

**AKCİĞER HAVAYOLU MODELLEMESİNE YÖNELİK
OLUŞTURULAN DESELÜLERİZE DOKU İSKELELERİ
İLE 3B HÜCRE KÜLTÜR SİSTEMLERİNİN KURULMASI**

**ESTABLISHMENT OF 3D CELL CULTURE SYSTEMS
WITH DECELLULARIZED SCAFFOLDS FOR LUNG
AIRWAY MODELING**

SEÇİL SUBAŞI

DOÇ. DR. İBRAHİM ÇAĞATAY KARAASLAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

AKCİĞER HAVAYOLU MODELLEMESİNE YÖNELİK OLUŞTURULAN DESELÜLERİZE DOKU İSKELELERİ İLE 3B HÜCRE KÜLTÜR SİSTEMLERİNİN KURULMASI

Seçil SUBAŞI

Yüksek Lisans, BİYOMÜHENDİSLİK Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN

Eylül 2021, 107 sayfa

Akciğerler, hücreler için gerekli oksijeni sağlamak ve metabolik olaylar sonucu oluşan karbondioksiti dışarı taşıma görevine sahiptir. Soluk alıp-verme olarak isimlendirdiğimiz bu süreç boyunca akciğerler, proteaz özelliğe sahip alerjen, virüs, bakteri, hava kirliliğine neden olan partiküller, sigara dumanı ve toksik kimyasallar gibi birçok zararlı madde ile karşılaşır. Havayoluna giren bu zararlı maddeler epitel hücre bütünlüğünü sağlayan sıkı bağlantı molekülleri üzerinde yıkıcı etki göstererek yapısal bütünlüğünün bozulmasına yol açar ve epitel bariyer hasarına neden olur. Çevresel etkenler ve genetik yatkınlıklar, astım, KOAH gibi kronik havayolu hastalıklarının ortaya çıkmasına neden olmakta ve hastalık şiddetinin artması veya azalmasında rol almaktadır. Kronik havayolu hastalıkları nedeniyle her yıl binlerce kişi hayatını kaybetmektedir. Bu hastalık mekanizmalarının anlaşılması ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için çeşitli deneysel modellere ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda hızla gelişen rejenaratif tıp ve doku mühendisliği uygulamaları hastalık mekanizmalarının anlaşılması ve geliştirilmesinde önemli bir yere

sahip olmuştur. Doku mühendisliği uygulamalarından biri olan doku ve organ deselülerizasyon (hücresizleştirme) yöntemi uzun zamandır hem deney hayvanlarında pre-klinik çalışmalar hem de klinik uygulamalarda başarılı şekilde kullanılmaktadır. Dokunun sahip olduğu doğal ekstraselüler matriks bileşeninin korunarak, olası immün yanıt hücrelerin uzaklaştırılmasıyla elde edilen deselülerize iskeleler, hücre kültür sistemlerinin geliştirilmesi için *in vitro* ortamlarda kullanılabildiği gibi donör organ yetersizliğini karşılamak amacıyla *in vivo* çalışmalarda kullanılabilecek olması bakımından oldukça önemlidir. Akciğer transplantasyonu için her zaman sağlıklı donör akciğerleri kullanıldığından; doku mühendisliği çalışmaları için üzerinde çeşitli hücre popülasyonlarının tutunup büyüyebileceği alternatif akciğer kaynaklarına ihtiyaç vardır.

