dokusunun kompresif davranışının GAG'lar ile pozitif korele iken; su tutma kapasitesi ile negatif korelasyona sahip olduğunu belirtmişlerdir [116]. GAG deplesyonu ve su tutma kapasitlerindeki değişimler mekanik analizin sonuçlarına bağlı olarak tutarlı olmuştur. $scCO_2$ deselülerize grubu konvansiyonel deselülerize menisküse göre nispeten daha fazla azalmıştır. Menisküs dokusunun elastik modülüsü yaş, tür, alınan lokasyon ve hastalık gibi etkenlerle değişebilmekle beraber 20-120 MPa civarlarında olabilmektedir [129]. Basma modülüsünde ise su kaybına bağlı olarak azalış yaşanmış ve doğal dokuya göre deselülerize gruplar arasında anlamlı bir fark olmuştur. Deselülerizasyon prosesleri sonrası meydana gelen kayıpların jel ile birleştirilecek hibrit malzemenin çapraz bağlanabilirliği hakkında fikir verebileceği düşünülmektedir.



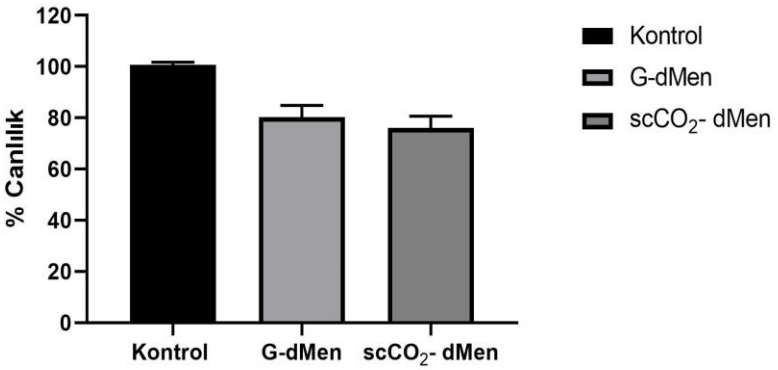
Şekil 4. 19. İşlem görmemiş (Kontrol) ve deselülerize grupların elastik ve kompresif modulüslerini gösteren histogram grafikleri. (*p<0.05), (**p<0.01).

Deselülerizasyon optimizasyonu ve karşılaştırılmasındaki işlemlerden çıkan en başarılı grup konvansiyonel deselülerizasyon yöntemlerinden oluşan *7*. Grup olmuştur. Burada fiziksel ve enzimatik ön işlemler kompakt bir yapıdaki menisküs dokusunda ECM gevşemesini sağlamış ve böylece kimyasal deterjanların dokunun içine daha iyi nüfuz etmesini kolaylaştırmıştır. Hücre artıkları ve kimyasalların dokudan uzaklaştırılmasında PBS yıkamasının uzun tutulması da protokoldeki bir başka başarılı adım olmuştur [92]. Bu kapsamda, menisküs deselülerizasyonu için fiziksel, kimyasal ve enzimatik muamelelerin kombinasyonu deselülerizasyon verimini artırıcı olmuştur. Deselülerizasyonun süresi 9-10 gün olarak belirlenmiştir. Bunun dışında fiziksel ve enzimatik ön işlemler ile $scCO_2$ teknolojisinin birleştirilmesi menisküs deselülülerizasyonun da başarılı sonuçlar vermiştir. Bu protokoldeki deselülerizasyon süresi 8-9 gün arasında tutulmuştur. Karşılaştırılmada $scCO_2$ teknolojisinin daha fazla GAG kaybına neden olduğu ve mekanik dayanımında da buna bağlı düşüş gerçekleşmiştir. Ama bu yöntemin de ayrı bir çalışmada deselülerizasyonun yan etkilerini minimize etmek için protokol optimizasyonunun yapılabileceği sonucuna varılmıştır.

4.1.3.5. Sitotoksisite Analizi

MTT, hücrelerin metobolik aktivitelerinin değerlendiren bir analiz olup, canlı hücreler tarafından renk değişimini (mor renge kayması) oluşturan reaksiyonlar meydana gelmektedir. Deselülerizasyon proseslerinde kullanılan enzimatik ve kimyasal ajanların

dokudan tam olarak uzaklaştırılamaması hücreler üzerinde toksik etki gösterebilmektedir. Elüsyon metodu bir malzemedeki toksik bileşenlerin inkübe olduğu solüsyona geçerek ve hücreler bu solüsyon ile kültüre edilerek malzemenin biyouyumluluğu hakkında bilgi verir. 24'lü kültür kabına ekilen hücrelerin DMEM besiyeri ile inkübasyonu burada kontrol grup olarak belirlenmiştir. Bu gruba göre deselülerize dokuların absorbansları yorumlanarak % hücre canlılığı olarak verilmiştir.



Şekil 4. 20. Deselülerize grupların % hücre canlılığını gösteren histogram grafiği.

Kontrol grubuna göre tek yönlü Anova analizi yapıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark çıkmamıştır ($p>0.05$). Kontrol grubundaki %100 hücre canlılığı; konvansiyonel deselülerizasyon grubunda % 81 iken $scCO_2$ deselülerize grubunda % 76 çıkmıştır. Grupların hiçbiri sitotoksik özellik göstermemekle beraber doku içerisinde herhangi bir deselülerize ajanın olmadığını da kanıtlamaktadır. Deselülerizasyon proseslerinde ECM tabanlı bir doku iskelesi oluşturulması sentetik malzemelere göre biyouyumluluğunda limitasyonlar olmaması bakımından onları klinik kullanımda onları avantajlı kılmaktadır [130].

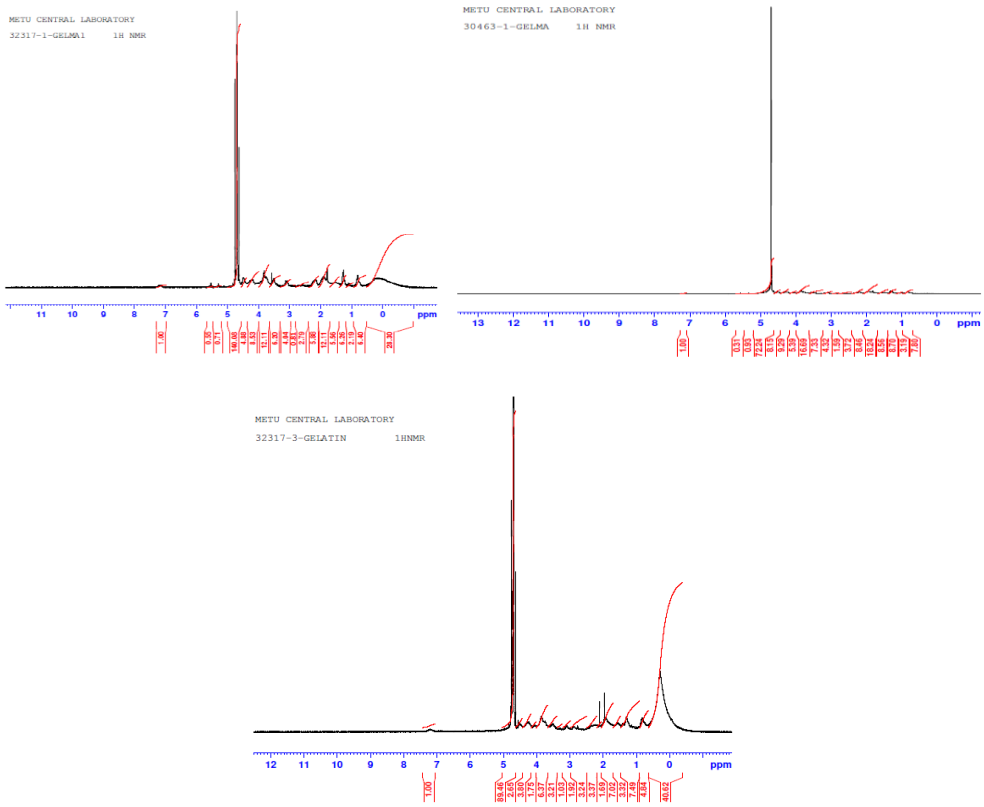
4.2. Fotoçapraz bağlanabilen Hidrojellerin Sentezi ve Karakterizasyonları

Hibrit biyomalzemenin oluşturulmasında ikinci adım olarak metaktilanmış jelatinin (GelMA) hazırlanması ve ardından GelMA ve diğer polimerler ile karışımları hidrojel yapısını oluşturacak olan foto çapraz bağlama için parametrelerde optimizasyonlara bakılmıştır. Tez çalışmasının bu kısmında polimer ve foto başlatıcı konsantrasyonları

sabit tutulmuş olup; farklı polimer ve foto başlatıcı seçiminin yapılması adına analizler gerçekleştirilmiştir.

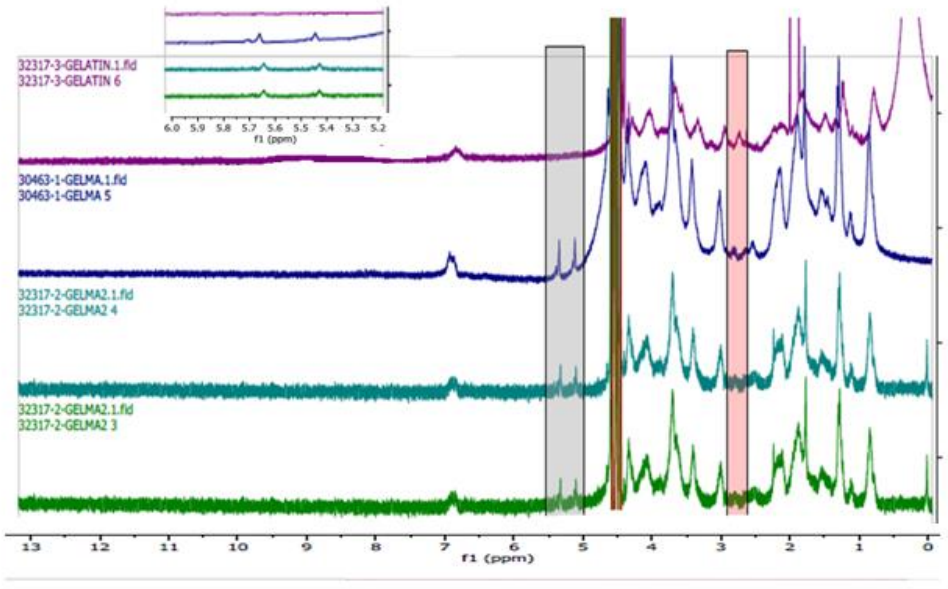
4.2.1. Fonksiyonelleştirilmiş Jelatinin (GelMA) Karakterizasyonu

Metakrilasyon derecesi; şişme davranışı, mekanik özellikleri, degredasyon süresi gibi GelMA hidrojelin fiziksel ve mekanik özelliklerini etkileyen önemli bir faktör olmaktadır. Serbest amin gruplarına metakrilat grupların bağlanmasıyla sentezlenen GelMA polimerinde bağlanmayan serbest amin gruplarının miktarı metakrilasyon derecesini vermektedir. Bölüm 3.2.2'de verildiği gibi gerçekleştirilen GelMA polimerinin metakrilasyon derecesi proton NMR ile hesaplanmıştır.



Şekil 4. 21. GelMA-1 (A), GelMA-2 (B) ve Jelatin (C) için ^{1}H-NMR analizindeki piklerin integral alanları.

Şekil 4.20'de GelMAve jelatinin ^{1}H-NMR analizi sonucu piklerinin integral alanları verilmiştir. NMR spektrumundaki lizin metilenin proton pikleri üzerinden gidilmiştir. 2.8 ppm-3.0 ppm arasında sinyalleri olan bu piklerin alanları MNOVA analiz programı kullanılarak alınmış ve MD hesaplanmıştır. Metakrilasyon derecesi buradan GelMA-1 için %50 olarak bulunmuştur. GelMA konsantrasyonu %10'a çıkartılıp 1:1 oranında MA eklenmesi ile MD %75 olmuştur. Bu artışın nedeni olarak jelatin molekülü içerisindeki serbest amino gruplarının artmasıyla daha fazla metakrilik anhidritin bağlanması ve hidroksil gruplar gibi amino grupların dışındaki nükleofilik fonksiyonlarda ek metakrilat reaksiyonlarına yol açtığı varsayılmıştır [131].



Şekil 4. 22. GelMA ve jelatin piklerin karşılaştırmasını gösteren çakıştırma spektrumu.

Şekil 4.21.de GelMA - jelatin piklerinin çakıştırmasını gösteren bir veri sunulmuştur. GelMA'nın methacryloyl gruplarına ait yeni proton pikleri 5.6 ppm, 5.34 ppm ve 1.93 ppm olarak bulunmuş ve bu da jelatinin fonksiyonelleştiğini göstermiştir. Renklendirilmiş a bölgesindeki pikler (5.6 – 5.34 ppm) metakrilik çift bağları (=CH_2) temsil ederken; serbest lizin pikinin (-CH_2NH_2) GelMA NMR spektrumunda fonksiyonelleşmemiş jelatine göre azaldığı b bölgesi (2.91 ppm) için işaretlenmiştir. 1.93 ppm bölgesi ise metakrilik asidin metil gruplarını (-C(CH_3)=CH_2) ifade etmektedir. Buradaki metakriloil grupları, UV ışık altında ve foto başlatıcı varlığında, serbest

radikal polimerizasyon ile kovalent olarak çapraz bağlı sistemlerin oluşmasına katkı sağlayacaktır. NMR spektrumlarında görülen 7.25-28 ppm piki jelatinin aromatik amino asit kalıntılarını temsil etmiştir. Bu datalardan jelatinin iyi bir şekilde fonksiyonelleştirildiği, yeni yapıda oluşan proton pikleriyle ve lizin metilen sinyalinin azalmasıyla, ^{1}H-NMR spektrumundan anlaşılmaktadır. Karakterizasyon sonunda % 75 MD'sine sahip olan GelMA polimeri ile hidrojel ve hibrit iskelelerin sentezine devam edilmiştir. Aynı konsantrasyon ve proses ile literatürdeki çalışmalarda da % 70 civarında yüksek metakrilasyon derecesine sahip olduğu gözlenmiştir [132].

4.2.2. GelMA Destekli Hidrojellerin Karakterizasyonları

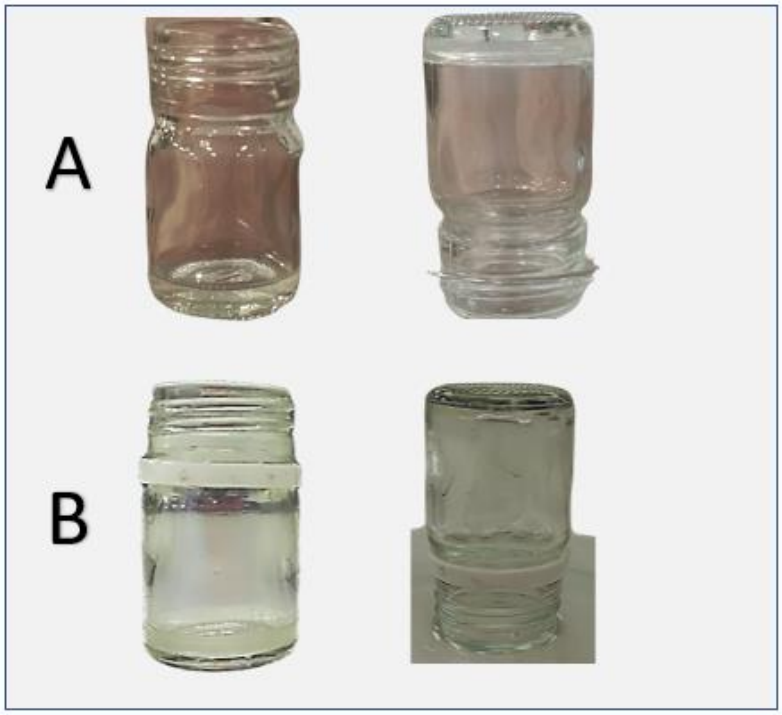
% 10 GelMA (a/h) hidrojelinde foto başlatıcı etkisinin incelenmesi, PEGDMA ve HAMA bileşenleri ile karışımlarındaki davranışlarının değişimleri için kimyasal ve mekanik analizler yapılmıştır. Çizelge 4.3'te grupların detaylı açıklamalarına yer verilmiştir.

Çizelge 4. 3. Hidrojel sentezi için kullanılan grupların kısaltmaları ve jelleşme süreleri.

	I2959	LAP
% 10 GelMA (G)	10 dakikada katı hidrojel formu gözlendi.	5 dakikada katı hidrojel formu gözlendi.
% 10 GelMA/ % 10 PEGDMA (PG)	10 dakikada katı hidrojel formu gözlendi.	5 dakikada katı hidrojel formu gözlendi.

% 0,5 Irgacure ve % 0,1 LAP konsantrasyonları yüksek biyouyumlulukları ile literatürdeki çalışmalarda kullanılmakta olup artan konsantrasyonların da hücre canlılığını etkilediği bildirilmiştir [133]. Foto başlatıcıların konsantrasyonları bu sebeple sabit kalmış ve çapraz bağlama yoğunluğu için denemeler yapılmıştır.

Sınırlı dallanmış polimere sahip olan sistemin sınırsız moleküllere geçişine sol-gel (soluble-gelation) geçişi denir. Burada, jelleşmenin ilk ortaya çıktığı nokta jel noktası olarak adlandırılır [134]. Jelleşme noktası LAP foto başlatıcısı için hem G hem de PG grubunda I2959'a göre daha düşük olmuştur. Şekil 4.23'de (A) figürü LAP foto başlatıcısının çapraz bağlama öncesi sol (soluble) ve sonrası jel (gelation) yapısını gösterirken; (B) figürü I2959 foto başlatıcısının aynı zaman içerisinde 'soluble' halde kaldığını göstermektedir.



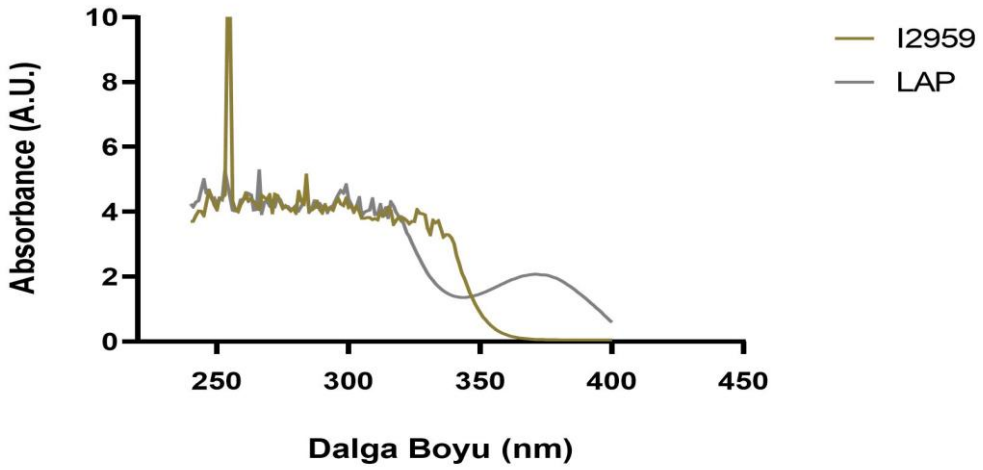
Şekil 4. 23. Polimerizasyon öncesi ve 300 saniye sonrası (A) LAP ve (B) I2959 fotobaşlatıcılarının sol-gel yapıları.

810 µJ/cm² ışık şiddetinde I2959 300 saniyede katı jel oluşumu sergileyemediği ve tam katı bir hidrojel için 600 saniye gerektiği görülmüştür. LAP için bu değer 300 saniyede yeterli olarak fotoçapraz bağlama reaksiyonunun gecikmesini engellemiştir.

4.2.2.1. UV Absorbans Tayini

UV/Vis spektrofotometre ile fotobaşlatıcıların farklı dalga boylarında absorbans değerlerine bakılmıştır. Şekil 4.24'te LAP foto başlatıcısının maximum absorbans gösterdiği bölge 375 nm civarlarında olmakta ve 365 nm dalga boyunda da kayda değer

bir absorbansı bulunmaktadır. I2959 ise 365 nm'de zayıf bir absorbans göstermekte ve bu da 365 nm ve daha uzun dalga boylarındaki kullanımını sınırlamaktadır. Fotopolimerizasyonun ilk basamağı olan başlangıç hızı direkt olarak foto başlatıcı tarafından absorblanan ışık ile orantılı olduğundan dolayı I2959'un etkinliği LAP foto başlatıcısına göre daha düşük olmuştur. Molar sönümleme katsayısı (365 nm'de) absorbans - foto başlatıcı konsantrasyon grafiğinin eğiminden elde edilmiş; I2959 ve LAP için sırasıyla 4,7 1/M.cm ve 231,3 1/M.cm olarak bulunmuştur. Değerler literatür ile de benzerlik göstererek LAP foto başlatıcısının polimerizasyon veriminin daha iyi olduğu söylenebilmektedir [135].



Şekil 4. 24. I2959 ve LAP fotobaşlatıcılarının 200-400 nm dalga boyları arasındaki absorbans spektrumu.