Bu tez çalışması kapsamında, insan akciğerine ksenojenik bir alternatif olarak hali hazırda bulunan koyun akciğeri önerilmiştir. Çalışmada koyun akciğer dokusu üzerinde fiziksel ve kimyasal deselülerizasyon yöntemleri uygulanarak doku iskelesi üretimi gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında karıştırma/çalkalama tekniğiyle SDS, Triton X-100 ve CHAPS gibi akciğer deselülerizasyonunda yaygın olarak kullanılan deterjanların yanında Sodyum kolat hidrat, NP-40 ve ASB-14 gibi akciğer deselülerizasyonunda kullanılmamış olan deterjanlarla akciğer dokusu için optimum bir hücresizleştirme metodu oluşturulması amaçlanmıştır. Fiziksel deselülerizasyon yöntemi olarak sCO₂ kullanılmıştır. Fiziksel ve kimyasal yöntemlerle elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak her iki metodun koyun akciğeri üzerindeki etkisi ortaya konulmuştur.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise elde edilen hücresizleştirilmiş akciğer doku iskelelerinin karakterizasyonu ve hidrojel sentezi gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon için öncelikli olarak deselülerize edilmiş ekstraselüler matriksin içerdiği DNA'nın doğal dokuya oranla yapıdan ne kadar uzaklaştırıldığı nicel olarak tayin edilmiştir. Ardından histolojik boyama yöntemiyle dokular nitel olarak değerlendirilmiştir. Doku iskelelerinde kalan kolajen, glukozaminoglikan (GAG) ve elastin oranlarına bakılarak nicel analizlerle etkinlikleri araştırılmıştır. Elde edilen iskelelerin yüzey karakterizasyonu için SEM görüntüleme analizleri yapılmıştır. Bu analiz sonucunda etkili olan koşula ait dokulardan hidrojel sentezi ve karakterizasyonu yapılarak, hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Karakterizasyon işlemi sonucunda akciğer deselülerizasyonu üzerinde etkili olan ASB-14, sodyum kolat hidrat ve SDS deterjanlarıyla yapılan yöntemler seçilmiştir. Bu yöntemler içerisinde ASB-14 ile elde edilen deselülerize dokudan hidrojel sentezi gerçekleştirilerek üzerine BEAS-2B hücre ekimi yapılmış ve ALI kültür üzerinde hücre çoğalması ve farklılaşması değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer, deselülerizasyon, hidrojel, deterjan, ekstraselüler matriks, hava-sıvı arayüzeyi



ABSTRACT

ESTABLISHMENT OF 3D CELL CULTURE SYSTEMS WITH DECELLULARIZED SCAFFOLDS FOR LUNG AIRWAY MODELING

Seçil SUBAŞI

Master of Science, Department of BIOENGINEERING

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN

September 2021, 107 pages

The lungs have the task of providing the necessary oxygen for the cells and carrying out the carbon dioxide formed as a result of metabolic events. During this process, which we call breathing, the lungs encounter many harmful substances such as allergens with protease properties, viruses, bacteria, particles that cause air pollution, cigarette smoke, and toxic chemicals. These harmful substances entering the airway have a destructive effect on the tight junction molecules that provide epithelial cell integrity, leading to the deterioration of its structural integrity and cause epithelial barrier damage. Environmental factors and genetic predispositions cause chronic airway diseases such as asthma and COPD and play a role in increasing or decreasing the severity of the disease. Thousands of people die every year due to chronic airway diseases. Various experimental models are needed to understand these disease mechanisms and to develop treatment methods.

Regenerative medicine and tissue engineering applications, which have been developed rapidly in recent years, have an essential place in the understanding and development of disease mechanisms. The tissue and organ decellularization method, which is one of the tissue engineering applications, has been used successfully in both pre-clinical studies and clinical applications in experimental animals for a long time. Decellularized scaffolds obtained by preserving the natural extracellular matrix component of the tissue and removing possible immune response cells are essential in that they can be used *in vitro* to develop cell culture systems and *in vivo* studies to meet donor organ deficiency. Since healthy donor lungs are always used for lung transplantation, alternative lung sources on which various cell populations can attach and grow are needed for tissue engineering studies.

Within the scope of this thesis, sheep lung has been proposed as a xenogenic alternative to human lungs. In the study, it was aimed to produce tissue scaffolds by applying physical and chemical decellularization methods on sheep lung tissue. In the first stage of the study, it was aimed to create an optimum decellularization method for lung tissue by using detergents that used in lung decellularization such as SDS, Triton X-100 and CHAPS, as well as detergents that were not used in lung decellularization, such as Sodium cholat, NP-40 and ASB-14, by the mixing/shaking technique. sCO₂ was used as the physical decellularization method. By comparing the results obtained by physical and chemical methods, the effect of both methods on sheep lungs was revealed.

In the second stage of the study, the characterization processes of the obtained decellularized lung tissue scaffolds and hydrogel synthesis from these tissues were carried out. For characterization, it was quantitatively determined how much the DNA contained in the decellularized extracellular matrix was removed from the structure compared to the natural tissue. Then, the tissues were evaluated qualitatively by the histological staining method. Efficacy was investigated by quantitative analyzes of the collagen, glucosaminoglycan (GAG), and elastin ratios remaining in the tissue scaffolds. To analyze the surface characterization of the scaffolds obtained, SEM imaging were performed. After these analyses, hydrogel synthesis and characterization was performed from the tissues of the effective condition and cell culture studies were carried out.

As a result of the characterization process, methods with ASB-14, sodium cholate hydrate, and SDS detergents, effective on lung decellularization, were selected. Among

these methods, hydrogel synthesis was performed from the decellularized tissue obtained with ASB-14, BEAS-2B cells were cultivated on it, and cell proliferation and differentiation were evaluated on ALI culture.

Keywords: lungs, decellularization, hydrogel, detergent, extracellular matrix, air-liquid interface



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen, karşılaştığım zorluklar karşısında bilgi ve tecrübelerinden sıklıkla yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. İbrahim Çağatay Karaaslan'a,

Tez çalışmasının tamamlanmasında FYL-2019-18018 proje koduyla maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve Türk Toraks Derneği'ne,

Deneysel çalışmalarım sırasında bilgi, tecrübe ve laboratuvar imkanlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Halil Murat Aydın'a ve ne zaman başım sıkışsa rahatlıkla arayabildiğim ve tüm katkısını içtenlikle sunan Gülçin Günal Karataş'a,

Görüş ve öneriyle her zaman yardımcı olan ve yol gösteren sayın Dr. Hayriye Akel Bilgiç, Arş. Gör. Dilara Karagüzel ve Arş. Gör. Başak Ezgi Saraç'a,

Birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım, bilgi ve tecrübesiyle ne zaman ihtiyacım olsa yanımda olan, sevgisini, desteğini ve emeğini eksik etmeyen sevgili arkadaşım Sema Tuncer'e, her zaman yanımda olan, birlikte çalışmaktan ve vakit geçirmekten keyif aldığım sevgili arkadaşlarım Kadriye Gizem İmrak ve Selcan Genç'e,

Desteklerini sunmaya her zaman hazır olan diğer tüm ECRG Laboratuvar arkadaşlarım Beyza Doğan, Ali Doruk Uzunkaya, Berfin Doğa Koçkaya, Murat Yolu ve Büşra Kılıç'a, HÜNİTEK birimi ve çalışanlarına, histolojik boyama deneylerime olan katkısından dolayı Eda Nur İnkaya'ya,

Yaşamı anlamlandırma çabama ortak olan ve attığım her adımda arkamda durduğunu bildiğim sevgili Yiğit Can'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca evini açan ve bu yolculukta bana eşlik eden değerli halam Melice Köroğlu, eşi Erol Köroğlu ve kuzenim Sezgi Köroğlu'na, her zaman yanımda olduğunu bildiğim, sevgisini ve emeğini esirgemeyen değerli aile üyelerim annem Rivayet Subaşı, babam Emin Subaşı, ablam Elçin Subaşı ve hayatım boyunca elini her zaman üzerimde hissettiğim kıymetli babaannem Nazime Subaşı'na,