Fotobaşlatıcının seçimi fotopolimerizasyon için birincil bileşeni oluşturmaktadır. Foto başlatıcının absorbsiyon spektrumu kullanılan ışık kaynağı ile irradyasyon profilinin büyük kısmıyla örtüşmelidir. Yüksek molar sönümleme katsayısı ile de sonuçlanan bu durum reaktif başlatıcı türlerin konsantrasyonlarını artırmaktadır [136]. LAP foto başlatıcısının 365 nm'deki absorbansının fazla olması jelleşme noktasının daha düşük ve polimerizasyon başlangıç hızının neden daha hızlı olduğunu açıklamaktadır.

Tez çalışması kapsamında LAP foto başlatıcısının etkinliği kolajen iskelesini hızlı bir şeklide in situ çapraz bağlaması açısından avantajlı bulunmuş ve HAMA polimeri ile oluşturulan jel yapılarında sadece LAP fotobaşlatıcısı kullanılmıştır.

4.2.2.2. Morfolojik Analiz

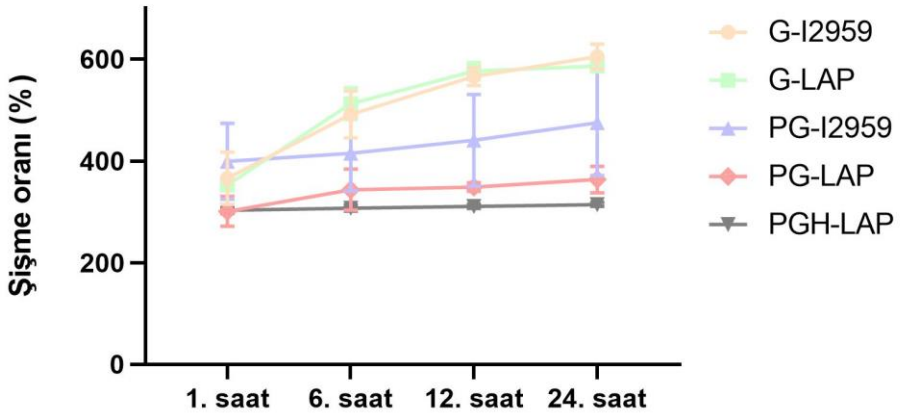
GelMA hidrojelinin saydamlığının çift ve üçlü fazlı gruplarındaki davranışı için morfololojik olarak görüntülenmiştir. Burada GelMA kattkılı tüm gruplarda saydamlık yapısının korunduğu görülmüştür (Şekil 4.25.). Ayrıca PEGDMA ve HAMA eklenmesiyle hidrojelin stabilitesinin arttığı ve yapının daha kararlı hale geldiği de görüntülerden anlaşılmıştır.

Şekil 4. 25. (A) G-I2959, (B) G-LAP, (C) PG-I2959, (D) PG-LAP ve (E) PGH-LAP hidrohellerinin makroskobik görüntüleri.

4.2.2.3. Şişme ve Sol Fraksiyon Testi

Hidrojellerin şişme karakteristikleri gözenek boyutunu, mekanik özelliklerini ve çapraz bağlama derecesini büyük oranda etkileyebilmektedir. Çapraz bağlama derecesi yüksek olan hidrojellerde küçük gözenek boyutu ile ağ yapısının içerisine daha düşük

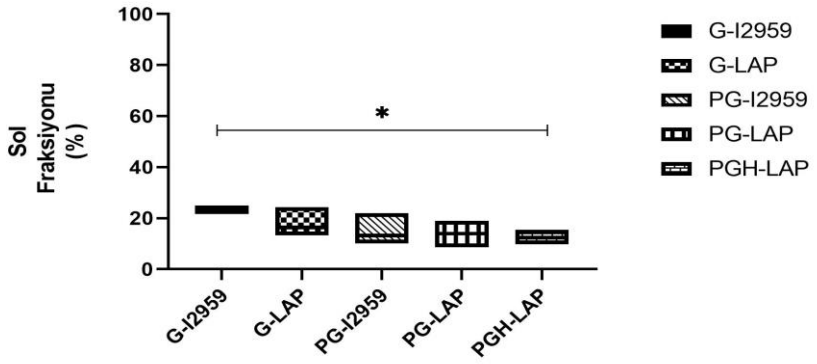
kapasitede su alabilmektedir. GelMA hidrojelerine PEGDMA ve HAMA eklenmesiyle oluşturulan iç içe ağ yapılarına ait şişme oranı (%) Şekil 4.26.de verilmiştir.



Şekil 4. 26. Hidrojellerin zamana bağlı şişme oranlarını gösteren çizgi grafiği.

PGH-LAP ve PG-LAP hidrojellerinin 12. saatten sonra denge şişme noktasına ulaştığı görülmektedir. GelMA hidrojeli için LAP ve I2959 foto başlatıcısının şişme oranları diğerlerine göre daha fazla olmuş ve bu da 3B ağ yapısının daha gevşek olduğunu göstermektedir. G-LAP ve G-I2959 jelleri arasında anlamlı bir fark ($p>0.05$) bulunmamıştır. PEGDMA polimerinin eklenmesiyle her iki foto başlatıcı için şişme oranları anlamlı derecede ($p<0.05$) azalmıştır. HAMA'nın yapıya katılması daha sıkı paketlenen bir ağ yapısı sergileyerek yüksek çapraz bağlama yoğunluğunu ve bu yüzden daha az su alma kapasitesine sahip olmasını sağlamıştır. Bu analizde PGH-LAP grubu en az şişme oranı ile çapraz bağlama yoğunluğunun daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Çapraz bağlama etkinliği ayrıca sol fraksiyon analizi aracılığıyla da hidrojeller üzerinde yapılmıştır. Bu analiz ile fotopolimerizasyon sonucunda hidrojelin 3B ağ yapısına kovalent bağlı olmayan polimer zincirlerinin ağırlık fraksiyonu olarak da tanımlanmaktadır [137] .

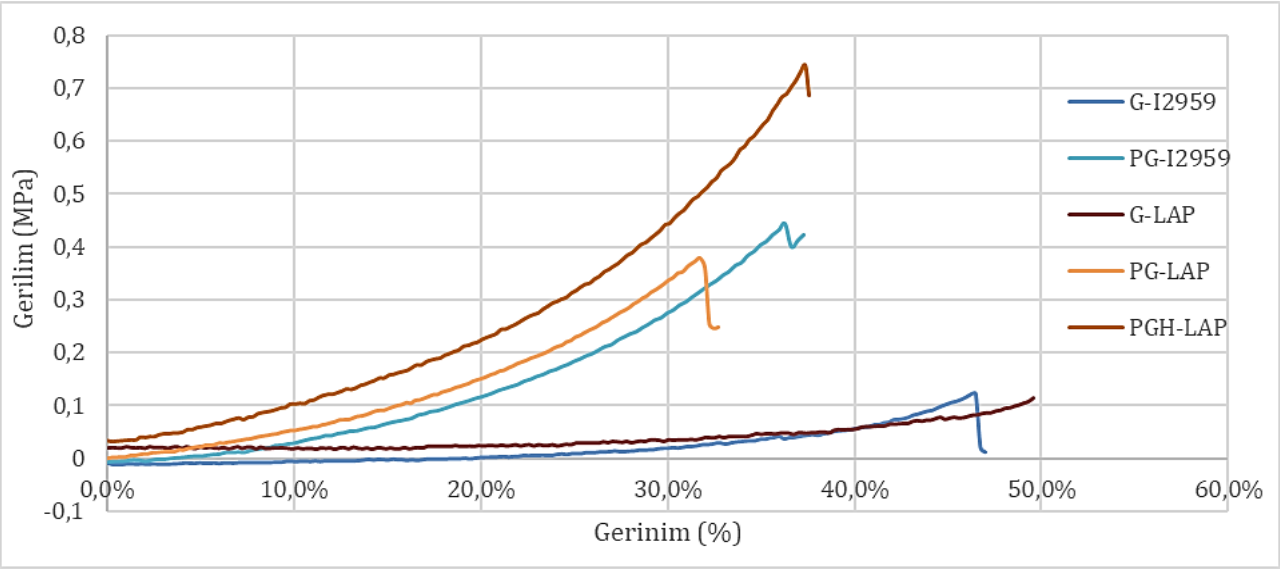


Şekil 4. 27. Hidrojellerin Sol Fraksiyon oranını gösteren grafik (*p<0.05).

Şekil 4.27.de hidrojellerin sol fraksiyon yüzdeleri verilmiş olup çapraz bağlanmamış monomerlerin oranı artıkça sol fraksiyon ağırlığı da artmaktadır. Buradan PGH-LAP grubununda radikal polimerizasyon ile çapraz bağlama efektifliğinin diğerlerine göre daha verimli olduğu bilgisine ulaşılmıştır. Sadece G-I2959 ve PGH-LAP arasında tek yönlü Anova analizine göre anlamlı bir fark bulunmuştur. Buradaki sonuçlar şişme testi ile de tutarlılık göstermiş ve yüksek şişme oranına sahip olan G-I2959 ve G-LAP diğer gruplara göre daha yüksek sol fraksiyona sahip olmuşlardır.

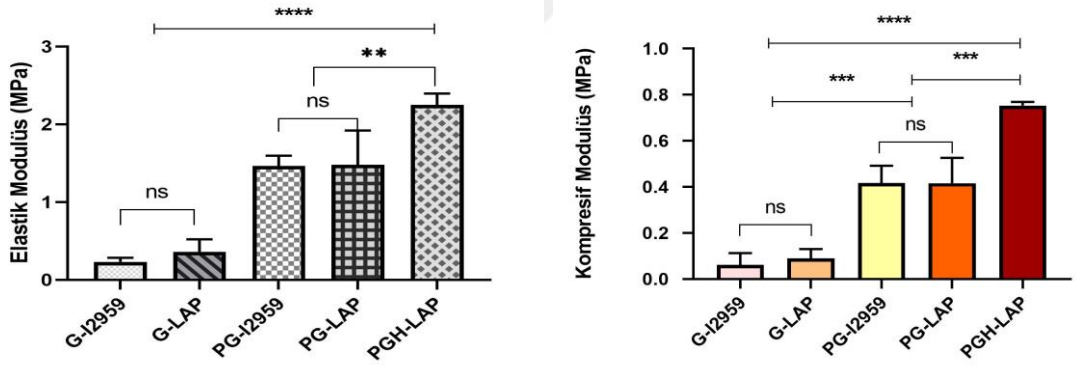
4.2.2.4. Mekanik Analiz

Hidrojellerin prepolimer konsantrasyonunun artırılması, prepolimerin yüksek metakrilasyon derecesi, prepolimer karışımları gibi ayarlanabilen özellikleri sayesinde mekanik dayanımları da yükseltilebilmektedir. Yüksek polimer konsantrasyonu ve metakrilasyon derecesi hücreler için toksik olabileceği bakımından biyomalzemenin kullanımını sınırlamaktadır. Bu tez çalışmasında hücreler için ılımlı konsantrasyon ve metakrilasyon dereceleri kullanılarak polimer karışımları ve foto başlatıcı seçimi ile hidrojellerin mekanik özelliklerindeki değişimler incelenmiştir. Şekil 4.28'de sentezlenen hidrojel gruplarının gerilim-gerinim grafiği verilmiştir. GelMA hidrojelinin her iki foto başlatıcı için de mekanik dayanımlarının hemen hemen aynı olduğu görülmektedir. PEGDMA polimerinin eklenmesi ile dayanıklılık yükselmiş ve bu da polimer karışımları ile hazırlanan hidrojellerin mekanik davranışlarının istenilen düzeyde ayarlanabileceğini göstermiştir.



Şekil 4. 28. Oluşturulan hidrojellerin gerilim-gerinim grafiği.

En yüksek mekanik dayanıklılık gösteren grubun PGH-LAP olduğu grafikten belirlenmiştir. Grafiğin eğiminden elastik modulüslerine gidilerek gruplar arasındaki anlamlılık değerlerine Anova Tukey karşılaştırma testi ile bakılmıştır (Şekil 4.29.).



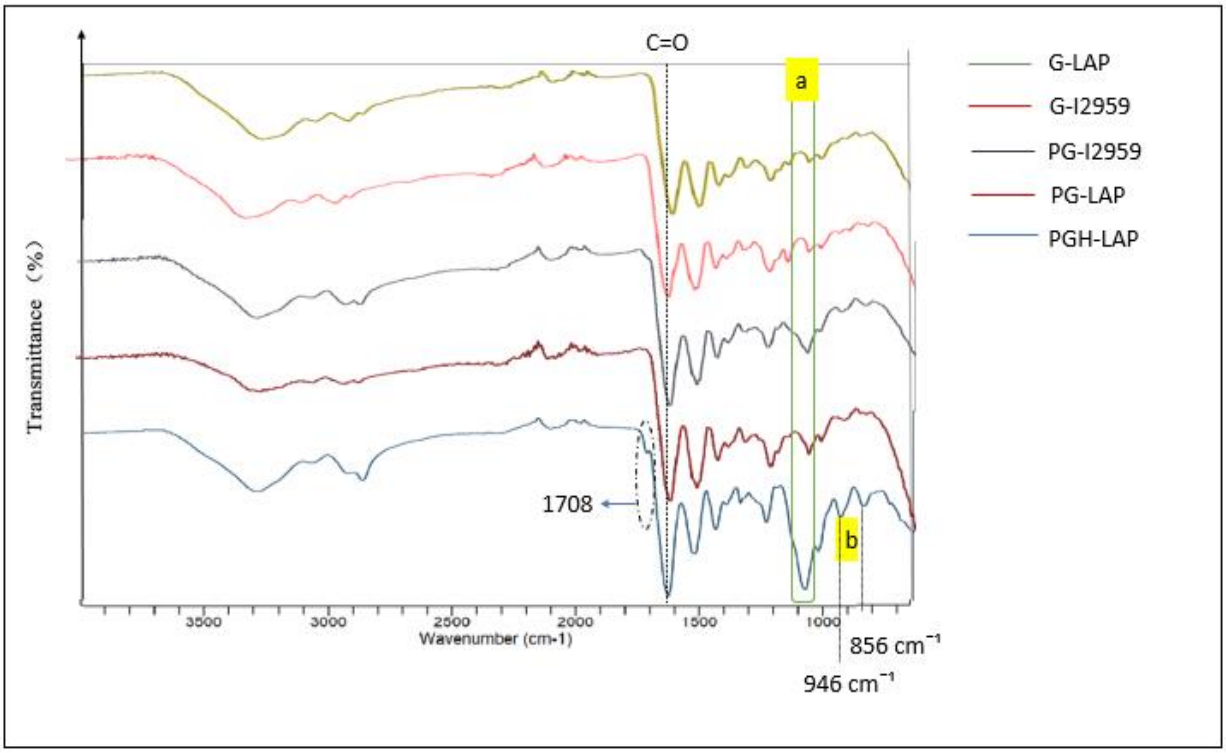
Şekil 4. 29. Hidrojellerin (A) Elastik modulüsleri ve (B) Kompresif modulüslerini gösteren histogram grafiği. (**p<0.01)(***p<0.001)(****p<0.0001)

G-I2959, G-LAP, PG-I2959, PG-LAP ve PGH-LAP gruplarının elastik modülusleri sırasıyla 0,231 ± 0,045 MPa, 0,36 ± 0,13 MPa, 1,462 ± 0,1 MPa, 1,48 ± 0,16 MPa, 2,25 ± 0,11 MPa olarak bulunmuştur. Foto başlatıcı seçiminin mekanik özellikleri karşılaştırıldığında hem gelma hem de gelma-pegdma grupları içinde anlamlı bir fark ($p>0.05$) görülmemiştir. Fakat farklı prepolimerlerin yapıya eklenmesi ile daha fazla iç içe geçmiş 3B ağ sistemi oluşturulmuş olup çapraz bağlanmanın artırılarak elastik

modulüslerinde artma eğilimi olmuştur. Sadece GelMA ya da sadece PEGDMA'nın çapraz bağlandığı çalışmada her iki polimerin karıştırılmasıyla elde edilen hidrojellerin diğerlerine göre daha yüksek elastik modulüslerine ulaşıldığı raporlanmıştır [138]. Burada da aynı konsantrasyonların kullanımı ile young modulüslerinde artış gözlenmiştir. HAMA polimeri ile de yapılan kombinasyonun en başarılı sonuçlar verdiği; elastik ve kompresif modulüslerinden anlaşılmaktadır. % 10 GelMA ve % 2 HAMA konsantrasyonlarının denediği bir çalışmada hibrit hidrojellerin basma dayanımları tekli gruplarına göre yükseltildiği rapor edilmiştir [139]. Aynı şekilde HAMA katkılı PGH-LAP grubunun en yüksek basma modülüsüne (0,753 MPa) sahip olduğu Şekil 4.29. (B) şıkkından gözlenmektedir. G-I ve G-LAP gruplarının basma dayanımları sırasıyla 0,061 ve 0,08 MPa olurken; PEGDMA kombinasyonları yapıldığında bu değerler 0,417 ve 0,416 MPa'a artmıştır.

4.2.2.5. FTIR Analizi

Fourier -Transform Infrared Spektroskobi (FTIR) malzeme içindeki atomların bağları arasında görülen titreşim frekanslarından geçiş piklerini veya molar absorbsiyonlarını gözleyen spektroskobik bir metottur. Spesifik kimyasal grupların belirlenmesinde sıklıkla kullanılan karakterizasyon yöntemi tez çalışmasında sentezlenen hidrojeller arasındaki kimyasal yapılarının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Şekil 4.30.da tüm hidrojel gruplarının ftır spektrumlarının karşılaştırılması verilmiştir.



Şekil 4. 30. Hidrojellerin çakıştırmalı olarak verilen FTIR spektrumları.

Spektrumda 3300 cm^{-1}'den 3250 cm^{-1} arasındaki geniş sinyal peptit bağlarından N-H gerilme titreşimiyle ve amide A'nın hidroksil gruplarından O-H gerilme titreşimleriyle ilişkilendirilmiştir. 3075 cm^{-1} de görülen pik Amide B bağının N-H geriliminden gelmektedir. 1600 cm^{-1} bölgesindeki pikler amide I bağı için C=O gerilmesini temsil ederken 1543 ve 1452 cm^{-1} amide II piki olup C-N gerilimini ve N-H bükülmesini göstermektedir. 1452 cm^{-1} 'deki pik kolajenin CH bağını; Amide III bağındaki N-H bükülmesini 1239 cm^{-1} dalga boyunda gözlenen pikler temsil etmektedir. Bu pikler kolajenden gelen spesifik pikler olup GelMA ve hibrit yapılarından da gözlenmiştir. Pegdma'nın yapıya katılmasıyla (a) ile işaretlenen alanda görülen 1101 cm^{-1}'deki pik oluşmuştur. Bu pik -C-O-C-'nin C-O asitmetrik gerilim titreşimiyle ilişkilendirilmiş olup pegdma polimerinin hidrojel yapılarına iyi bir entegrasyonunu göstermektedir [140]. HAMA hidrojelinin karakteristik piki 1708 cm^{-1} C=O ester bağını göstermektedir. PGH-LAP grubunda bu pikin gözlendiği, ayrıca 950 ve 856 cm^{-1} de görülen piklerin de (b) HA zincirinden gelerek HAMA'nın hidrojel içindeki varlığı söylenebilmektedir [141].

Fotopolimerizasyon ile hidrojeller oluşturulmuş olup bu çalışma için istenilen özellikler de parametreler şu şekilde ayarlanmıştır:

(1) Kolajen bazlı menisküs dokusu için UV çapraz bağlama süresinin minumum olacağı ve fotopolimerizasyonun yoğun yapı srgileyen iskelede bleaching özelliği yaratacak olan LAP foto başlatıcısının seçimi uygun bulunmuştur.

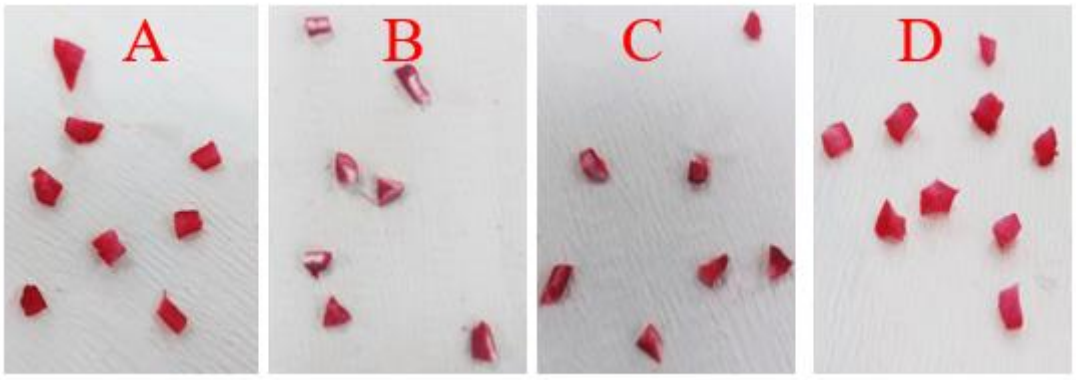
(2) GelMA polimerinin tek başına kullanımına göre PEGDMA polimeri ile kombinasyonlarında yüksek mekanik dayanım ve düşük şişme oranı göstermesi sebebi ile PG grupları menisküs doku mühendisliği için kullanımında daha efektif olacağı sonucuna varılmıştır.