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

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. Solunum Sistemi	3
2.1.1. Akciğerin Anatomik Yapısı ve İşlevi.....	3
2.1.2. Ekstraselüler Matriks ve Akciğer Ekstraselüler Matriksi	5
2.1.2.1.Kolajen	6
2.1.2.2.Elastin.....	7
2.1.2.3. Glikoproteinler	8
2.1.2.3.1. Laminin	8
2.1.2.3.2 Fibronektin	8
2.1.2.4. Proteoglikanlar	8
2.1.2.4.1. Glikozaminoglikanlar.....	9
2.1.2.5. Akciğer Ekstraselüler Matriksi.....	10
2.1.3. Akciğer Hastalıkları	11
2.1.3.1. Astım	12
2.1.3.2. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH).....	13
2.1.3.3. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF)	13
2.1.3.4. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon (PAH).....	14
2.1.3.5. Kistik Fibroz.....	14
2.1.3.6. Bronşektazi.....	14
2.1.3.7. Alfa-1 antitripsin eksikliği (AATD).....	15

2.1.4. Akciğer Hastalıklarıyla İlgili Tedavi ve Yaklaşımlar	15
2.2. Doku Mühendisliği	16
2.3. Akciğer Doku Mühendisliği	18
2.4. Deselülerizasyon	24
2.4.1. Deselülerizasyon Yöntemleri	24
2.4.1.1. Fiziksel Yöntem	24
2.4.1.1.1. Dondur-Çöz:	25
2.4.1.1.2. Hidrostatik Basınç:	25
2.4.1.1.3. Sonikasyon:	25
2.4.1.1.4. Süperkritik CO ₂ (sCO ₂):	26
2.4.1.2. Kimyasal Yöntem	27
2.4.1.2.1. Asit/Alkali Çözeltiler:	28
2.4.1.2.2. Solventler:	28
2.4.1.2.3. Hipotonik/Hipertonik Çözeltiler:	29
2.4.1.2.4. Deterjanlar:	29
2.4.1.3. Biyolojik/Enzimatik Yöntem	33
2.4.2. Akciğer Deselülerizasyonu ve Doku Mühendisliği Uygulamaları	34
2.4.3. Deselülerizasyon Avantaj ve Dezavantajları	35
2.5. Hidrojeller	36
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	38
3.1. Doku Temini ve Kesit Alınması	38
3.2. Deselülerizasyon İşlemi	39
3.2.1. Kimyasal Deselülerizasyon Yöntemi	39
3.2.1. Fiziksel Deselülerizasyon Yöntemi	41
3.3. Matriks Karakterizasyonu	41
3.3.1. Nitel Analiz Yöntemleri	42
3.3.1.1. Fiksasyon, Doku Takibi ve Parafin Bloklama	42
3.3.1.2. Hematoksilen ve Eozin Boyaması	43
3.3.1.3. Masson's Trichrome Boyaması	44
3.3.1.4. Alsiyan Mavisi Boyaması	45
3.3.1.5. Van Gieson's Boyaması	45
3.3.2. Nicel Analiz Yöntemleri	46

3.3.2.1. DNA İzolasyonu.....	47
3.3.2.2. sGAG Analizi.....	48
3.3.2.3. Kolajen Analizi	49
3.3.2.4. Elastin Analizi	51
3.3.3. SEM Görüntüleme.....	52
3.4. Deselülerize Dokudan Hidrojel Sentezi	52
3.5. Hidrojel Karakterizasyonu	53
3.5.1. Reolojik Analiz	53
3.5.2. Jelleşme Kinetiği	53
3.5.3. Hidrojellerin Şişme Kinetiği	54
3.5.4. Hidrojellerin Yüzey Özellikleri.....	55
3.6. Hücre Kültürü.....	55
3.6.1. Deselülerize Hidrojeller ile Hücre Kültür Çalışmaları.....	55
3.6.1.1. Hidrojel Sterilizasyonu:.....	55
3.6.1.2. Hücre Kültür Plakalarının Hazırlanması:	56
3.6.2. BEAS-2B Hücrelerinin Çoğaltılması	56
3.6.3. Hücre Proliferasyonu.....	57
3.6.4. TEER Ölçümü	57
3.7. İstatistiksel Analiz	58
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	59
4.1. Matriks Karakterizasyonu	60
4.1.1. Deselülerizasyon Öncesi ve Sonrası Görüntüleme	60
4.1.2. DNA İzolasyonu.....	62
4.1.3 Histoloji Analiz Sonuçları.....	65
4.1.4. Hidroksiprolin Analiz Sonuçları	68
4.1.5. sGAG Analiz Sonuçları.....	71
4.1.6. Elastin Sonuçları	73
4.1.7. Fiziksel Deselülerizasyon (sCO ₂) Sonuçları	75
4.2. Deselülerize Dokudan Hidrojel Sentezi	77
4.3. Hidrojel Karakterizasyonu	78
4.3.1. Reolojik Analiz	79
4.3.2. Türbidimetrik Analiz Sonuçları	80

4.3.3. Hidrojellerin Şişme Kinetiği.....	82
4.3.4. SEM Görüntüleme	83
4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	85
5. YORUM.....	90
6. KAYNAKLAR	92
EKLER.....	105
EK 1 - Tezden Türetilmiş Bildiriler.....	105
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	106
ÖZGEÇMİŞ	107



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Akciğerin genel görünüşü [7].....	4
Şekil 2.2.	Bronşiyal ağacın genel görünümü [12].....	4
Şekil 2.3.	Havayolu ağacı boyunca farklılaşan hücre tipleri [17]	5
Şekil 2.4.	Sağlıklı durumda ve hastalıklarda ESM'nin yapısı [42]	12
Şekil 2.5.	Hücrelerin hava-sıvı arayüzey yöntemiyle farklılaştırılması [83].....	21
Şekil 2.6.	Süperkritik akışkanların genel gösterimi [121]	26
Şekil 2.7.	Deterjanın kimyasal yapısının şematik gösterimi [141].....	30
Şekil 2.8.	Tez çalışması kapsamında kimyasal deselülerizasyon ajanı olarak kullanılan deterjanların molekül yapıları [144].....	33
Şekil 2.9.	Standart 2B hücre kültür yöntemi ile 3B hidrojel karşılaştırılması [91]	37
Şekil 3.1.	Kimyasal deselülerizasyon için kullanılan olan koyun akciğeri	38
Şekil 3.2.	(A) Koyun sol akciğeri bronş ve bronşiyolları gösteren kesit. (B) Deselülerizasyon işlemi için akciğerin çeşitli bölgelerinden alınan doku kesitleri	39
Şekil 3.3.	Doku takibi dehidrasyon basamakları	42
Şekil 3.4.	Kondroitin sülfat standart konsantrasyonlarının hazırlanması	49
Şekil 3.5.	Deselülerize Dokulardan Hidrojel Sentezi	53
Şekil 3.6.	Turbidimetrik analiz sonucunda tlag, t _{1/2} ve S'in hesaplanması [172]	54
Şekil 4.1.	Deselülerizasyon işlemi için kullanılmış olan 1 cm ³ 'lük doku kesitleri	60
Şekil 4.2.	Koyun akciğerinden alınan doku kesitlerinin deselülerizasyon öncesi ve sonrası görüntüsü (A) SDS, 48 ve 72 saat, (B) Triton X-100, 48 ve 72 saat, (C) Sodyum kolat hidrat, 48 ve 72 saat, (D) NP-40, 48 ve 72 saat, (E) ASB-14, 48 saat ve (E) ASB-14, 72 saat deselülerizasyon öncesi ve sonrası görüntüleri	61
Şekil 4.3.	(A) CHAPS, 48 ve 72 saat (B) CHAPS, pH=8, 48 ve 72 saat (C) CHAPS, pH=12, 48 ve 72 saat deselülerizasyon öncesi ve sonrası görüntü	62
Şekil 4.4.	Deselülerizasyon uygulaması sonrası DNA Sonuçları (A) SDS, (B) NP-40, (C) Triton X-100, (D) Sodyum Kolat Hidrat, (E) CHAPS, (F) ASB-14, C=konsantrasyon, t=süre, n=3, p:0,1234 (ns), 0,0332 (*), 0,0021 (**), 0,0002 (***), <0,0001 (****)	63