(3) PG grubuna HAMA eklenmesi çapraz bağlama derecesini artırmış ve iç içe geçen bir 3B ağ yapısının oluşturararak gerek mekanik gerekse fiziksel davranışlarda hidrojel grubun öne çıkarmıştır.

Bu yüzden sonraki çalışma olan hibrit iskelelerin oluşturulmasında G-LAP, PG-LAP ve PGH-LAP hidrojelleri üzerinden gidilmiştir.

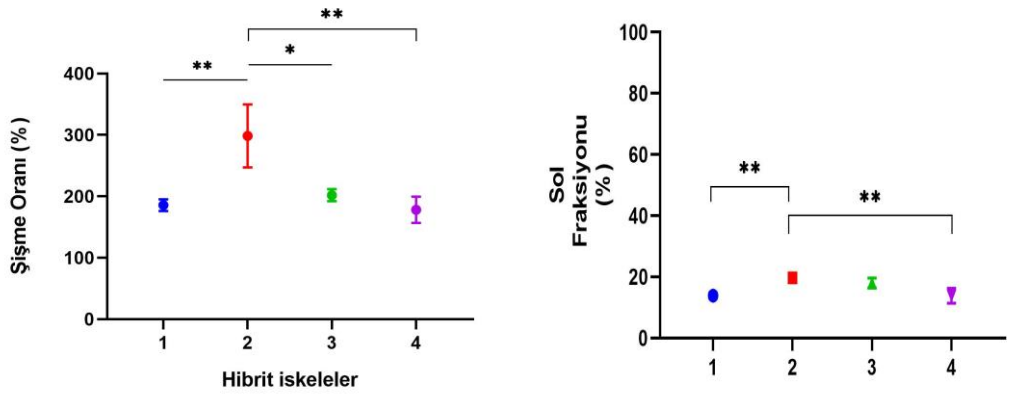
4.3. Hibrit Nihai Menisküs İskelelerinin Karakterizasyonları

Tez çalışmaları kapsamında hibrit menisküs iskelelerinin geliştirilme başarısı işlem görmemiş (doğal) doku, deselülerize menisküs iskelesi ve hibrit iskeleler arasında karşılaştırma yapılarak kanıtlanmıştır. Yoğun bir doku olan menisküste çapraz bağlamanın efektifliğine bakılması adına 5 mm kalınlığında iskeleler posterior bölgeden alınmıştır. Vertikal (cross-section) olarak alınan kesitler üzerinde jelin geçirgenliğini belirlemek için farklı metotlar denenmiştir. Şekil 4.31'de jelin içine kırmızı gıda boyası (gellan gum) eklenerek emdirilmesi ve ardından çapraz bağlanması sonucundaki dokunun iç kısımlarının görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 4. 31. Çapraz bağlandıktan sonra hibrit iskelelerin iç kısımlarının makroskobik görüntüleri. (A) 1. Grup (72 saat inkübasyon), (B) 2. Grup (4 saat inkübasyon), (C) 3. Grup (4 saat inkübasyon + DHT) (37°C, 28 mbar), (D) 4. Grup (4 saat sonikasyon + 1 gece inkübasyon).

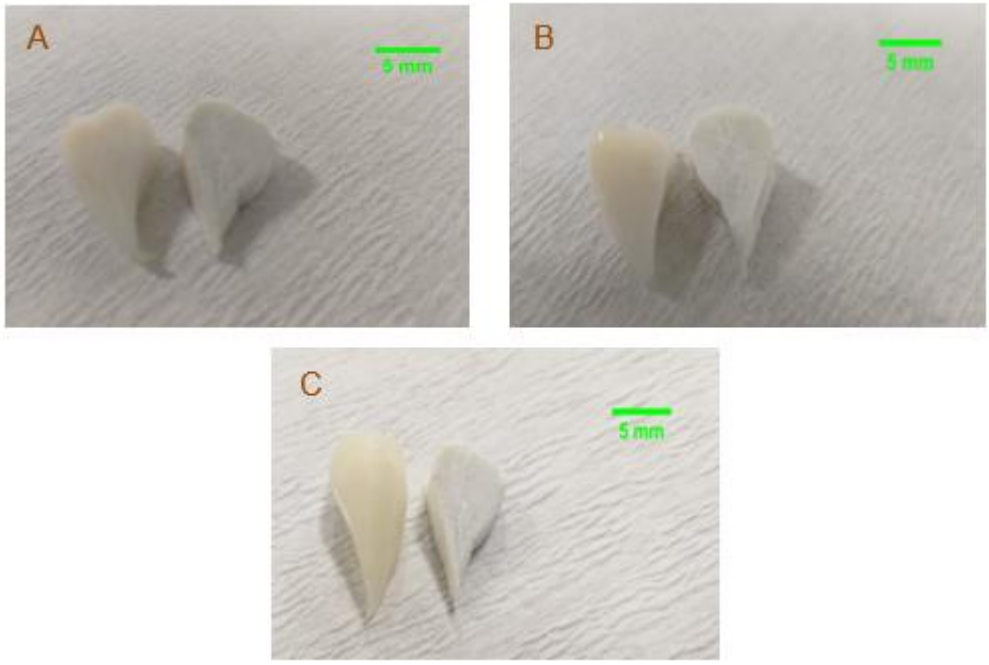
2. ve 3. gruplardaki jelin kolajen yapılarıyla tam olarak entegre olamadığı görülmektedir. Kantitatif bir analiz adına şişme ve sol fraksiyon testi iskelelere uygulanmış olup metotlar arasında anlamlılık değerleri ölçülmüştür. Şekil 4.32'de verilen grafiklerden 2. grubun en fazla şişme ve sol fraksiyon oranı gösterdiği görülmüş ve jel emdirme fotoğrafları ile de sonuçlar örtüşmüştür. 3. grup nispeten daha düşük şişme gösterse de 1. ve 4. gruba göre sol fraksiyonu ve şişme oranı daha yüksek olmuştur. Hem jel emdirme fotoğraflarından hem de kalitatif analizlerden elde edilen verilere göre 1. ve 4. grupların jel için geçirgenliği daha fazla olmuş ve çapraz bağlanabilirliğin incelenmesinde kullanımları uygun bulunmuştur. 4. grubun sonikatör prejelin menisküs iskelesindeki 3B kolajen fibrillerin arasına dağılımını kolaylaştırmasının yanı sıra 1. gruptaki 72 saat inkübasyonu da yaklaşık olarak 16 saate düşürmüştür. Bu yüzden 4. gruptaki metot ile nihai hibrit iskelelerin oluşturulmasına devam edilmiştir.



Şekil 4. 32. Pre-jelin aselüler iskeleye emdirilmesinde kullanılan yöntemlerin (A) % şişme oranı ve (B) % sol fraksiyonunu gösteren grafik. (*p<0.05)(**p<0.001)

4.3.1. Morfolojik Analiz

Deselülerize iskelelere G-LAP, PG-LAP ve PGH-LAP jellerinin emdirilerek UV ışık (365 nm) ile beşer dakika çapraz bağlanmış hallerinin makroskobik görüntüsü Şekil 4.33'te verilmiştir. Çapraz bağlanmış iskelelerde hafif bir renk değişimi yaşanmış olup iskele boyutlarının aynı kaldığı görülmüştür.



Şekil 4. 33. (A) G-Hibrit, (B) PG-Hibrit ve (C) PGH-Hibrit iskelelerinin çapraz bağlama öncesi (sağ) ve sonrasının (sol) morfolojik görüntüleri.

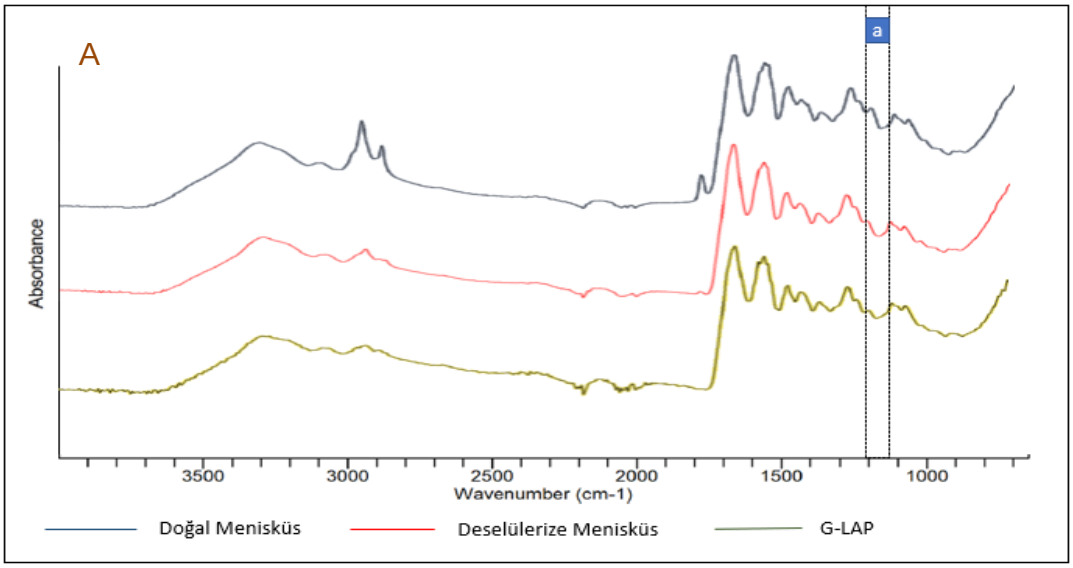
İskelelerdeki ağırlık değişimleri için doğal ve deselülerize gruplar baz alınmıştır. Çizelge 4.4. de kuru ağırlık değişimleri ortalama + sd şeklinde verilmiştir. Deselülerize iskelelere jelin katılması ile ağırlıklarında artış gözlenmiş bu da jellerin yapıya katılmasının göstergesi olmuştur. G-LAP diğer gurplara göre daha az ağırlık değişimine maruz kalması makromer konsantrasyonunun daha düşük olması ile açıklanmıştır. Aynı şeklide PGH-LAP en yüksek makromer konsantrasyonu ile daha fazla ağırlık oranı göstermiştir.

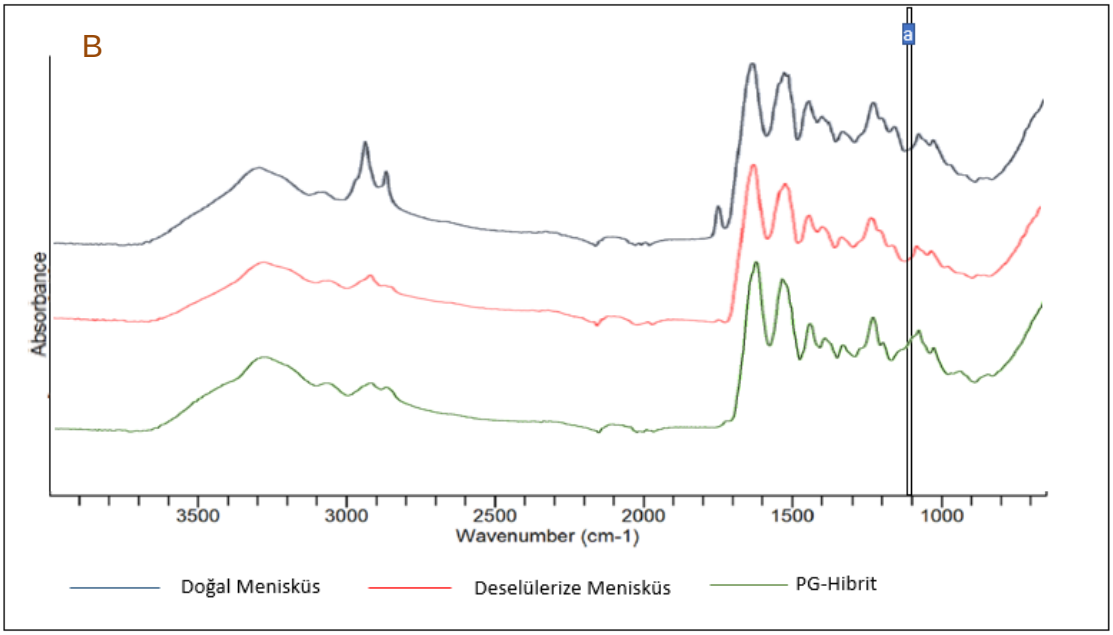
Çizelge 4. 4. Doğal, deselülerize ve hibrit menisküs iskelelerinin 5 mm kuru ağırlık oranları.

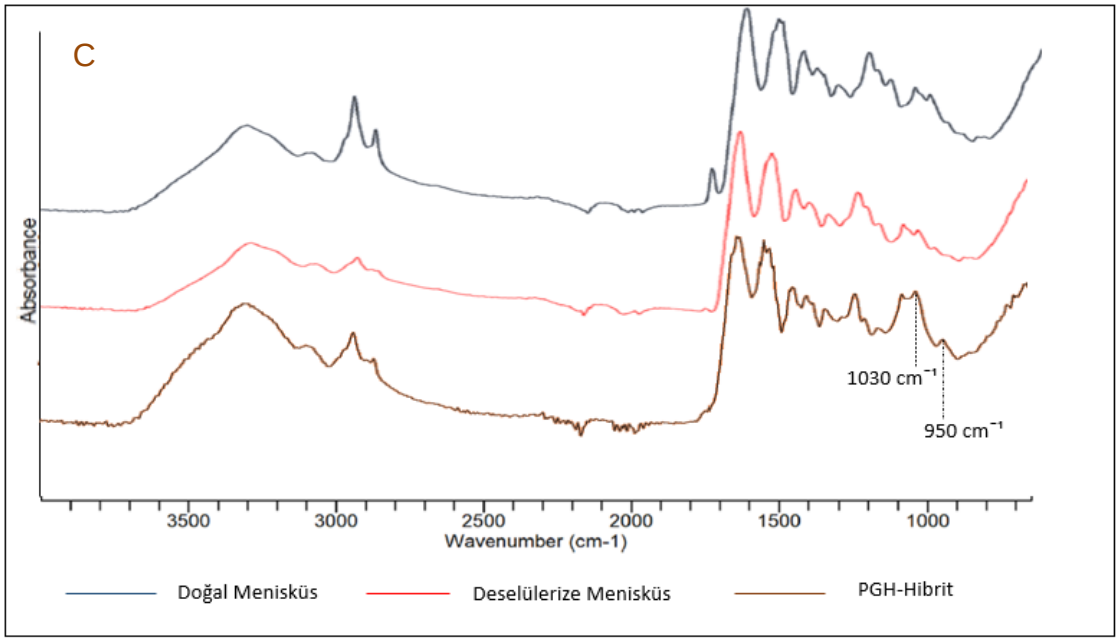
	Doğal doku	**d-Men**	**G-LAP**	**PG-LAP**	**PGH-LAP**
5 mm kuru ağırlık (g)	0,0602 ± 0,01	0,041 ± 0,003	0,0604 ± 0,013	0,072 ± 0,012	0,081 ± 0,003

4.3.2. FTIR Analizi

Çapraz bağlanan iskelelerin doğal ve deselülerize yapılarına göre kimyasal değişikliklerinin saptanması adına FTIR analizi yapılmıştır. Hibrit iskelede enkapsüle olan jel yapıları arasında doğal ve deselülerize menisküs dokularındaki karakteristik pikler baz alınarak karşılaştırma yapılmıştır. Kuru iskele üzerinden yapılan analizin sonuçları Şekil 4.34.te çakıştırma grafikleri olarak verilmiştir.







Şekil 4. 34. (A) G-Hibrit, (B) PG-Hibrit ve (C) PGH-Hibrit iskelelerin hiç işlem görmemiş ve deselülerize iskeleler ile çakıştırmalı FTIR spektrumları.

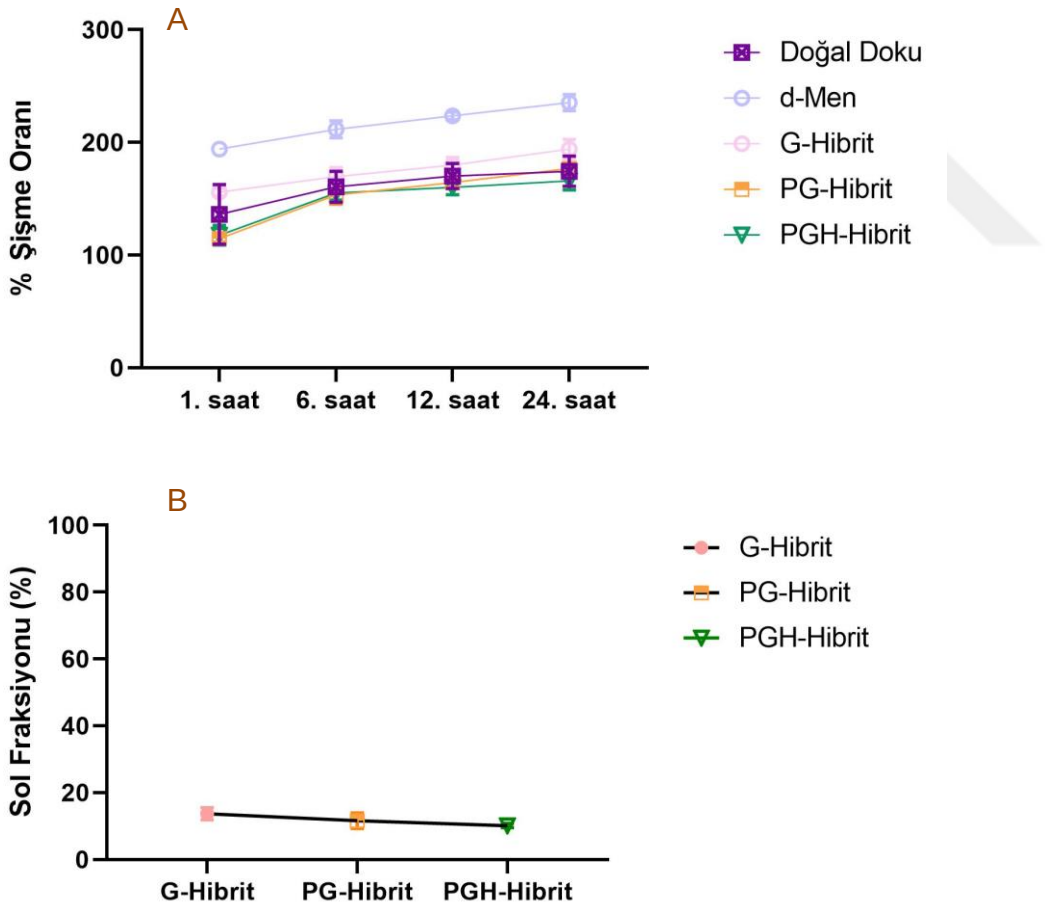
Grafiklerde genel olarak deselülerizasyondan sonra kolajen yapılarının korunduğu, jel emdirilmiş yapılarda da emdirme metodunun iskeleye zarar vermediği ve kimyasal yapısını sürdürebildiği görülmüştür. İlk figürde (A) doğal, deselülerize ve G-LAP hibrit menisküs iskelelerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Buradaki pikler 3330 cm^{-1} Amid A bölgesinin N=H gerilimini, 2922 cm^{-1} kolajen zincirindeki simetrik CH grubunu, 2855

cm^{-1} C-H asimetrik gerilimi, 1744 cm^{-1} dokudaki lipidleri, 1632 cm^{-1} Amid I bölgesindeki C=O gerilimini, 1524 cm^{-1} Amid II'deki N-H bükülmesini ve C-C, C-N gerilimini, 1334 cm^{-1} kolajenin yan zincirindeki CH titreşimlerini, 1230 cm^{-1} Amid III bölgesindeki C-N gerilimini, 1080 sülfatların simetrik gerilimlerini temsil etmektedir. Deselülerizasyon sonucu dokuda da görülen aynı pikler, GelMA'nın dokuya emdirilmesi ile de tüm gruplarda gözlenmiştir. 1438 cm^{-1} bölgesindeki pikin absorbansı hibrit yapılarda daha fazla olmuş ve bunun da jelatinin C-H fonksiyonel grubundan olduğu söylenmiştir [142]. GelMA makromolekülü kolajen bazlı olduğu için kolajene ve aminoasitlerine ait piklerin çakıştığı görülebilmektedir. Bunun yanı sıra (a) ile işaretlenen alanda 1159 cm^{-1}'deki pikin G-LAP hibritinde absorbans azalmasının nedeni olarak tirozin amino asidinin UV ışık altındaki C-OH ve C-O kısımları ile ilişkilendirilmiştir [143]. B figüründe (a) ile işaretlenen bölgede PG-Hibrit grubu için PEGDMA eklenmesiyle gelen bir pik 1101 cm^{-1}'de görülmüştür. Bu da deselülerize yapıya PG polimerinin iyi bir şeklide entegre edildiğini göstermektedir. G-hibrit grubunda bahsi geçilen 1159 cm^{-1} bölgesinden absorbans azalmasıyla çapraz bağlanmanın iskele içerisinde gerçekleştiği bu grup için de söylenebilmektedir. Bunların dışında Amid A (3295 cm^{-1}), B (3078 cm^{-1}), I (1632 cm^{-1}), II (1543 cm^{-1}) ve III (1446 cm^{-1}) bölgelerine ait pikler hibrit grupta da görülmüş ve kolajen fiberler yapılarının zarar görmediği belirlenmiştir. HAMA polimerine ait karakteristik piklerden olan 1030 cm^{-1} ve 950 cm^{-1} (C) şıkkındaki PGH-Hibrit grubu için işaretlenmiştir. Söz konusu pikler metakrilanmış hyaluronik asidin iskele içerisine kapsüle olmasını kanıtlamaktadır [144]. İşlem görmemiş ve deselülerize gruplarındaki piklerin bu grup için örtüştüğü görülmüştür. Kolajenin triple helix yapısının şeklini sürdürülmesinde hidrojen bağları önemli rol oynar. Yapının gevşemesi için hidrojen bağlarının yıkımı gerekli olmakla beraber C-H şiddetinin azalması da buna bir kanıt oluşturur. Doğal dokuya göre 1446 ve 2922 cm^{-1}'de görülen C-H gerilmelerinin absorbansları deselülerize dokuda azalmıştır. Hibrit gruplar da ise bu piklerde bir artış gözüktüğü ve çapraz bağlama ile hidrojen bağlarının da oluştuğu söylenebilmektedir. Bununla beraber, PGH grubunda kolajen içerisindeki intermoleküler bağların olduğu ve bunun sonucunda CH simetrik (2922 cm^{-1}) ve asimetrik gerilimlerdeki (2855 cm^{-1}) pik yoğunluğu artmıştır [145].

4.3.3. Şisme ve Sol Fraksiyon Testi

Doğal dokunun deselülerize dokuya göre şişme davranışının daha az olduğu Bölüm 4.1.3.2.de su tutma kapasitesilerinden anlaşılmaktaydı. Buna sebep olarak menisküsü % 78 oranında kolajen içeriğine sahip olması ve bu kolajenlerin hizalanışı ile 3B iç içe geçmiş bir ağ yapısı oluşturmasıyla şişme davranışının kısıtlanması söylenmiştir. Deselülerizasyon prosesleri ile kolajen fiberlerdeki minör gevşeme dokunun şişmeye eğilimini de açıklamaktadır. Buradaki boşlukların jel yapılarıyla doldurulup UV ışık ile çapraz bağlanması ile doğal dokuya benzer bir 3B ağ yapısı sergilenmesi, kullanılan polimerlerin kolajen fiberler ile de hidrojen bağı oluşturması sonucu stabil yapıların şişme davranışlarında azalma eğilimi gözlenmiştir.

Şekil 4.35'de 24 saatlik şişme oranları ve hibrit yapılardın sol fraksiyon oranları verilmiştir.

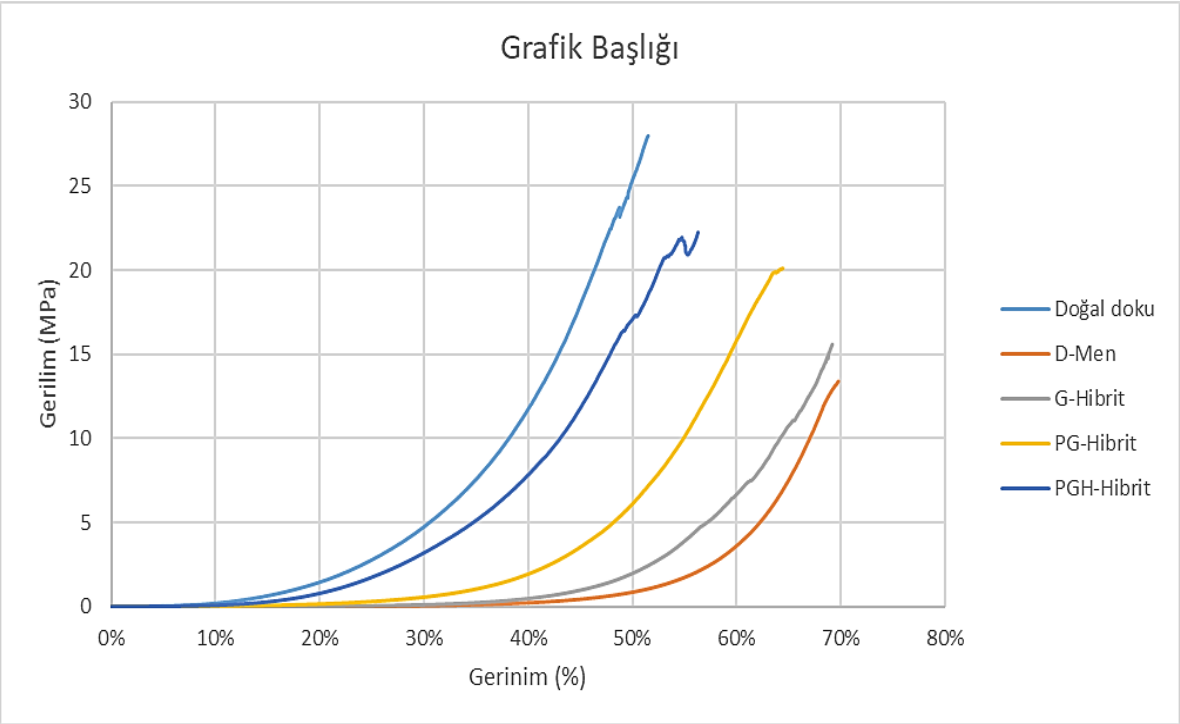


Şekil 4. 35. Hibrit aselüler iskelelerin (A) zamana bağlı olarak % şişme davranışlarını ve (B) % sol fraksiyonunu gösteren grafikler.

Deselülülerize menisküsün şişme oranının belirlenen zaman aralıklarında alınan ölçümler ile de artığı görülmektedir. Doğal menisküs dokusunun ise 12. Saatten sonra denge şişme oranına ulaşmış ve denge noktasını da sağlamıştır. G-hibrit grubu deselülerize (pozitif kontrol) iskeleye göre şişme davranışında azalış göstermesine rağmen doğal dokuya (negatif kontrol) 12. Saatten sonra da şişme eğilimi gözlenmiştir. 24. Saat sonunda doğal dokuda % 174,47 ± 11,6; deselülerize dokuda % 235,37 ± 6,4; G-Hibrit yapıda % 194,17 ± 7,41; PG-Hibrit yapıda % 176,81 ± 3,1 ve PGH-Hibrit grubunda % 166,7 ± 6,74 olarak bulunmuştur. Tukey çoklu karşılaştırma testi ile Anova analizi yapılmış ve doğal doku ile deselülerize doku arasında anlamlı derecede artış bulunmuştur ($p<0000.1$). Diğer gruplarda bir fark görülmemiştir. PG ve PGH hibrit iskeleler en düşük şişme davranışları ile çapraz bağlamanın efektifliğini kanıtlamış olup; sol fraksiyon oranları da çapraz bağlama derecesiyle düşmüştür. Serbest radikal polimerizasyon esnasında 3B ağ yapısının içinde reaksiyona girmemiş çift bağlar şişme sırasında salınarak başlangıç kütle kaybına neden olabilmektedir. Ağırlık fraksiyonundan hesaplanan sol fraksiyonu da buna bağlı olarak artma eğiliminde olmaktadır [146] .

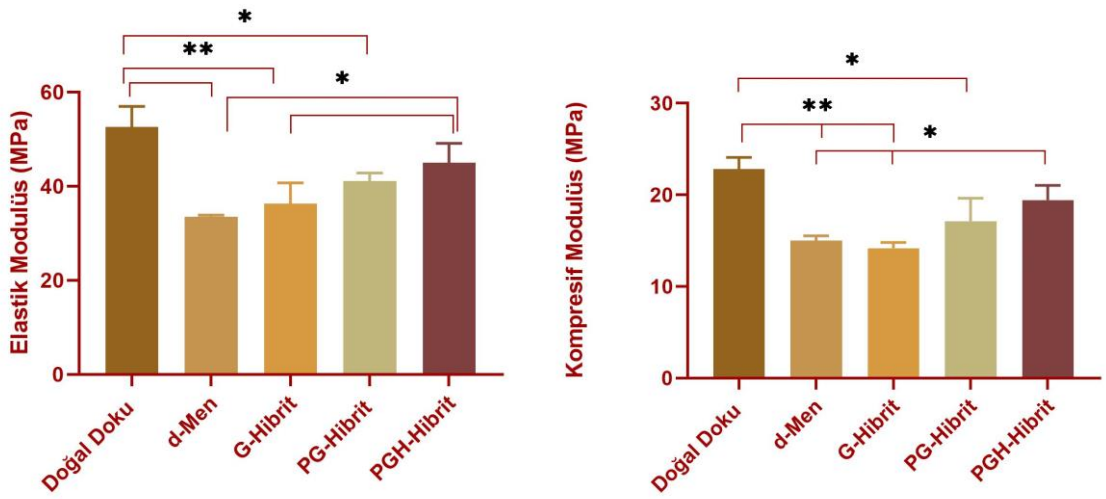
4.3.4. Mekanik Özelliklerinin Tayini

Yürüme sırasında ortalama pik kuvvetleri medyal menisküste 1200-2000 N civarlarında ölçülmektedir. Menisküs dokusu bu aksiyel yüklenmelerin %80'ini karşılayabilmektedir [147]. Günlük hayatta etki eden bu aksiyel yüklenme ile hibrit menisküs iskelelerinin mekanik özellikleri de 2 kN yük hücresi kullanılarak analiz edilmiştir. İşlem görmemiş ve deselülerize dokular da kontrol gruplar olarak analizde kullanılmıştır. Uygulanan kuvvet ve iskelelerin yer değişimlerinden oluşturulan gerilim-gerinim grafiğine Şekil 4.36'da yer verilmiştir.



Şekil 4. 36. Hiç işlem görmemiş, deselülerize ve hibrit yapıların gerilim-gerinim grafikleri.

İşlem görmemiş doku burada elastisitesi en yüksek negatif kontrol, deselülerize doku ise en düşük elastisite ile pozitif kontrol olarak belirlenmiştir. Doğal menisküse yakın bir mekanik dayanım sergileyen PGH-Hibrit grubu diğer kombinasyonlarına göre daha başarılı bir mekanik özellik göstermiştir. Hidrojellerde kullanılan polimer karışımlarının azaldıkça elastisitenin düştüğü gözlenmiştir. Grafiğin eğiminden elastik ve basma modülüslerine gidilmiş ve Anova Tukey karşılaştırma testi ile anlamlılık dereceleri hesaplanmıştır.



Şekil 4. 37. Hiç işlem görmemiş, deselülerize ve hibrit yapıların (A) Elastik modulüsleri ve (B) Kompresif modulüslerini gösteren histogram grafikleri. (*p<0.05)(**p<0.01).

Şekil 4.37'de verilen elastik ve basma modulüs değerlerinde her iki grafikte de doğal doku ile PGH-Hibrit arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). G-Hibrit ile deselülerize doku arasında da anlamlı bir fark bulunmazken elastik ve basma modulüsleri doğal dokuya göre azalmıştır (**p<0.01). PG-Hibrit ile PGH-Hibrit arasında anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen doğal dokuyu göre modulüslerinde azalma yaşanmıştır. Çizelge 4.5.de ortalama ± sd şeklinde sayısal değerler gözlenmektedir. Deselülerizasyon sonucu dokudaki GAG kaybına bağlı olarak gerçekleşen mekanik kayıp iskelelerin çapraz bağlanma verimini göstermiş ve doğal dokuya yakın değerlere ulaşılmaya çalışılmıştır. Burada hidrojellerin doku içindeki *in situ* polimerizasyon tarafından deselülerize iskelelere göre mekanik özellikleri geliştirilmiştir. Menisküs elastik modulüsü 10-120 MPa arasında türlere, analiz yöntemine, uygulanan kuvvete, hastalık durumlarına göre değişebilmektir [25, 148]. Zhang ve arkadaşları sağlıklı ve dejeneratif diz eklemleri çalışmasında menisküs dokusunun 20-23 MPa maximum basma dayanımın olduğunu göstermişlerdir [149]. Bulunan değerler litaratür ile paralellik gösterirken çalışmada yapılan şişme testi ile tutarlılık göstermiştir. Çapraz bağlama yoğunluğunun jelde kullanılan polimer karışımlarıyla artırabilmesinin yanında mekanik özelliklerini de pozitif olarak etkileyebildiği sonucuna varılmıştır. Hibrit gruplar arasında G-hibrit en düşük mekanik dayanım göstermesi tek başına menisküs dokusu için kullanımını sınırlandırmıştır. Bu

yüzden bu grup haricindeki PG-Hibrit ve PGH-Hibrit ile diğer analizlere devam edilmiştir.

Çizelge 4. 5. Doğal, deselülerize ve hibrit iskelelerinin elastik ve kompresif modulüslerinin ortalama değerleri

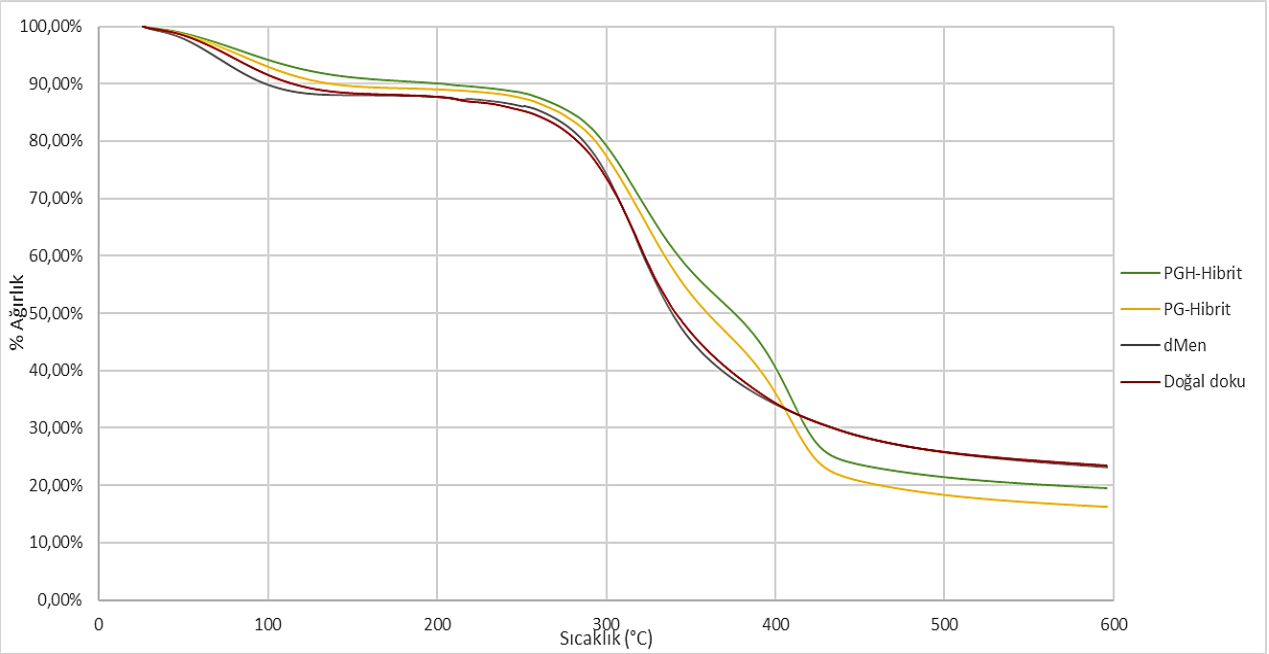
	Doğal Doku	d-Men	G-Hibrit	PG-Hibrit	PGH-Hibrit
Elastik Modulüs (MPa)	52,59 ± 3.18	33,45 ± 0,28	35,59 ± 3,6	41,8 ± 1,42	45,04 ± 3,12
Kompresif Modulüs (MPa)	22,8 ± 0.91	13,05 ± 0,46	14,58 ± 0,5	17,13 ± 2,05	19,43 ± 1,31
% Uzama	49,54	69,1	68,15	63,23	53,6

Flory-Rehner terorisine göre oluşturulan polimerin uygulanan kuvvet karşındaki davranışı çapraz bağlamanın molar yoğınluğu hakkında bilgi verebilmektedir [150]. Verilen denklem (Eşitlik 7.) çapraz bağlanan hibrit yapıların molar yoğunluğu şu değerlerde bulunmuştur; G-Hibrit grubunda 1875,81 ± 67,49 mol/m³, PG-Hibrit grubunda 2266,40 ± 271,25 mol/m³ ve PGH-Hibrit grubunda 2569,71 ± 173,85 mol/m³ ‘tür. Buradan GelMA polimerinin PEGDMA ile senkronizasyonunda gerek mekanik dayanımı gerek ise çapraz bağlama özelliklerinin artırılarak menisküs dokusuna benzer yapılar elde edilebileceği anlaşılmaktadır. Hidrojellerin ayarlanabilen bu özellikleri sayesinde ideal iskelelerin oluşturulmasında kullanılabileceği çapraz bağlanmış hibrit yapıların gösterdikleri mekanik iyileşmeler ile kanıtlanmıştır.

4.3.5. Termal Analiz

TGA (termogravimetrik analiz) malzemenin termal stabilitesi ve sabit oranda ısıtıldığında örnekte meydana gelen ağırlık değişimlerinin fraksiyonunu vermektedir. Oluşturulan hibrit yapıların termal değişimlerinin saptanması için analiz 25-600°C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık artışına bağlı olarak % kütle kayıpları

termal degredasyonun göstergesi olmuştur. Şekil 4.38'de grupların termogramları çakıştırılmıştır.



Şekil 4. 38. Hiç işlem görmemiş, deselülerize ve hibrit yapıların termogram grafikleri.

Çapraz bağlanmış grupların dekompozisyonunun hiç işlem görmemiş ve deselülerize dokuya göre nispeten daha yüksek sıcaklıklarda meydana geldiği grafikten görülmektedir. Absorblanan su moleküllerinin örneklerden uzaklaştırılması ilk bozunma fazı olan 25-120°C'de ilişkilendirilmiştir. Hiç işlem görmemiş dokudaki su kaybına bağlı olarak kütle kayıpları %10,44, deselülerize grubunda %11,59; PG-Hibrit grubunda % 8,98 ve PGH-Hibri grubunda % 7,43 oranında bulunmuştur. Hidrofilitesi yüksek biyopolimerlerin zincirlerine sıkıca bağlanan ve liyofilizasyon işleminde dahi malzemede hapsolabilen su kapasitesinde çapraz bağlanmayan iskelelerde daha fazla düşüş yaşanmıştır. Hidrojellerdeki polar gruplara suyun bağlanması sayesinde bu basamakta termal kararlılığı artırdığı söylenebilmektedir [151].

Çizelge 4. 6. Hiç işlem görmemiş, deselülerize ve hibrit grupların TGA termogramından elde edilen veriler.

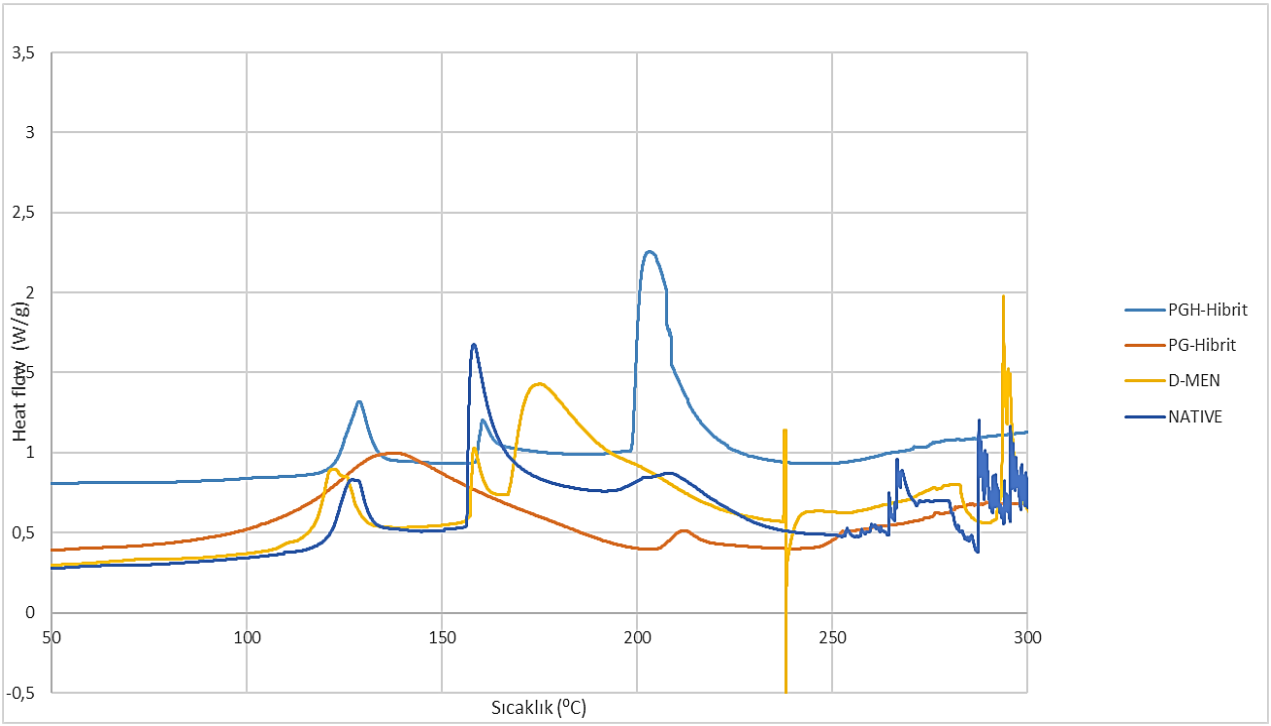
	Bozunma Başlangıcı (T_{start}) (°C)	**Dekompozisyon sıcaklığı (T_{onset}-T_{max}) (°C)**	**% 50 Ayrışma sıcaklığı (D_{half}) (°C)**	**Isıtma sonunda kalan kütle (%)**
İşlem görmemiş doku	26.28°C	**1.** 293.33° C **2.** 371.99° C	340.97° C	% 23.42° C
d-Men	26.83°C	**1.** 285. 62° C **2.** 368.32° C	338.79° C	% 23.05° C
PG-Hibrit	26.15° C	**1.** 291.65° C 2. 391° C 3. 412.34° C	359.79° C	%16.25° C
PGH-Hibrit	26.047° C	**1.** 294.92° C 2. 398° C **3..** 432.49° C	376.18° C	% 19.47° C

İkinci termal degredasyon fazının başlangıç sıcaklığı (T_{onset}) doğal ve deselülerize ECM ve ECM tabanlı hibrit malzemelerde genel olarak 285-294°C arasında görülmektedir. Doğal dokuda, kolajen, proteoglikan ve diğer proteinlerin miktarları deselülerize dokudan daha fazla olması ve kolajen triple helixte bulunan hidrojen bağları dolasıyla, dekompozisyon sıcaklığı nispeten deselülerize gruba göre yüksek olmuştur. Hibrit gruplar ise başlangıç sıcaklığında herhangi bir termal kararlılık göstermemiştir. Fakat örneklerin % 50'sinin termal degredasyona uğradığı sıcaklıklarda hiç işlem görmemiş ve deselülerize dokuların daha düşük sıcaklıklarda dekompozisyon yaşadığı ve 3. polimerin eklenmesi ile de bu sıcaklığın diğer hibrit yapıya göre yükseldiği bulunmuştur. Proteinlerin denatüre olduğu bu sıcaklıkların hibrit gruplar yüksek çıkması fiziksel ve kovalent bağlar ile termal stabilitelerini sağlayabildiğini kanıtlanmıştır.

PG ve PGH aselüler iskelelerde sırasıyla 391ºC ve 398ºC sıcaklık değerlerinde ikinci bir bozunma yaşandığı grafikten anlaşılmaktadır. Bu fazın hibrit gruplarda bulunan ECM proteinlerinin termal degradasyonu ile ilişkilendilmiş olup, hidrojellerin dokuya emdirilmesi sonucu kovalent çapraz bağlamanının triple helix yapılarını güçlendirerek daha yüksek sıcaklıklarda yıkımı ile sonuçlanmıştır. Max. Bozunma sıcaklığı (T_{max}) hibrit gruplarda kontrol ve deselülerize menisküs iskelelerine göre yüksek sıcaklıklara kaymıştır. ECM yapısına entegre olan hidrojellerin dekompozisyonu PG ve PGH Hibrit yapılar için 412.34ºC ve 432.49 ºC sıcaklık değerlerinde olmuştur. Literatürdeki GelMA destekli hidrojellerin max. bozunma sıcaklıkları 417ºC civarlarında bulunarak bulunan değerler örtüşmektedir [152]. Buradan fotopolimerizasyon sonucu dekompozisyon fazındaki termal kararlılığın sağlandığı görülmektedir. HAMA polimerinin eklenmesi ile GelMA'nın fonsiyonelleşmemiş lizin grupları ile HAMA'nın anyonik grupları arasında elektrostatik etkileşimler gelişimi doğrultusunda PG-Hibrit gruba göre termal stabiliteyi geliştirmiştir [153].

DSC analizi ile kuru örneklerin denatürasyon sıcaklıklarını gösteren grafikler karşılaştırmalı olarak Şekil 4.39'da verilmiştir. PGH-Hibrit grubunda 131ºC, PG-Hibrit grubunda 139ºC , doğal dokuda 129ºC ve deselülerize dokuda 121°C'de görülen ekzotermik geçişlerin kolajen molekülünün stabilizasyonu sağlayan ^{1}H-bağlı suyun salınmasıyla ilişkilendirilmiştir. Literatürde de kuru kolajen yapılarında 120-150ºC derecelerde görülen geniş pikte triple helix yapısının denatürasyonu ve bağlı su moleküllerinin evaporasyonu gözlenmiştir [154]. Evaporasyon sıcaklıklarının daha yüksek değerlere kaymasıyla kolajen fiberler arasında enkapsüle hidrojellerin stabiliteyi artırdığı anlaşılmaktadır. Deselülerize dokuda ise proteoglikan ve diğer yapısal olmayan proteinlerin azalmasından dolayı düşük sıcaklıklarda denatürasyon gözükmektedir. 150-170 ºC arasında ikinci gözüken piklerin kolajenin üçlü halkasal yapıdan random sarmala dönüşümünü gösterir ve konformasyonal değişikliklerin başladığının göstergesi olarak kabul edilir. D-MEN grubunda 156ºC'de başlayan bu değişiklik doğal dokuda 159ºC ve PGH grubunda 163ºC' de olmuştur. PG hibrit grubunda bu pik gözlenmemiştir. Grafikte gözlemlenen 3. Geçiş protein denatürasyonu ve kolajen kristtaleşmesi ile ilişkilendirilmiştir. Kuru kolajen molekülünde de 200°C civarlarında görülen bu geçiş tez çalışmasında 200- 215°C değerleri arasında bulunmuştur. Doğal dokuda 211ºC iken deselülerize dokuda 177ºC deki 3. Geçiş deselülerizasyon sonucu termal özeliklerindeki

düşüşü göstermiştir. UV ile çapraz bağlanmış gruplarda ise PGH ve PG için sırsıyla 205 ºC ve 210ºC sıcaklıklarında protein denatürasyonunun başlangıcı olmuştur. Bu sıcaklıkların doğal dokuya yakın oluşu ve deselülerize dokuya göre yüksek sıcaklıklara kayması termal dayanımının artırdığını kanıtlamıştır. Çapraz bağlanmış kolajen fiberlerin denatürasyon sıcaklıklarında literatürde de artış gözlenmiş ve analiz sonuçları literatür ile de uyum göstermektedir [155].

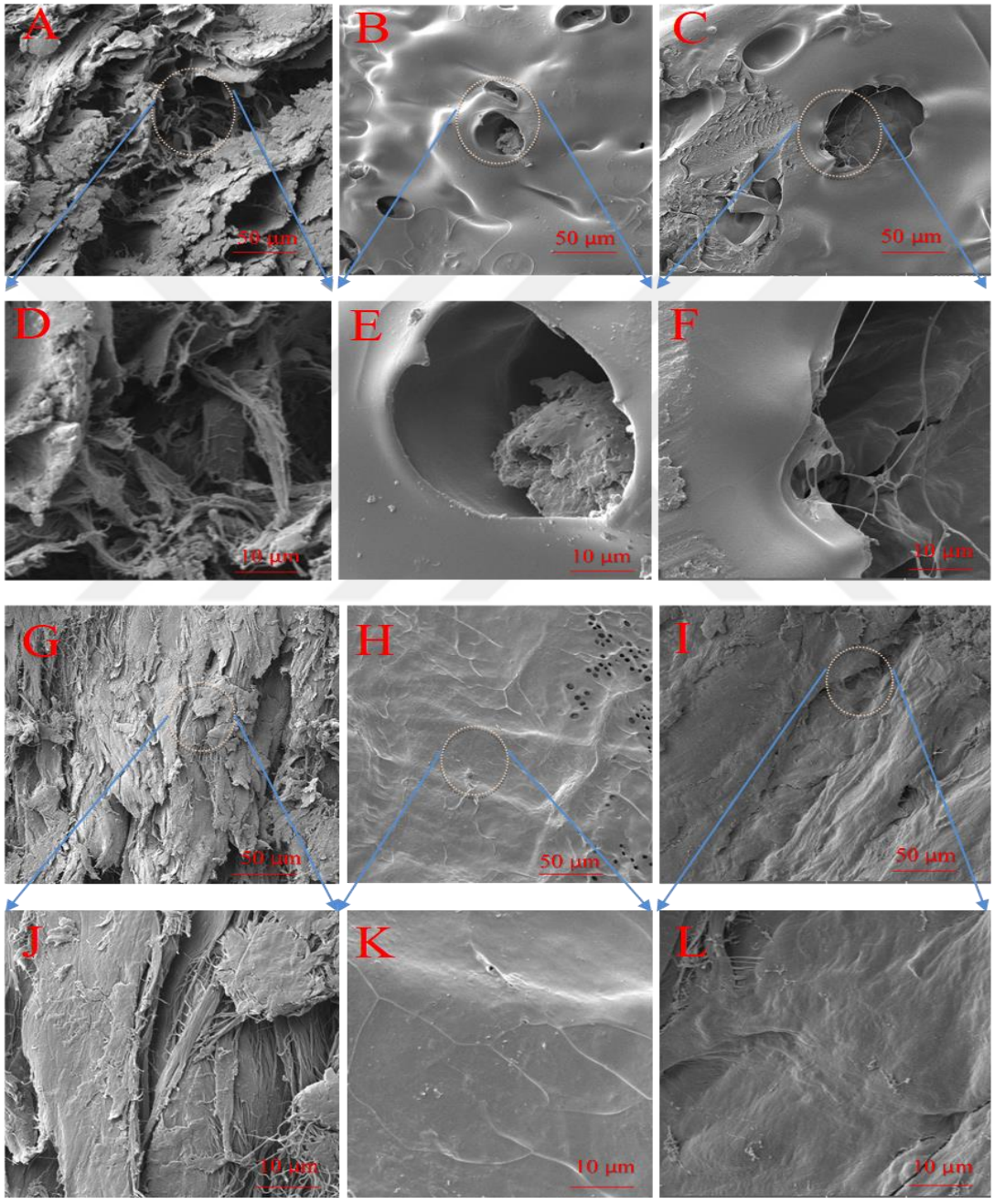


Şekil 4. 39. Hiç işlem görmemiş, deselülerize ve hibrit yapıların sıcaklığa bağlı ısı akış grafikleri.

Sonuçlar TGA analizi ile de örtüşmekte olup deselülerize iskelelerin çapraz bağlanması ile termal davranışlarının değiştirilebileceğini kanıtlamıştır. PGH ve PG hibrit gruplarındaki termal karakteristik özellikler hemen hemen aynı olmuştur. Menisküs dokusu içerisinde 3B ağ sistemi oluşturan hidrojeller ile kolajen fiberlerin fiziksel olarak da birbirine bağlanması iç içe geçmiş yapılar oluşturarak güçlü hibrit yapılar sergilenmesini sağlamıştır.

4.3.6. Taramalı Elektron Mikroskobi (SEM) Analizi

Deselülerize iskeleler içinde hapsolan jellerin kolajen fiberler arasındaki dağılımı ve çapraz bağlama sonucu dokudaki ultrayapının görüntülenmesinde SEM analizi kullanılmıştır. Deselülerize ve hibrit iskelelerin enine (crossover) ve boyuna kesitlerinin SEM görüntüleri 4.40'ta verilmiştir.



Şekil 4. 40. Deselülerize dokunun 1 kX ve 5 kX 'deki enine kesitlerinin (A, D); PGH-Hibrit grubunun 1 kX VE 5 kX'deki enine kesitlerinin (B, E); PG-Hibrit grubunun 1 kX ve 5 kX'deki enine kesitlerinin (C, F); deselülerize dokunun 1 kX ve 5 kX'deki boyuna kesitlerinin (G, J);

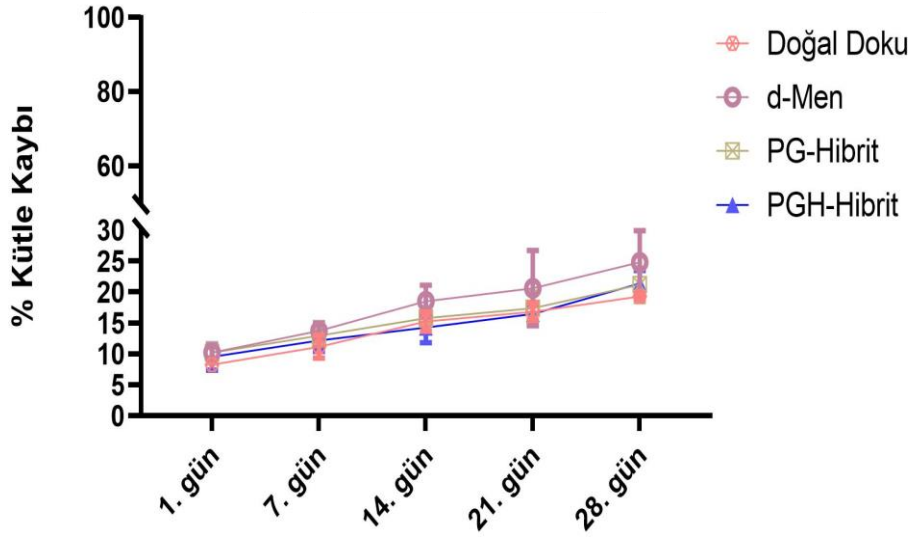
PGH-Hibrit grubunun 1 kX ve 5 kX'deki boyuna kesitlerinin (H, K); PG-Hibrit grubunun 1 kX ve 5 kX'deki boyuna kesitlerinin (I, L) SEM görüntüleri.

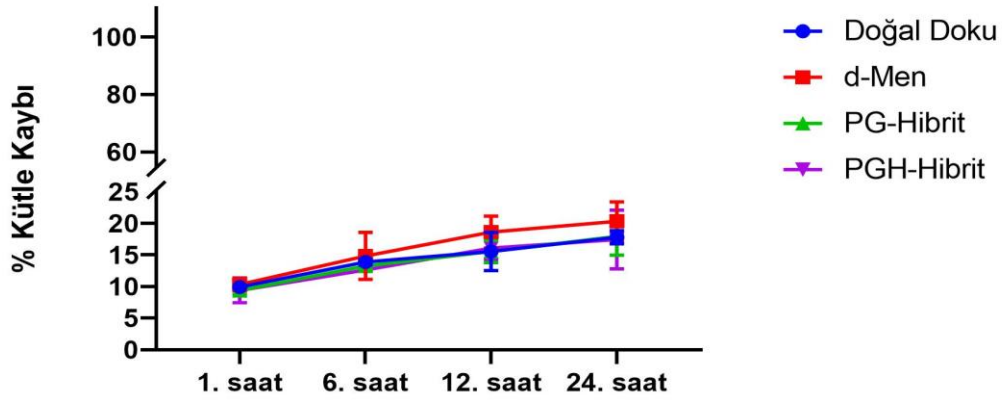
Deselülerize menisküs dokusundan alınan enine alınan kesitlerdeki çevresel fiberlerin arasındaki boşluklar yapıları (A) ve (D) figüründe görülmektedir. Hidrojel sistemi emdirelerek çapraz bağlanan hibrit iskelerdeki bu boşukların dolduğu ve hidrojeller sayesinde smooth (pürüzsüz) bir yapı ortaya çıktığı (B), (C), (E), (F) görüntülerden anlaşılmaktadır. (E) ve (F) şıklarında bulunana mikroporlar içinde kolajen demetlerini saran bir hidrojel tabakası olduğu ve bunun sonucunda enkapsülasyonun verimli bir derecede sağlandığı söylenebilmektedir. (G; L)'ye giden figürler sirkümferansiyel fiber demetlerinin hizalanışının gösterilmesi amacıyla dokunun iç kısımlarından alınmıştır. Deselülerizasyon sonrasındaki kolajen oryantasyonunun değişmediği Bölüm 4.1.3.3'de tartışılmıştır. Çevrimsel hizalanan fiberlerdeki minör gevşemeler (H), (I), (K) ve (L) şıklarından anlaşılacağı üzere hidrojellerin emilmesini ve enkapsülasyonuna izin vermiştir. Fibril demetlerinin hizalanışı hidrojel tabakasının altındaki çıkıntılardan (H; L) anlaşılmaktadır. Her iki hibrit grupta da yüzey morfolojilerinde bir farklılık görülmüş ve FTIR analizindeki kimyasal analiz ile yapısal farklılık desteklenmiştir. Ayrıca, iç kısmlardan alınan bu kesitler hidrojellerin sadece yüzeyde değil dokunun iç kısımlarına da ulaştığı ve burada da pürüzsüz bir tabaka yarattığı bu analiz ile kanıtlanmıştır.

4.3.7. PBS ve Enzimatik Degredasyon Analizi

Doku mühendisliğinde bir biyomalzenin başarısını degradasyon hızı büyük oranda etkilemektedir. İskelelerin bozunma hızı çok yüksek olduğunda hücrelerin kendi ECM'ini örmesine kadar iskelenin destekleyememesine, düşük olduğundan malzemenin yabancı cisim rekasiyonu sonucunda inflamasyona yol açmasına neden olmaktadır [156]. Bu yüzden biyomalzemenin trasplante edileceği lokasyona göre degradasyon hızları polimer konsantrasyonu, çapraz bağlama yoğunluğu gibi parametreler ile kontrol edilebilmektedir. Şekil 4.41'de PBS ve enzimatik (kolajenaz A) solüsyonları içinde zamana bağlı olarak gerçekleşen % kütle kayıpları verilmiştir. PBS degradasyonu 4 haftalık sürede gerçekleşmiş olup bozunma hızları analiz sonunda doğal dokuda % 19.29 ± 0.34, deseülerize dokuda % 26 ± 3.2, PG-Hibrit grubunda % 21,41 ± 2,2 ve PGH-Hibrit grubunda da 21,18 ± 1,6 olarak bulunmuştur. Enzimatik degradasyon

vücut içinde bulunan, kolajen ve diğer protein degradasyonlarından sorumlu matriks metallaproteinazların (MMP) türü olan kollajenaz enzimi ile taklit edilmiştir. 24 saatlik enzimatik degradasyon sonucunda doğal dokuda %17,82 ± 0,84 , deselülerize iskelede %20,34 ± 2,49 , PG-Hibrit grubunda %17,95 ± 2,41 ve PGH-Hibrit grubunda %17,12 ± 3,7 olan bozunma hızları hesaplanmıştır. Verilerden deselülerize matrisin degradasyon hızı diğer gruplara göre daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Deselülerize yapının çapraz bağlanması ile degradasyon hızını düşürerek ayarlayabildiği ve doğal dokuya benzer degradasyon oranı gösterdiği görülmüştür. Menisküs dokusunun tamiri için kullanılan biyomalzemelerde degradasyon hızının uzun olması beklenmektedir [157]. Tez çalışmasında kullanılan GelMA destekli hidrojel yapılarının da degradasyonu hızı PEGDMA ve HAMA'nın senkronizasyonuyla kontrol edilmiş ve oluşturulan 3B ağ yapısının sıkı paketlenmiş kolajen fiberler arasında stabil olmasını sağlamıştır.

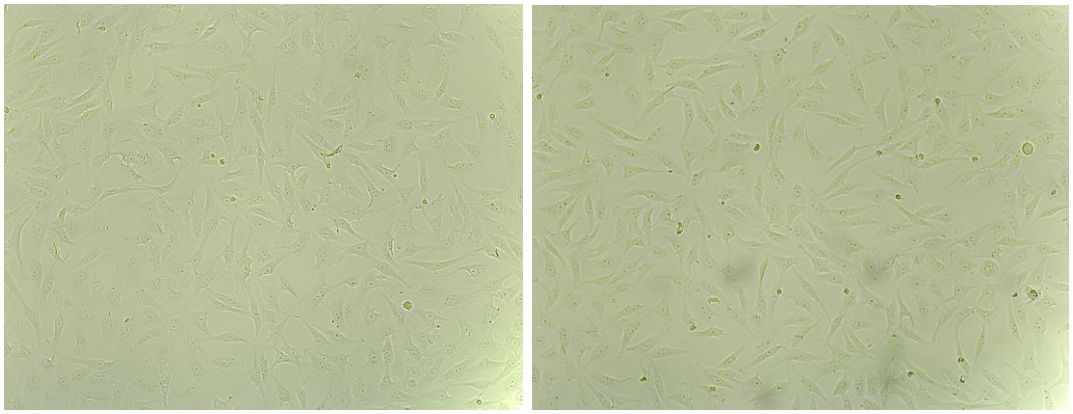




Şekil 4. 41. Hiç işlem görmemiş, deselülerize ve hibrit yapıların (A) PBS içinde ve (B) enzimatik solüsyon içinde zamana bağlı olarak % degradasyonunu gösteren grafikler.

4.3.8. *In Vitro* Çalışmalar

Oluşturulan deselülerize ve hibrit iskelelerinin vücut içinde kullanımına uygunluğu için biyouyumluluk çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sitotoksisite analizleri yapılan örneklerde hücre canlılığı hesaplanmış ve gruplar arasındaki farklar tartışılmıştır. L929 fare fibroblast hücresinin 9. pasajı (P9) kullanılmıştır. P9 L929 hücreleri ekim için konfluens olana kadar T75 flasklarda kültüre edilmiştir. Şekil 4.42'de L929 hücrelerinin ekim öncesindeki konfluens durumunun ışık mikroskobisindeki görüntüleri verilmiştir.

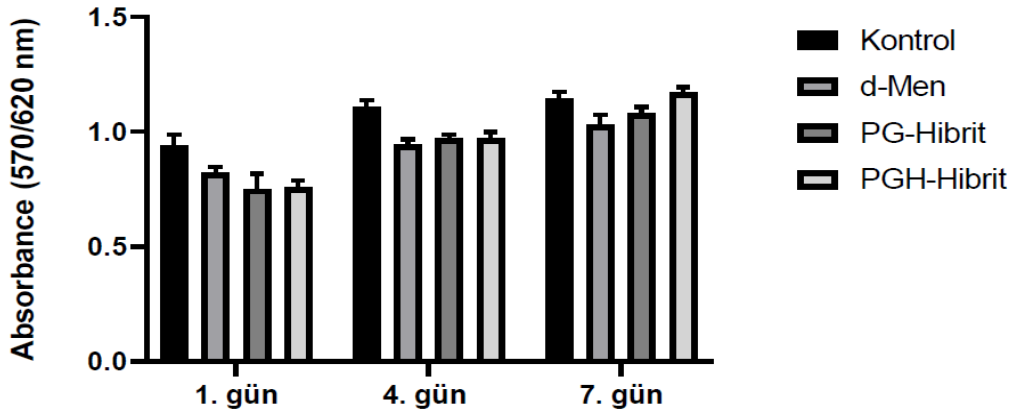


Şekil 4. 42. L929 hücrelerinin P9 pasajındaki 2 gün sonundaki flask üzerindeki görünümleri.

4.3.8.1. Alamar Mavisi Testi

Alamar mavisi testi ile deselülerize ve hibrit iskeleler üzerinde 1., 4. ve 7. günlerde hücre proliferasyonuna bakılmıştır. Şekil 4.43'te verilen histogram grafiğinde iki yönlü Anova analizi yapılmış ve anlamlılık dereceleri üzerinden tartışmalar yapılmıştır. L929 hücre proliferasyonunun tüm gruplarda 7. güne kadar yükseldiği gözükmektedir. 1. gün verilerine kıyasla tüm gruplarda 4. ve 7. günde hücre proliferasyonunda artış gözlenmiştir. 1. Günün verilerinde hücre canlılığı kontrol grubu % 100 alındığında tüm gruplarda % 75 üzeri olmuştur. 1. gündeki kontrol grubu baz alındığında Anova çok yönlü karşılaştırma analizinde gruplarda anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0000.1$). 4. günde de yine kontrol grubuna göre anlamlılık dereceleri düşerek 7. günde kontrol, PG ve PGH arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Deselülerize iskeleler ise %90 üstü canlılığına rağmen hibrit gruplardaki canlılığa erişememiştir. Tüm gruplarda 1. ve 4. günkü absorbanslarında anlamlı bir artış bulunmuştur ($p<0.0001$). 4. ve 7. günde kontrol grubunda anlamlı bir fark görülmezken d-MEN, PG-Hibrit ve PGH-Hibrit gruplarında anlamlı artış tespit edilmiştir ($p<00.1$)($p<0.0001$) ($p<0.0001$).

Deselülerize gruba göre hibrit iskelelerdeki proliferasyon hızı daha fazla olmuş ve bunun sebebi olarak da GelMA ve HAMA polimerlerinin entegrasyonu gösterilmiştir. GelMA'nın RGD sekanslarından dolayı hücre canlılığını pozitif olarak etkilediği literatürden bilinmektedir [158]. HAMA polimeri de burada hücre tutunması ve yayılımını regüle ederek proliferasyonu artırmış ve PG-hibrit eşleniğine göre daha fazla hücre canlılığına sahip olmuştur. Menisküs doku mühendisliğinde de sıkça kullanılan hyaluronik asit kullanımı ile doğal mikroçevrenin mimik edilmesi sonucu rejenerasyonun da sağlandığı rapor edilmiştir [61]. Hyaluronik asidin hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu hızlandırmasıyla ECM komponentlerinin ekspresyonlarını artırdığı ve bunun sonucunda meniskal lezyonlarda hızlı bir şekilde yara iyileşmesinde kullanılmasının umut vaat ettiği bildirilmiştir [159]. Menisküs dokusunun pepsin içinde çözdürülerek hazırlanan ECM çözeltisinin GelMA polimeri ile birleştirilmesi ile oluşan hidrojellerin hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında etkin oldukları bildirilmiştir [160]. Buradan yola çıkarak intakt aselüler menisküs iskelesine emdirelen pre-jelin de hücreler üzerinde pozitif etkisi görülmüş ve ileriki çalışmalarda kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4. 43. Alamar Mavisi Analizinin 1., 4. Ve 7. günlerinin gruplardaki absorbans değerlerinin gösteren histogram grafiği.

Kontrol grubundaki 4. günden itibaren proliferasyon hızının daha düşük olmasının sebebi olarak kültür kabındaki hücreler için yüzey alanının küçük olması ileri sürülmüştür. Yüzey alanı/hacim artıkça hücrelerin yayılımı ve proliferasyonu daha hızlı olmaktadır. Kültür kabına göre çalışma grupları 3B yapıları sayesinde, yüzey alanlarının artırılmasından dolayı, hücre canlılığındaki verimini göstermiştir.

Deselülerize menisküs iskelerinin stabilitilerinin sağlanmasında çeşitli ajanlar kullanılmaktadır. Kimyasal çapraz bağlayıcı ajanları fiziksel ve mekaniksel özelliklerinin geliştirse de biyouyumluluklarında limitatasyonlar görülebilmektedir. Deselülerize menisküs iskelelesinin gluteraldehit gibi kimyasal ajanlar kullanarak çapraz bağlanabildiği fakat kimyasal çapraz bağlayıcının hücre canlılığın azaltıp ilerleyen kültür günlerinde toksisiteye sebep olduğu raporlanmıştır [161]. Bu çalışma da ise çevresel olarak zararlı olmaması ve kimyasal toksik ajanların kullanmaması gibi fotopolimerizasyonun avantajları sayesinde sınırlı biyouyumluluğa sahip olmayan çapraz bağlanmış doku iskeleleri üretilmiştir.

5. YORUM

Sunulan tez çalışmasında, menisküs dokusu hücresizleştirilerek kolajen organizyonunu ve yapısını koruyabilen destek biyomalzeme oluşturulmuş olup, bu yapının jel sistemiyle entegrasyonu ve ardından UV ışık altında çapraz bağlanması ile hibrit doku iskeleleri başarılı bir biçimde sentezlenmiştir.

- ✓ Menisküs deselülerizasyonu için 2 farklı metot uygulanmış ve karşılaştırılması yapılmıştır. Konvansiyonel metot olan fiziksel, kimyasal ve enzimatik muamelelerin kombinasyonuyla gerçekleştirilmiş; $scCO_2$ teknolojisi ise menisküs dokusu için özgün bir metot olarak ön işlemler yardımı ile uygulanmıştır.

- ✓ Konvansiyonel deselülerizasyondaki protokollerde dondurma çözme çevrimleri ve ozmotik şok ile fiziksel ajitasyon, tripsin enzimi yardımıyla penetrasyon sağlanması, SDS kimyasal ajanının konsantrasyonlarının ayarlanması incelenemiştir. Fiziksel ajitasyon sonrası tripsin enzimi ile etkinleştirilerek % 0,5 (a/h) gibi düşük konsantrasyonda SDS kullanımını içeren kimyasal ajitasyonun yapılması H&E ve DAPI boyamalarında hücre çekirdeklerinin tamamen uzaklaşması ile optimum protokol olarak belirlenmiştir.

- ✓ H&E ve DAPI boyamalarında yanı zamanda ECM bütünlüğünü de bakılmış ve doğal doku ile kıyaslandığında konvansiyonel deselülerize dokunun histoyapısını koruduğu gözlenmiştir. Diğer histolojik çalışmalarda Masson Trichrome ve Safranin-O boyamaları ile deselülerizasyon prosesi sonucu kolajen fiberler ve proteoglikanlar görüntülenmiştir. ECM bütünlüğünü koruyan konvansiyonel deselülerize grupta kolajen fiber yapılarında kontrol dokuya göre bir farklılık görülmemiştir. Enzimatik ve kimyasal ajitasyonun dokudaki proteoglikanların yoğunluğunu azalttığı ama genel olarak dokuda kalan proteoglikanların varlığı Safranin-O boyaması ile tayin edilmiştir.

- ✓ Kalitatif analizlerin yanı sıra kantitatif analizler de yapılarak deselülerizasyon verimine bakılmıştır. Hücresizleştirme proseslerinin kabul kriterlerinden biri genomik DNA'nın 50 ng altında olmasıdır. Picogreen analizi ile kontrol gruba

göre konvansiyonel deselülerize grupta anlamlı bir derecede ($p<0.0001$) DNA azalması 207,52 ± 6,64 ng'dan 36,99 ± 2,04 ng'a düşmüştür. % 82 bir azalma ile menisküs dokusunun başarılı bir biçimde hücresizleştirildiği belirlenmiştir.

- ✓ Hidroksiprolin ve DMMB analizinde kontrol dokuya göre kolajen ve GAG miktarlarındaki azalış tespit edilmiştir. Buna göre, kontrol dokuda 0,071 ± 0,01 mg kolajen bulunurken deslülerize menisküste 0,102 ± 0,001 mg kolajen miktarı bulunarak kullanılan deselülerizasyon prosesinin kolajen yıkımına sebebiyet vermediği kanıtlanmıştır. Kontrol grubundaki 0,742 ± 0,047 µg GAG deselülerizasyon sonrası 0,432 ± 0,127 µg GAG ile anlamlı derecede ($p<0.05$) azalma göstermiştir.

- ✓ $ScCO_2$ muamelesi ile yapılan deselülerizasyonda ise 4500 psi basınç ve 37°C sıcaklıkta 1 saat yapılan proses fiziksel ajitasyon ve tripsin enziminin yardımıyla kompakt dokuda verimli bulunmuştur. H&E ve DAPI boyamalarında hücre çekirdeklerinin tamamıyla uzaklaştığı ve ECM yapısının korunduğu görülmüştür.

- ✓ Kolajen boyamasında deselülerizasyon sonrası kontrol grubuna göre bir değişiklik saptanmazken; Safranin-O boyamasında proteoglikanların prosesten etkilenerek uzaklaştığı saptanmıştır.

- ✓ $ScCO_2$ deselülerize grubun biyokimyasal analizinde; genomik DNA miktarı 42,53 ± 4,18 ng bulunarak kontrole göre %79.3 oranında anlamlı derecede ($p<0.0001$) azalma gerçekleşmiştir. 0,072 ± 0,005 mg kolajen miktarı bulunan scCO deselülerize grubun kontrol ile aralarında bir fark bulunmamıştır. Fakat 0,312 ± 0,073 µg GAG miktarı ile % 58 azalma yaşamıştır. Intakt olarak $scCO_2$ teknolojisi ile deselülerize edilen dokunun iç bölgelerinde küçülme yaşadığı proses sonucu gerçekleşmiştir. İç bölgelerde daha fazla olan proteglikanların da buna bağlı olarak konvansiyonel gruba göre daha fazla GAG azalması yaşadığı yorumuna varılmıştır.

- ✓ Konvansiyonel deselülerize menisküste % 3'lük bir yaş ağırlık kaybı $scCO_2$ deselülerize menisküste % 32'lik yaş ağırlık kaybına yükselmiştir. Kuru

ağırlıklarında da her iki grupta da bir kayıp gözükmüştür. Bunun sonucunda su tutma kapasitelerinde her iki metot içinde ufak bir artış gözükmüştür.

- ✓ Heterojenik kolajen hizalanması gösteren menisküs dokusunun deselülerizasyon öncesi ve sonrasındaki taramalı elektron miktoskobisi görüntülerinde her iki deselülrizasyon yöntemin de sıkıca paketlenmiş fiberlerin gevşemesine yol açtığı söylenebilmektedir. Kontrol dokuya göre mikro boşlukların oluşumu $scCO_2$ deselülerizasyonunda daha fazla gözlenmiştir. Bunların dışında, hücresizleştirme işlemi ile intakt dokuya benzer şekilde kolajen fibrillerin 3B yapısının korunduğu ve organizasyonunun sürdürüldüğü beşirlenmiştir.

- ✓ Anizotropik mekanik özellik sergileyen menisküs için 22 MPa civarlarında basma modülüsü bulunurken; konvansiyonel deselülerize grupta 15 MPa ve scCO deselülerize grupta 14 MPa civarları basma modulüsü tayin edilmiştir. Gerilim-gerinim grafiğinden konvansiyonel deselülerize grubun mekanik dayanımı daha iyi çıkmıştır. Bu da $scCO_2$ grubundaki daha fazla düşen GAG miktarı ile ilişkilendirilmiştir.

- ✓ Elüsyon metodu ile yapılan sitotoksisite testinde her iki deselülerizasyon yönteminde de % 75 üzeri hücre canlılığı bulunmuş ve deselülerize dokuların biyolojik aktifliği kanıtlanmıştır.

- ✓ Menisküsün intakt deselülerizasyonu için her iki yöntem de başarılı bulunmuştur. Ortalama 10 gün olan deselülerizasyon prosesi $scCO_2$ teknolojisi ile 8 güne indirilmiştir. Yığın dokunun deselülerizasyonu için ön işlemlerin kimyasal muamele sürelerini düşürdüğü ayrıca kimyasal deselülerizasyona göre yeşil çözücü olan süperkritik karbondioksit ile de aselüler dokuların üretilebildiği sonucuna varılmıştır.

- ✓ Tez çalışmasının ikinci bölümünde GelMA sentezi yapılmış ve HNMR analizi ile metakrilasyon derecesi % 75 olarak hesaplanmıştır. Methacryloyl gruplarına ait yeni proton pikleri 5.6 ppm, 5.34 ppm ve 1.93 ppm olarak bulunmuş ve bu da jelatinin fonksiyonelleştiğini göstermiştir. GelMA destekli hidrojellerin

fotopolimerizasyon ile oluşturulmasında LAP ve I2959 fotobaşlatıcıları denenmiştir.

- ✓ LAP foto başalatıcısı kullanılarak 300 saniyede katı jel oluşumu gözlenirken I2959 ile maruz kalma süresi 600 saniyeye yükselmiştir. UV spektrofotometre ile 365 nm dalga boyunda gösterdikleri absorbans değerleri analiz edilen her iki foto başlatıcıda LAP molekülünün daha fazla ışığı absorbe ettiği bulunmuştur. Molar sönümleme katsayıları absorbans - foto başlatıcı konsantrasyon grafiğinden I2959 ve LAP için sırasıyla 4,7 1/M.cm ve 231,3 1/M.cm olarak bulunmuştur. Bu sebeple LAP fotobaşlatıcısı daha fazla serbest radikal üreterek daha hızlı in situ çapraz bağlanmayı sağlamıştır.

- ✓ GelMA ve PEGDMA polimerleri 1:1 oranında karıştırılarak hem LAP hem de I2959 foto başlatıcıları ile denenmiş ve HAMA'nın olduğu karışım sadece LAP foto başlatıcısı ile oluşturulmuştur. Sentezlene hidrojellerin şişme ve sol fraksiyon analizler ile G-I ve G-LAP en yüksek şişme oranlarına sahip olduğu, PGH-LAP ise en düşük şişme oranı gösterdiği belirlenmiştir. Sol fraksiyon ile G-I ve G-LAP hidrojellerinin çapraz bağlanmamış monomerlerin daha fazla olduğu ve çapraz bağlama yoğunluğunun da düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

- ✓ Hidrojellerin gerilim-gerinim grafiğinde en fazla dayanımı PGH-LAP grubu sergilemiş ve 0,753 MPa basma modulüsü göstermiştir. GelMA'nın I2959 ve LAP hidrojelinde 0,061 ve 0,08 MPa civarları seyredilirken; PEGDMA senkronizasyonu ile bu değerler 0,417 ve 0,416 MPa kadar 5-6 kat artmıştır. Bu da hidrojellerin polimer oranları değiştirilerek ayarlanabilen mekanik özelliklere sahip olabileceğini kanıtlamıştır.

- ✓ Hidrojellerin kimyasal yapılarına FTIR ile incelendiğinde jelatin bazlı hidrojellerde kolajenden gelen spesifik piklerin GelMA ve hibrit yapılarından da gözlendiği görülmüştür. Pegdma'nın yapıya eklenmesiyle 1101 cm^{-1}'deki pik ve HAMA polimerinin entegrasyonu 856 ve 950 cm^{-1}'deki pikler ile de yapıya katıldıklarını belirlenmiştir.

- ✓ Aselüler menisküs iskelesinin çapraz bağlama efektifliğini incelemek için dokudan 5 mm genişlik, 6 mm yüksekliğinde yapılar alınmış ve prepolimer içerisinde 4 saat sonikasyon ve ardından1 gece inkübasyonu sonucunda jelin dokuda enkapsüle olduğu morfolojik, şişme ve sol fraksiyon analizleri ile belirlenmiştir.

- ✓ G-Hibrit, PG-Hibrit ve PGH-Hibrit yapıların arkalı önlü 810 μJ/cm^2 UV ışıkta çapraz bağlanması sonucunda iskele boyutlarında bir değişim yaşanmadığı morfolojik olarak görülmüştür.

- ✓ Kimyasal yapıdaki değişikliklerin saptanmasında FTIR analizinden yararlanılmıştır. GelMA ve destekli hidrojellerinde de bulunan kolajenin karakteristik pikleri hibrit yapılarda da görülmüştür. Fotp çapraz bağlamanın kolajen fiberleri arasında da sağlandığı 1155 cm^{-1} pikin doğal ve deselülerize dokunun grafiğine göre hibrit gruplarda absorbansının azalmasıyla görülmüştür. PEGDMA polimerinin eklenmesi ile 1011 cm^{-1} ve HAMA polimerinin katılımı ile 1030 cm^{-1} ve 950 cm^{-1}'deki piklerin görülmesi hidrojellerin deselülerize yapı içerisinde başarılı bir şekilde entegre olduğuna ışık tutmuştur.

- ✓ Şişme testinde 24 saat sonunda deselülerize iskele % 205 oranı ile en fazla şişen grup olurken; % 165,7 şişme oranı gösteren PGH-Hibrit en az şişen grup olmuştur. İşlem görmemiş doku % 178, PG-hibrit % 176 ve G-hibrit % 186 şişme oranlarına sahip olmuştur. Çapraz bağlanan iskelelerin sol fraksiyonuna bakıldığında PGH-Hibrit grubunda en az ağırlık kaybı (%10) gözlenmiştir.

- ✓ 2kN yük hücresi ile tüm gruplara basma analizi yapılmış ve basma modülüslerinden molar çapraz bağlama yoğunluklarına gidilmiştir. İşlem görmemiş doku 22,8 ± 0,91 MPa, deselülerize doku 13,05 ± 0,46 MPa, G-Hibrit 14,58 ± 0,5 MPa, PG-Hibrit 17,3 ± 2,05 MPa ve PGH-Hibrit de 19,43 ± 1,31 MPa kompresif modülüsleri bulunmuştur. Buradan G, PG ve PGH Hibrit yapıların çapraz bağlama yoğunlukları sırasıyla 1875,81 ± 67,49 mol/m^3, 2266,40 ± 271,25 mol/m^3 ve 2569,71 ± 173,85 mol/m^3 olarak hesaplanmıştır. Gerilim-gerinim grafiğinin eğiminden elastik modülüsleri 35,59 ± 3,6 MPa (G-

Hibrit), 41,8 ± 1,42 MPa (PG-Hibrit),45,04 ± 3,12 MPa (PGH-Hibrit) olan çapraz bağlanmış yapıların mekanik dayanımı geliştirdikleri görülmüştür.

- ✓ TGA analizinde iskelelerin dekompozisyon sıcaklıklarına ve termal degredasyonlarına bakılmıştır. 25-120°C arasında koljen fiberler arasında bağlı su moleküllerinin uzaklaştırılması ile ilişkilendirilen ağırlık kayıpları yaşanmıştır. ECM yapısının bozunma başlangıcı olarak d-Men grubunda 285°C, doğal dokuda 293 °C , PG hibritte 291,65 °C ve PGH hibritte 294,92 °C bulunmuştur. Doğal ve deselülerize dokulardan farklı olarak hibrit yapılarda 3 basamaklı bir bozunma olmuş ve bu da hidrojellerin entegrasyonuyla max bozunma sıcaklıklarının yükselmesini sağlamıştır. D-MEN ve doğal doku için 368°C ve 371°C olan maximum bozunma PG ve PGH hibrit gruplar için 391°C ve 398°C' artmıştır. İskele içerisindeki GelMA destekli hidrojellerin max. bozunması ise PG ve PGH için 412,34 °C ve 432,49 °C olmuştur. DSC analizinde d-Men için 177 °C aralığında, doğal dokuda 212 °C, PG ve PGH hibrit iskelede sırasıyla 220 °C ve 205 °C'de protein denatürasyon başlangıç sıcaklıkları saptanmıştır. Çapraz bağlama ile termal kararlılıklarında hafif bir artış gözlenmiştir.

- ✓ PBS içerisinde 28 günlük degradasyon gerçekleşmiş olup kütle kayıpları analiz sonunda doğal dokuda % 19,29 ± 0,34, deselülerize dokuda % 26 ± 3,2, PG-Hibrit grubunda % 21,18 ± 2,2 ve PGH-Hibrit grubunda da 21,41 ± 1,6 olarak bulunmuştur. Enzimatik degradasyon için doğal dokuda % 17.82 ± 0.84, d-Men % 20,34 ± 2,49, PG-Hibrit grubunda % 17,95 ± 2,41 ve PGH-Hibrit grubunda % 17,12 ± 3,7 olarak % bozunma hızı 24 saat süre sonunda hesaplanmıştır.

- ✓ Alamar Mavisi ile hücre proliferasyonunda gruplar arasında değişim için 1.,4. Ve 7. Günlerde analiz yapılmıştır. 1. Günün verilerinde hücre canlılığı kontrol grubu % 100 alındığında tüm gruplarda % 75 üzeri olmuştur. 4. ve 7. günlerde hücre canlılığı artarak % 90 üstü seviyelere gelmiştir. Tüm gruplarda 1. ve 7. gün arasındaki absorbansları arasında anlamlı derecede bir artış bulunmuştur ($p<0.0001$). PGH grubu burada PG'ye göre hücre proliferasyonunda daha fazla

artış yaşamış ve GelMA ve HAMA biyopolimerlerinin iskeleye katılmasıyla hücre malzeme etkileşimini artırdığı görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

[1] K. A. Athanasiou ,J. Sanchez-Adams, Engineering the knee meniscus, Synthesis lectures on tissue engineering, 1 (2009) 1-97.
[2] M. Majewski, H. Susanne ,S. Klaus, Epidemiology of athletic knee injuries: A 10-year study, The knee, 13 (2006) 184-188.
[3] I. McDermott ,A. Amis, The consequences of meniscectomy, The Journal of bone and joint surgery. British volume, 88 (2006) 1549-1556.
[4] M. D. Miller ,S. R. Thompson, Knee Anatomy and Biomechanics of the Knee, in: E. C. McCarty (Ed.) DeLee, Drez and Miller's Orthopaedic Sports Medicine, Elsevier2019, pp. 1062-1088.
[5] A. J. Fox, A. Bedi ,S. A. Rodeo, The basic science of human knee menisci: structure, composition, and function, Sports health, 4 (2012) 340-351.
[6] J. M. Cottrell, P. Scholten, T. Wanich, R. F. Warren, T. M. Wright ,S. A. Maher, A new technique to measure the dynamic contact pressures on the Tibial Plateau, Journal of biomechanics, 41 (2008) 2324-2329.
[7] C. A. Mcdevitt ,R. J. Webber, The Ultrastructure and Biochemistry of Meniscal Cartilage, Clinical Orthopaedics and Related Research, (1990) 8-18.
[8] A. J. S. Fox, F. Wanivenhaus, A. J. Burge, R. F. Warren ,S. A. Rodeo, The Human Meniscus: A Review of Anatomy, Function, Injury, and Advances in Treatment, Clinical Anatomy, 28 (2015) 269-287.
[9] I. F. Cengiz, J. Silva-Correia, H. Pereira, J. Espregueira-Mendes, J. M. Oliveira ,R. L. Reis, Basics of the meniscus, Regenerative Strategies for the Treatment of Knee Joint Disabilities, Springer2017, pp. 237-247.
[10] E. Rath ,J. C. Richmond, The menisci: basic science and advances in treatment, British journal of sports medicine, 34 (2000) 252-257.
[11] S. P. Arnoczky ,R. F. Warren, Microvasculature of the human meniscus, The American journal of sports medicine, 10 (1982) 90-95.
[12] T. Pufe, W. J. Petersen, N. Miosge, M. B. Goldring, R. Mentlein, D. J. Varoga ,B. N. Tillmann, Endostatin/collagen XVIII—an inhibitor of angiogenesis—is expressed in cartilage and fibrocartilage, Matrix Biology, 23 (2004) 267-276.
[13] J. C. Gray, Neural and vascular anatomy of the menisci of the human knee, Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy, 29 (1999) 23-30.
[14] K. Wegrecki, N. Hope, D. Dabirrahmani ,A. Stuart, Meniscal repairs: a review of past, current, and future options, Australian Medical Student Journal, 7 (2016).
[15] E. A. Makris, P. Hadidi ,K. A. Athanasiou, The knee meniscus: structure–function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration, Biomaterials, 32 (2011) 7411-7431.
[16] H. S. Cheung, Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci, Connective tissue research, 16 (1987) 343-356.
[17] J. Hasan, J. Fisher ,E. Ingham, Current strategies in meniscal regeneration, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 102 (2014) 619-634.
[18] P. G. Scott, T. Nakano ,C. M. Dodd, Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1336 (1997) 254-262.

[19] P. C. Verdonk, R. Forsyth, J. Wang, K. F. Almqvist, R. Verdonk, E. M. Veys ,G. Verbruggen, Characterisation of human knee meniscus cell phenotype, Osteoarthritis and Cartilage, 13 (2005) 548-560.
[20] M. Son ,M. Levenston, Discrimination of meniscal cell phenotypes using gene expression profiles, Eur Cell Mater, 23 (2012) 195-208.
[21] M. P. HELLIO LE GRAVERAND, Y. Ou, T. SCHIELD-YEE, L. Barclay, D. Hart, T. Natsume ,J. Rattner, The cells of the rabbit meniscus: their arrangement, interrelationship, morphological variations and cytoarchitecture, Journal of Anatomy, 198 (2000) 525-535.
[22] J. Sanchez-Adams ,K. A. Athanasiou, The knee meniscus: a complex tissue of diverse cells, Cellular and Molecular Bioengineering, 2 (2009) 332-340.
[23] J. Sanchez-Adams, V. P. Willard ,K. A. Athanasiou, Regional variation in the mechanical role of knee meniscus glycosaminoglycans, Journal of applied physiology, 111 (2011) 1590-1596.
[24] M. Chen, W. Guo, S. Gao, C. Hao, S. Shen, Z. Zhang, Z. Wang, X. Li, X. Jing ,X. Zhang, Biomechanical stimulus based strategies for meniscus tissue engineering and regeneration, Tissue Engineering Part B: Reviews, 24 (2018) 392-402.
[25] B. Leslie, D. Gardner, J. McGeough ,R. Moran, Anisotropic response of the human knee joint meniscus to unconfined compression, Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, 214 (2000) 631-635.
[26] M. B. Ellman ,J. Chahla, Meniscus: Biomechanics and Biology, Joint Preservation of the Knee, Springer2019, pp. 25-39.
[27] F. Fu ,W. Thompson, Biomechanics and kinematics of meniscus, Biology and Biomechanics of the Traumatized Synovial Joint: The Knee as a Model. Rosemont, Ill: American Academy of Orthopaedic Surgeons, (1992) 153-183.
[28] C. Palazzo, C. Nguyen, M.-M. Lefevre-Colau, F. Rannou ,S. Poiraudeau, Risk factors and burden of osteoarthritis, Annals of physical and rehabilitation medicine, 59 (2016) 134-138.
[29] S. M. Gee, D. J. Tennent, K. L. Cameron ,M. A. Posner, The burden of meniscus injury in young and physically active populations, Clinics in sports medicine, 39 (2020) 13-27.
[30] I. D. McDermott, (ii) Meniscal tears, Current Orthopaedics, 20 (2006) 85-94.
[31] N. Reha, Menisküs: işlevi, biyornekaniği ve kinernatiği, Acta Orthop Traumatol Turc, 31 (1997) 397-401.
[32] P. Verdonk ,P. Vererfve, Traumatic lesions: Stable knee, ACL knee, The meniscus, Springer2010, pp. 45-49.
[33] I. F. Cengiz, H. Pereira, J. Espregueira-Mendes, J. M. Oliveira ,R. L. Reis, Treatments of meniscus lesions of the knee: current concepts and future perspectives, Regenerative Engineering and Translational Medicine, 3 (2017) 32-50.
[34] N. TANDOGAN, The meniscus: biomechanics, kinematics and function, Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica, 31 (1997) 397-401.
[35] H. Kwon, W. E. Brown, C. A. Lee, D. Wang, N. Paschos, J. C. Hu ,K. A. Athanasiou, Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair, Nature Reviews Rheumatology, 15 (2019) 550-570.

[36] Z. Zhang, J. A. Arnold, T. Williams ,B. McCann, Repairs by trephination and suturing of longitudinal injuries in the avascular area of the meniscus in goats, The American journal of sports medicine, 23 (1995) 35-41.
[37] S. P. Arnoczky, R. F. Warren ,J. Spivak, Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs, The Journal of bone and joint surgery. American volume, 70 (1988) 1209-1217.
[38] E. M. Roos, H. P. Roos, L. Ryd ,L. S. Lohmander, Substantial disability 3 months after arthroscopic partial meniscectomy: A prospective study of patient-relevant outcomes, Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 16 (2000) 619-626.
[39] M. Northmore-Ball, D. Dandy ,R. Jackson, Arthroscopic, open partial, and total meniscectomy. A comparative study, The Journal of bone and joint surgery. British volume, 65 (1983) 400-404.
[40] R. Appleyard, D. Burkhardt, P. Ghosh, R. Read, M. Cake, M. Swain ,G. Murrell, Topographical analysis of the structural, biochemical and dynamic biomechanical properties of cartilage in an ovine model of osteoarthritis, Osteoarthritis and cartilage, 11 (2003) 65-77.
[41] R. Verdonk, H. Madry, N. Shabshin, F. Dirisamer, G. M. Peretti, N. Pujol, T. Spalding, P. Verdonk, R. Seil ,V. Condello, The role of meniscal tissue in joint protection in early osteoarthritis, Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 24 (2016) 1763-1774.
[42] I. D. McDermott, S. D. Masouros ,A. A. Amis, Biomechanics of the menisci of the knee, Current Orthopaedics, 22 (2008) 193-201.
[43] H. Pereira, I. Fatih Cengiz, S. Gomes, J. Espregueira-Mendes, P. L. Ripoll, J. C. Monllau, R. L. Reis ,J. M. Oliveira, Meniscal allograft transplants and new scaffolding techniques, EFORT open reviews, 4 (2019) 279-295.
[44] P. Mickiewicz, M. Binkowski, H. Bursig ,Z. Wróbel, Preservation and sterilization methods of the meniscal allografts: literature review, Cell and tissue banking, 15 (2014) 307-317.
[45] M. ElAttar, A. Dhollander, R. Verdonk, K. F. Almqvist ,P. Verdonk, Twenty-six years of meniscal allograft transplantation: is it still experimental? A meta-analysis of 44 trials, Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 19 (2011) 147-157.
[46] W. G. Rodkey, K. E. DeHaven, W. H. Montgomery III, C. L. Baker Jr, C. L. Beck Jr, S. E. Hormel, J. R. Steadman, B. J. Cole ,K. K. Briggs, Comparison of the collagen meniscus implant with partial meniscectomy: a prospective randomized trial, JBJS, 90 (2008) 1413-1426.
[47] P. Verdonk, Significant pain reduction and functional improvement at 2 years following implantation of a polyurethane meniscus scaffold, London Knee Meeting, London, UK, 2010.
[48] S. Dangelmajer, F. Familiari, R. Simonetta, M. Kaymakoglu ,G. Huri, Meniscal transplants and scaffolds: a systematic review of the literature, Knee surgery & related research, 29 (2017) 3.
[49] G. Zur, E. Linder-Ganz, J. J. Elsner, J. Shani, O. Brenner, G. Agar, E. B. Hershman, S. P. Arnoczky, F. Guilak ,A. Shterling, Chondroprotective effects of a polycarbonate-urethane meniscal implant: histopathological results in a sheep model, Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 19 (2011) 255-263.
[50] R. Langer ,J. P. Vacanti, Tissue engineering, Science, 260 (1993) 920-926.
[51] E. Kon, G. Filardo, M. Tschon, M. Fini, G. Giavaresi, L. M. Reggiani, C. Chiari, S. Nehrer, I. Martin ,D. M. Salter, Tissue engineering for total meniscal

substitution: animal study in sheep model—results at 12 months, Tissue Engineering Part A, 18 (2012) 1573-1582.
[52] Y. Gu, W. Zhu, Y. Hao, L. Lu, Y. Chen ,Y. Wang, Repair of meniscal defect using an induced myoblast-loaded polyglycolic acid mesh in a canine model, Experimental and therapeutic medicine, 3 (2012) 293-298.
[53] A. R. Esposito, M. Moda, S. M. d. M. Cattani, G. M. de Santana, J. A. Barbieri, M. M. Munhoz, T. P. Cardoso, M. L. P. Barbo, T. Russo ,U. D'Amora, PLDLA/PCL-T scaffold for meniscus tissue engineering, BioResearch open access, 2 (2013) 138-147.
[54] J. Leenslag, A. Pennings, R. Veth, H. Nielsen ,H. Jansen, A porous composite for reconstruction of meniscus lesions, Biological and biomechanical performance of biomaterials, (1986) 147-152.
[55] A. P. T. Pezzin, T. P. Cardoso, M. d. C. A. Rincón, C. A. d. C. Zavaglia ,E. A. d. R. Duek, Bioreabsorbable polymer scaffold as temporary meniscal prosthesis, Artificial organs, 27 (2003) 428-431.
[56] S. W. Kang, S. Sun-Mi, L. Jae-Sun, L. Eung-Seok, L. Kwon-Yong, P. Sang-Guk, P. Jung-Ho ,K. Byung-Soo, Regeneration of whole meniscus using meniscal cells and polymer scaffolds in a rabbit total meniscectomy model, 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, 77 (2006) 659-671.
[57] U. Freymann, M. Endres, K. Neumann, H.-J. Scholman, L. Morawietz ,C. Kaps, Expanded human meniscus-derived cells in 3-D polymer–hyaluronan scaffolds for meniscus repair, Acta biomaterialia, 8 (2012) 677-685.
[58] T. G. Tienen, R. G. Heijkants, J. H. de Groot, A. J. Pennings, A. J. Schouten, R. P. Veth ,P. Buma, Replacement of the knee meniscus by a porous polymer implant: a study in dogs, The American journal of sports medicine, 34 (2006) 64-71.
[59] K. Gruchenberg, A. Ignatius, B. Friemert, F. von Lübken, N. Skaer, K. Gellynck, O. Kessler ,L. Dürselen, In vivo performance of a novel silk fibroin scaffold for partial meniscal replacement in a sheep model, Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 23 (2015) 2218-2229.
[60] B. Faivre, H. Bouyarmane, G. Lonjon, P. Boisrenoult, N. Pujol ,P. Beaufils, Actifit® scaffold implantation: influence of preoperative meniscal extrusion on morphological and clinical outcomes, Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research, 101 (2015) 703-708.
[61] R. H. Koh, Y. Jin, B.-J. Kang ,N. S. Hwang, Chondrogenically primed tonsil-derived mesenchymal stem cells encapsulated in riboflavin-induced photocrosslinking collagen-hyaluronic acid hydrogel for meniscus tissue repairs, Acta biomaterialia, 53 (2017) 318-328.
[62] J. Heo, R. H. Koh, W. Shim, H. D. Kim, H.-G. Yim ,N. S. Hwang, Riboflavin-induced photo-crosslinking of collagen hydrogel and its application in meniscus tissue engineering, Drug delivery and translational research, 6 (2016) 148-158.
[63] M.-T. Kasimir, E. Rieder, G. Seebacher, E. Wolner, G. Weigel ,P. Simon, Presence and elimination of the xenoantigen Gal (α1, 3) Gal in tissue-engineered heart valves, Tissue engineering, 11 (2005) 1274-1280.
[64] B. Bilgen, C. T. Jayasuriya ,B. D. Owens, Current concepts in meniscus tissue engineering and repair, Advanced healthcare materials, 7 (2018) 1701407.

[65] R. L. Dahlin, V. V. Meretoja, M. Ni, F. K. Kasper ,A. G. Mikos, Chondrogenic phenotype of articular chondrocytes in monoculture and co-culture with mesenchymal stem cells in flow perfusion, Tissue Engineering Part A, 20 (2014) 2883-2891.
[66] M. Horie, I. Sekiya, T. Muneta, S. Ichinose, K. Matsumoto, H. Saito, T. Murakami ,E. Kobayashi, Intra-articular injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect, Stem cells, 27 (2009) 878-887.
[67] G. M. Hoben, J. C. Hu, R. A. James ,K. A. Athanasiou, Self-assembly of fibrochondrocytes and chondrocytes for tissue engineering of the knee meniscus, Tissue engineering, 13 (2007) 939-946.
[68] A. C. Aufderheide ,K. A. Athanasiou, Assessment of a bovine co-culture, scaffold-free method for growing meniscus-shaped constructs, Tissue engineering, 13 (2007) 2195-2205.
[69] T. J. Keane, I. T. Swinehart ,S. F. Badylak, Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance, Methods, 84 (2015) 25-34.
[70] J. Burk, I. Erbe, D. Berner, J. Kacza, C. Kasper, B. Pfeiffer, K. Winter ,W. Brehm, Freeze-thaw cycles enhance decellularization of large tendons, Tissue Engineering Part C: Methods, 20 (2014) 276-284.
[71] C. V. Montoya ,P. S. McFetridge, Preparation of ex vivo–based biomaterials using convective flow decellularization, Tissue Engineering Part C: Methods, 15 (2009) 191-200.
[72] F. Starnecker, F. König, C. Hagl ,N. Thierfelder, Tissue-engineering acellular scaffolds—The significant influence of physical and procedural decellularization factors, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 106 (2018) 153-162.
[73] X. Dong, X. Wei, W. Yi, C. Gu, X. Kang, Y. Liu, Q. Li ,D. Yi, RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 20 (2009) 2327-2336.
[74] W. Sheridan, G. P. Duffy ,B. Murphy, Mechanical characterization of a customized decellularized scaffold for vascular tissue engineering, Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 8 (2012) 58-70.
[75] C. C. Xu, R. W. Chan ,N. Tirunagari, A biodegradable, acellular xenogeneic scaffold for regeneration of the vocal fold lamina propria, Tissue engineering, 13 (2007) 551-566.
[76] B. D. Elder, D. H. Kim ,K. A. Athanasiou, Developing an articular cartilage decellularization process toward facet joint cartilage replacement, Neurosurgery, 66 (2010) 722-727.
[77] K. H. Nakayama, C. A. Batchelder, C. I. Lee ,A. F. Tarantal, Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering, Tissue Engineering Part A, 16 (2010) 2207-2216.
[78] S. B. Lumpkins, N. Pierre ,P. S. McFetridge, A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc, Acta biomaterialia, 4 (2008) 808-816.
[79] T. H. Petersen, E. A. Calle, L. Zhao, E. J. Lee, L. Gui, M. B. Raredon, K. Gavrilov, T. Yi, Z. W. Zhuang ,C. Breuer, Tissue-engineered lungs for in vivo implantation, Science, 329 (2010) 538-541.

[80] C. Deeken, A. White, S. Bachman, B. Ramshaw, D. Cleveland, T. Loy ,S. Grant, Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 96 (2011) 199-206.
[81] H. Xu, B. Xu, Q. Yang, X. Li, X. Ma, Q. Xia, Y. Zhang, C. Zhang, Y. Wu ,Y. Zhang, Comparison of decellularization protocols for preparing a decellularized porcine annulus fibrosus scaffold, PloS one, 9 (2014) e86723.
[82] P. M. Crapo, T. W. Gilbert ,S. F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, Biomaterials, 32 (2011) 3233-3243.
[83] P. F. Gratzer, Decellularized Extracellular Matrix, (2019).
[84] G. Brunner, Applications of supercritical fluids, Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 1 (2010) 321-342.
[85] Y. Sun, V. Lovric, T. Wang, R. A. Oliver ,W. R. Walsh, Effects of SCCO2, gamma irradiation, and sodium dodecyl sulfate treatments on the initial properties of tendon allografts, International journal of molecular sciences, 21 (2020) 1565.
[86] K. Sawada, D. Terada, T. Yamaoka, S. Kitamura ,T. Fujisato, Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue, Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 83 (2008) 943-949.
[87] S. Guler, B. Aslan, P. Hosseinian ,H. M. Aydin, Supercritical carbon dioxide-assisted decellularization of aorta and cornea, Tissue Engineering Part C: Methods, 23 (2017) 540-547.
[88] D. Maier, K. Braeun, E. Steinhauser, P. Ueblacker, M. Oberst, P. C. Kreuz, N. Roos, V. Martinek ,A. B. Imhoff, In vitro analysis of an allogenic scaffold for tissue-engineered meniscus replacement, Journal of Orthopaedic Research, 25 (2007) 1598-1608.
[89] T. W. Stapleton, J. Ingram, J. Katta, R. Knight, S. Korossis, J. Fisher ,E. Ingham, Development and characterization of an acellular porcine medial meniscus for use in tissue engineering, Tissue Engineering Part A, 14 (2008) 505-518.
[90] G. Sandmann, S. Eichhorn, S. Vogt, C. Adamczyk, S. Aryee, M. Hoberg, S. Milz, A. Imhoff ,T. Tischer, Generation and characterization of a human acellular meniscus scaffold for tissue engineering, 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, 91 (2009) 567-574.
[91] K. J. Stabile, D. Odom, T. L. Smith, C. Northam, P. W. Whitlock, B. P. Smith, M. E. Van Dyke ,C. M. Ferguson, An acellular, allograft-derived meniscus scaffold in an ovine model, Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 26 (2010) 936-948.
[92] F. Yusof, M. Sha'ban ,A. Azhim, Development of decellularized meniscus using closed sonication treatment system: potential scaffolds for orthopedics tissue engineering applications, International journal of nanomedicine, 14 (2019) 5491.
[93] K. Gelse, L. Körber, M. Schöne, K. Raum, P. Koch, M. Pachowsky, G. Welsch ,R. Breiter, Transplantation of chemically processed decellularized meniscal allografts: a pilot sheep study, Cartilage, 8 (2017) 180-190.
[94] R. C. Nordberg, A. Charoenpanich, C. E. Vaughn, E. H. Griffith, M. B. Fisher, J. H. Cole, J. T. Spang ,E. G. Loboa, Enhanced cellular infiltration of

human adipose-derived stem cells in allograft menisci using a needle-punch method, Journal of orthopaedic surgery and research, 11 (2016) 1-10.
[95] S. Gao, Z. Yuan, T. Xi, X. Wei ,Q. Guo, Characterization of decellularized scaffold derived from porcine meniscus for tissue engineering applications, Frontiers of Materials Science, 10 (2016) 101-112.
[96] L. Guo, J. Qu, C. Zheng, Y. Cao, T. Zhang, H. Lu ,J. Hu, Preparation and characterization of a novel decellularized fibrocartilage “book” scaffold for use in tissue engineering, PLoS One, 10 (2015) e0144240.
[97] S. R. Van Tomme, G. Storm ,W. E. Hennink, In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications, International journal of pharmaceutics, 355 (2008) 1-18.
[98] W.-F. Su, Radical chain polymerization, Principles of Polymer Design and Synthesis, Springer2013, pp. 137-183.
[99] B. Amsden, Photo-Crosslinking Methods to Design Hydrogels, GELS HANDBOOK: Fundamentals, Properties and Applications Volume 1: Fundamentals of Hydrogels, World Scientific2016, pp. 201-218.
[100] V. Shukla, M. Bajpai, D. Singh, M. Singh ,R. Shukla, Review of basic chemistry of UV-curing technology, Pigment & Resin Technology, (2004).
[101] C. Yu, J. Schimelman, P. Wang, K. L. Miller, X. Ma, S. You, J. Guan, B. Sun, W. Zhu ,S. Chen, Photopolymerizable biomaterials and light-based 3D printing strategies for biomedical applications, Chemical reviews, 120 (2020) 10695-10743.
[102] K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M. M. Alvarez, A. Tamayol, N. Annabi ,A. Khademhosseini, Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels, Biomaterials, 73 (2015) 254-271.
[103] H. Shirahama, B. H. Lee, L. P. Tan ,N.-J. Cho, Precise tuning of facile one-pot gelatin methacryloyl (GelMA) synthesis, Scientific reports, 6 (2016) 1-11.
[104] W. Schuurman, P. A. Levett, M. W. Pot, P. R. van Weeren, W. J. Dhert, D. W. Hutmacher, F. P. Melchels, T. J. Klein ,J. Malda, Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs, Macromolecular bioscience, 13 (2013) 551-561.
[105] M. Nikkhah, N. Eshak, P. Zorlutuna, N. Annabi, M. Castello, K. Kim, A. Dolatshahi-Pirouz, F. Edalat, H. Bae ,Y. Yang, Directed endothelial cell morphogenesis in micropatterned gelatin methacrylate hydrogels, Biomaterials, 33 (2012) 9009-9018.
[106] A. Tamayol, A. H. Najafabadi, B. Aliakbarian, E. Arab-Tehrany, M. Akbari, N. Annabi, D. Juncker ,A. Khademhosseini, Hydrogel templates for rapid manufacturing of bioactive fibers and 3D constructs, Advanced healthcare materials, 4 (2015) 2146-2153.
[107] G. Burke, V. Barron, T. Geever, L. Geever, D. M. Devine ,C. L. Higginbotham, Evaluation of the materials properties, stability and cell response of a range of PEGDMA hydrogels for tissue engineering applications, Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 99 (2019) 1-10.
[108] J. A. Killion, L. M. Geever, D. M. Devine, J. E. Kennedy ,C. L. Higginbotham, Mechanical properties and thermal behaviour of PEGDMA hydrogels for potential bone regeneration application, Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 4 (2011) 1219-1227.

[109] M. Peter, A. Singh, K. Mohankumar, R. Jeenger, P. A. Joge, M. M. Gatne ,P. Tayalia, Gelatin-based matrices as a tunable platform to study in vitro and in vivo 3B cell invasion, ACS Applied Bio Materials, 2 (2019) 916-929.
[110] J. A. Burdick, C. Chung, X. Jia, M. A. Randolph ,R. Langer, Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks, Biomacromolecules, 6 (2005) 386-391.
[111] M. T. Poldervaart, B. Goversen, M. De Ruijter, A. Abbadessa, F. P. Melchels, F. C. Öner, W. J. Dhert, T. Vermonden ,J. Alblas, 3B bioprinting of methacrylated hyaluronic acid (MeHA) hydrogel with intrinsic osteogenicity, PloS one, 12 (2017) e0177628.
[112] S. Lin, W. Y. W. Lee, Q. Feng, L. Xu, B. Wang, G. C. W. Man, Y. Chen, X. Jiang, L. Bian ,L. Cui, Synergistic effects on mesenchymal stem cell-based cartilage regeneration by chondrogenic preconditioning and mechanical stimulation, Stem cell research & therapy, 8 (2017) 1-12.
[113] B. Topuz, G. Günal, S. Guler ,H. M. Aydin, Use of supercritical CO2 in soft tissue decellularization, Methods in cell biology, 157 (2020) 49-79.
[114] J. Kapuscinski, DAPI: a DNA-specific fluorescent probe, Biotechnic & Histochemistry, 70 (1995) 220-233.
[115] Y. Katsuragawa, K. Saitoh, N. Tanaka, M. Wake, Y. Ikeda, H. Furukawa, S. Tohma, M. Sawabe, M. Ishiyama ,S. Yagishita, Changes of human menisci in osteoarthritic knee joints, Osteoarthritis and cartilage, 18 (2010) 1133-1143.
[116] P. Bursac, S. Arnoczky ,A. York, Dynamic compressive behavior of human meniscus correlates with its extra-cellular matrix composition, Biorheology, 46 (2009) 227-237.
[117] M. Uyanıklar, G. l. i. Günal, A. Tevlek, P. Hosseinian ,H. M. Aydin, Hybrid cornea: cell laden hydrogel incorporated decellularized matrix, ACS Biomaterials Science & Engineering, 6 (2019) 122-133.
[118] C. D O'Connell, C. Di Bella, F. Thompson, C. Augustine, S. Beirne, R. Cornock, C. J. Richards, J. Chung, S. Gambhir ,Z. Yue, Development of the Biopen: a handheld device for surgical printing of adipose stem cells at a chondral wound site, Biofabrication, 8 (2016) 015019.
[119] K. S. Lim, B. J. Klotz, G. C. J. Lindberg, F. P. W. Melchels, G. J. Hooper, J. Malda, D. Gawlitta ,T. B. F. Woodfield, Visible Light Cross-Linking of Gelatin Hydrogels Offers an Enhanced Cell Microenvironment with Improved Light Penetration Depth, Macromolecular Bioscience, 19 (2019).
[120] P. J. Flory, Statistical mechanics of swelling of network structures, The Journal of Chemical Physics, 18 (1950) 108-111.
[121] E. J. Vanderploeg, C. G. Wilson, S. M. Imler, C. H. Y. Ling ,M. E. Levenston, Regional variations in the distribution and colocalization of extracellular matrix proteins in the juvenile bovine meniscus, Journal of anatomy, 221 (2012) 174-186.
[122] E. H. Lakes, A. M. Matuska, P. S. McFetridge ,K. D. Allen, Mechanical integrity of a decellularized and laser drilled medial meniscus, Journal of biomechanical engineering, 138 (2016).
[123] C. Schneider, J. Lehmann, G. J. van Osch, F. Hildner, A. Teuschl, X. Monforte, D. Miosga, P. Heimel, E. Priglinger ,H. Redl, Systematic comparison of protocols for the preparation of human articular cartilage for use as scaffold material in cartilage tissue engineering, Tissue Engineering Part C: Methods, 22 (2016) 1095-1107.

[124] Y. Seo, Y. Jung ,S. H. Kim, Decellularized heart ECM hydrogel using supercritical carbon dioxide for improved angiogenesis, Acta biomaterialia, 67 (2018) 270-281.
[125] J. Antons, M. Marascio, P. Aeberhard, G. Weissenberger, N. Hirt-Burri, L. Applegate, P.-E. Bourban ,D. Pioletti, Decellularised tissues obtained by a CO2-philic detergent and supercritical CO2, European Cells and Materials, 36 (2018) 81-95.
[126] Y.-H. Huang, F.-W. Tseng, W.-H. Chang, I.-C. Peng, D.-J. Hsieh, S.-W. Wu ,M.-L. Yeh, Preparation of acellular scaffold for corneal tissue engineering by supercritical carbon dioxide extraction technology, Acta biomaterialia, 58 (2017) 238-243.
[127] A. Morejon, C. D. Norberg, M. De Rosa, T. M. Best, A. R. Jackson ,F. Travascio, Compressive properties and hydraulic permeability of human meniscus: relationships with tissue structure and composition, Frontiers in bioengineering and biotechnology, 8 (2020).
[128] C. Fabbriciani, L. Lucania, G. Milano, A. S. Panni ,M. Evangelisti, Meniscal allografts: cryopreservation vs deep-frozen technique An experimental study in goats, Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 5 (1997) 124-134.
[129] N. H. Yang, P. K. Canavan ,H. Nayeb-Hashemi, The effect of the frontal plane tibiofemoral angle and varus knee moment on the contact stress and strain at the knee cartilage, Journal of Applied Biomechanics, 26 (2010) 432-443.
[130] M. Parmaksiz, A. Dogan, S. Odabas, A. E. Elçin ,Y. M. Elçin, Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine, Biomedical materials, 11 (2016) 022003.
[131] E. Hoch, C. Schuh, T. Hirth, G. E. Tovar ,K. Borchers, Stiff gelatin hydrogels can be photo-chemically synthesized from low viscous gelatin solutions using molecularly functionalized gelatin with a high degree of methacrylation, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 23 (2012) 2607-2617.
[132] K. Modaresifar, A. Hadjizadeh ,H. Niknejad, Design and fabrication of GelMA/chitosan nanoparticles composite hydrogel for angiogenic growth factor delivery, Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 46 (2018) 1799-1808.
[133] H. Xu, J. Casillas, S. Krishnamoorthy ,C. Xu, Effects of Irgacure 2959 and lithium phenyl-2, 4, 6-trimethylbenzoylphosphinate on cell viability, physical properties, and microstructure in 3D bioprinting of vascular-like constructs, Biomedical Materials, 15 (2020) 055021.
[134] F. Redaelli, M. Sorbona ,F. Rossi, Synthesis and processing of hydrogels for medical applications, Bioresorbable polymers for biomedical applications, Elsevier2017, pp. 205-228.
[135] B. D. Fairbanks, M. P. Schwartz, C. N. Bowman ,K. S. Anseth, Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2, 4, 6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility, Biomaterials, 30 (2009) 6702-6707.
[136] J. P. Fouassier, X. Allonas, J. Lalevée ,C. Dietlin, Photoinitiators for free radical polymerization reactions, Photochemistry and photophysics of polymer materials, (2010) 351-419.
[137] B. J. Klotz, L. A. Oosterhoff, L. Utomo, K. S. Lim, Q. Vallmajo-Martin, H. Clevers, T. B. Woodfield, A. J. Rosenberg, J. Malda ,M. Ehrbar, A versatile

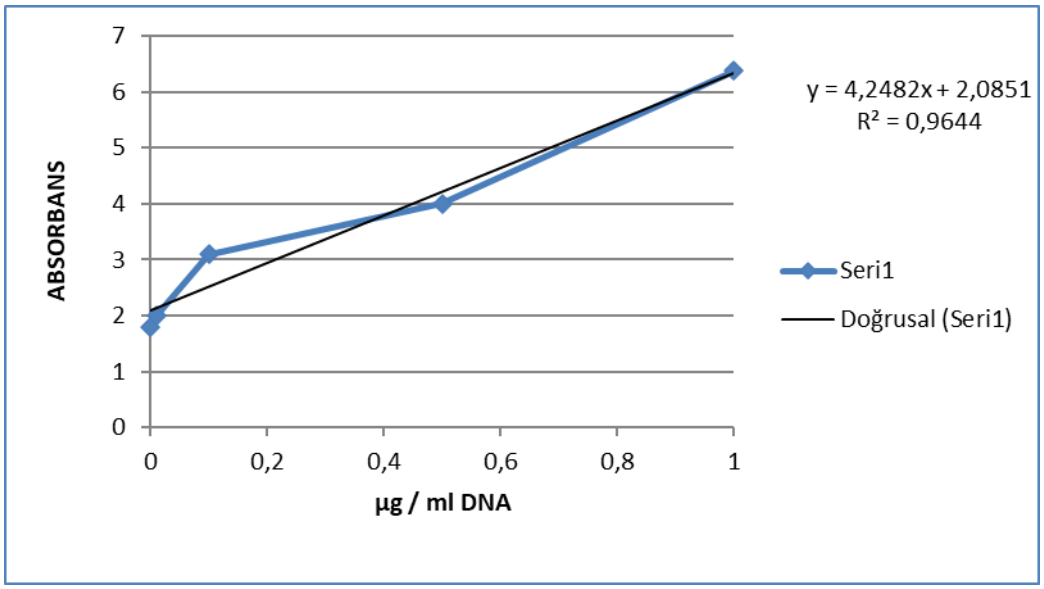
biosynthetic hydrogel platform for engineering of tissue analogues, Advanced healthcare materials, 8 (2019) 1900979.
[138] J. Liu, B. Zhang, L. Li, J. Yin ,J. Fu, Additive-lathe 3B bioprinting of bilayered nerve conduits incorporated with supportive cells, Bioactive materials, 6 (2021) 219-229.
[139] G. Camci-Unal, D. Cuttica, N. Annabi, D. Demarchi ,A. Khademhosseini, Synthesis and characterization of hybrid hyaluronic acid-gelatin hydrogels, Biomacromolecules, 14 (2013) 1085-1092.
[140] P. Jiang, Z. Mao ,C. Gao, Combinational effect of matrix elasticity and alendronate density on differentiation of rat mesenchymal stem cells, Acta biomaterialia, 19 (2015) 76-84.
[141] F. Yousefi, S. Kandel ,N. Pleshko, Infrared spectroscopic quantification of methacrylation of hyaluronic acid: a scaffold for tissue engineering applications, Applied spectroscopy, 72 (2018) 1455-1466.
[142] D. Wulandari, S. Triatmojo, Y. Erwanto ,Y. Pranoto, Physicochemical properties and amino acid and functional group profiles of gelatin extracted from bovine split hide cured by acid, Pakistan J. Nutr, 15 (2016) 655-661.
[143] V. Balan, C.-T. Mihai, F.-D. Cojocaru, C.-M. Uritu, G. Dodi, D. Botezat ,I. Gardikiotis, Vibrational spectroscopy fingerprinting in medicine: from molecular to clinical practice, Materials, 12 (2019) 2884.
[144] Y. Wang, X. Cao, M. Ma, W. Lu, B. Zhang ,Y. Guo, A GelMA-PEGDA-NHA composite hydrogel for bone tissue engineering, Materials, 13 (2020) 3735.
[145] J. Muyonga, C. Cole ,K. Duodu, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (Lates niloticus), Food chemistry, 86 (2004) 325-332.
[146] D. M. Brey, I. Erickson ,J. A. Burdick, Influence of macromer molecular weight and chemistry on poly (β-amino ester) network properties and initial cell interactions, 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, 85 (2008) 731-741.
[147] P. S. Walker, S. Arno, C. Bell, G. Salvadore, I. Borukhov ,C. Oh, Function of the medial meniscus in force transmission and stability, Journal of biomechanics, 48 (2015) 1383-1388.
[148] M. L. Tanaka, N. Vest, C. M. Ferguson ,P. Gatenholm, Comparison of biomechanical properties of native menisci and bacterial cellulose implant, International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 63 (2014) 891-897.
[149] K. Zhang, L. Li, L. Yang, J. Shi, L. Zhu, H. Liang, X. Wang, X. Yang ,Q. Jiang, Effect of degenerative and radial tears of the meniscus and resultant meniscectomy on the knee joint: a finite element analysis, Journal of orthopaedic translation, 18 (2019) 20-31.
[150] S. Khalili, S. N. Khorasani, R. E. Neisiany ,S. Ramakrishna, Theoretical cross-link density of the nanofibrous scaffolds, Material Design & Processing Communications, 1 (2019) e22.
[151] J. J. Lim ,M. H. Shamos, Evaluation of kinetic parameters of thermal decomposition of native collagen by thermogravimetric analysis, Biopolymers: Original Research on Biomolecules, 13 (1974) 1791-1807.

[152] J.-B. Choi, Y.-K. Kim, S.-M. Byeon, J.-E. Park, T.-S. Bae, Y.-S. Jang ,M.-H. Lee, Fabrication and Characterization of Biodegradable Gelatin Methacrylate/Biphasic Calcium Phosphate Composite Hydrogel for Bone Tissue Engineering, Nanomaterials, 11 (2021) 617.
[153] B. Velasco-Rodriguez, T. Diaz-Vidal, L. C. Rosales-Rivera, C. A. García-González, C. Alvarez-Lorenzo, A. Al-Modlej, V. Domínguez-Arca, G. Prieto, S. Barbosa ,J. F. A. Soltero Martínez, Hybrid Methacrylated Gelatin and Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffolds. Preparation and Systematic Characterization for Prospective Tissue Engineering Applications, International Journal of Molecular Sciences, 22 (2021) 6758.
[154] L. Bozec ,M. Odlyha, Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy, Biophysical journal, 101 (2011) 228-236.
[155] V. Mano ,M. E. S. Ribeiro e Silva, Bioartificial polymeric materials based on collagen and poly (N-isopropylacrylamide), Materials Research, 10 (2007) 165-170.
[156] B. V. Slaughter, S. S. Khurshid, O. Z. Fisher, A. Khademhosseini ,N. A. Peppas, Hydrogels in regenerative medicine, Advanced materials, 21 (2009) 3307-3329.
[157] J. J. Rongen, T. G. van Tienen, B. van Bochove, D. W. Grijpma ,P. Buma, Biomaterials in search of a meniscus substitute, Biomaterials, 35 (2014) 3527-3540.
[158] J. W. Nichol, S. T. Koshy, H. Bae, C. M. Hwang, S. Yamanlar ,A. Khademhosseini, Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels, Biomaterials, 31 (2010) 5536-5544.
[159] T. Murakami, S. Otsuki, Y. Okamoto, K. Nakagawa, H. Wakama, N. Okuno ,M. Neo, Hyaluronic acid promotes proliferation and migration of human meniscus cells via a CD44-dependent mechanism, Connective tissue research, 60 (2019) 117-127.
[160] J. Visser, P. A. Levett, N. C. te Moller, J. Besems, K. W. Boere, M. H. van Rijen, J. C. de Grauw, W. J. Dhert, P. R. van Weeren ,J. Malda, Crosslinkable hydrogels derived from cartilage, meniscus, and tendon tissue, Tissue engineering part A, 21 (2015) 1195-1206.
[161] S. Gao, Z. Yuan, W. Guo, M. Chen, S. Liu, T. Xi ,Q. Guo, Comparison of glutaraldehyde and carbodiimides to crosslink tissue engineering scaffolds fabricated by decellularized porcine menisci, Materials Science and Engineering: C, 71 (2017) 891-900.

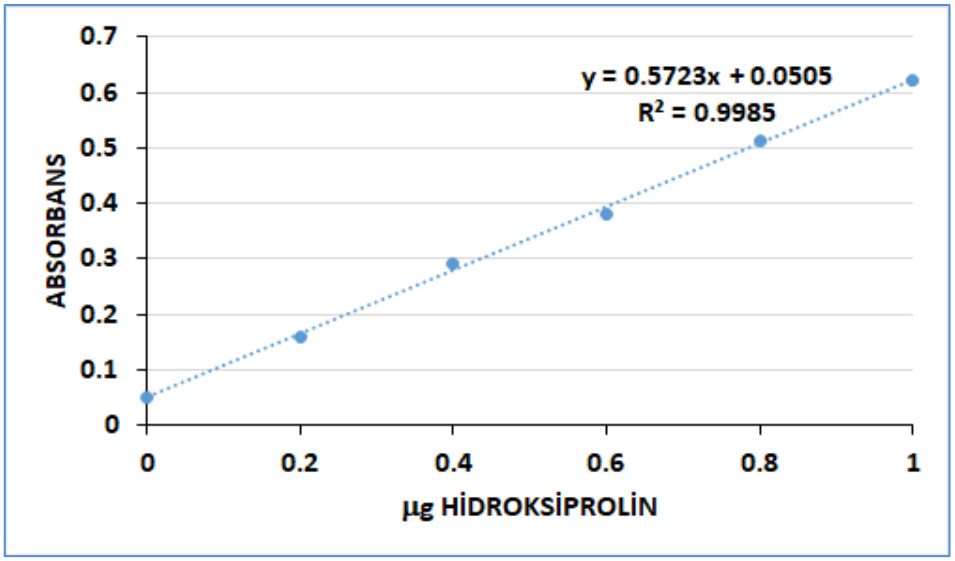
EKLER

EK 1 – Kalibrasyonlar

1. DNA Kalibrasyon Grafiği:



2. Kolajen Kalibrasyon Grafiği



3. GAG Kalibrasyon Grafiği