Şekil 4.5. SDS, Triton X-100 ve CHAPS deterjanlarına ilişkin H&E boyama sonuçları	66
Şekil 4.6. Sodyum kolat hidrat, NP-40 ve ASB-14 deterjanlarına ilişkin H&E boyama sonuçları	66
Şekil 4.7. %0,5 Sodyum kolat hidrat, 48 saat; %0,5 SDS, Triton X-100 ve Sodyum kolat hidrat, 72 saat koşullarına ilişkin H&E boyama sonuçları	67
Şekil 4.8. ASB-14 deterjanına ilişkin H&E, Masson's Trichrome ve Van Gieson Boyama sonuçları	68
Şekil 4.9. Hidroksiprolin standart grafiği	69
Şekil 4.10. Hidroksiprolin analiz sonuçları (A)SDS, (B) Sodyum kolat hidrat, (C)Triton X-100 ve (D) ASB-14, C=konsantrasyon, t=süre, p:0,1234 (ns), 0,0332 (*), 0,0021 (**), 0,0002 (***), <0,0001 (****)	70
Şekil 4.11. Deselülerize dokuda sGAG ve kolajen miktarının doğal dokuya göre yüksek çıkma nedeninin şematik gösterimi [200]	71
Şekil 4.12. Kondroitin sülfat standart grafiği	72
Şekil 4.13. DMMB analiz sonuçları (A) SDS, (B)Triton X-100, (C)Sodyum kolat hidrat (D)NP-40, (E)ASB-14, C=konsantrasyon, t=süre	72
Şekil 4.14. α -elastin Standart Grafiği	73
Şekil 4.15. Fastin kitiyle yapılan elastin miktar analizi sonuçları, C=konsantrasyon, t=süre, p:0,1234 (ns), 0,0332 (*), 0,0021 (**), 0,0002 (***), <0,0001 (****)	74
Şekil 4.16. sCO ₂ ile deselülerize edilen koyun akciğerinin görüntüsü (A) Deselülerizasyon öncesi (B) Deselülerizasyon sonrası	75
Şekil 4.17. sCO ₂ ile deselülerizasyon sonrası karakterizasyon sonuçları (A) DNA izolasyonu, (B) sGAG tayini, p:0,1234 (ns), 0,0332 (*), 0,0021 (**), 0,0002 (***), <0,0001 (****)	76
Şekil 4.18. sCO ₂ ile deselülerizasyon sonrası H&E Boyama sonuçları	77
Şekil 4.19. 12 mM ASB-14, 72sa deselülerizasyon koşuluna ait dokulardan elde edilen hidrojel görüntüleri	78
Şekil 4.20. Deselülerize akciğer hidrojellerine ait gerinim taraması sonuçları (A) 8 mM ASB-14, 72 sa, 8 mg/ml, (B) 8 mM ASB-14, 72 sa, 10 mg/ml, (C) 12 mM ASB-14, 72 sa, 8 mg/ml, (D) 12 mM ASB-14, 72 sa, 10 mg/ml	79

Şekil 4.21. Deselülerize hidrojellere ilişkin reometre sonuçları (A) 8 mM ASB-14, 72 sa, 8 mg/ml, (B) 8 mM ASB-14, 72 sa, 10 mg/ml, (C) 12 mM ASB-14, 72 sa, 8 mg/ml, (D) 12 mM ASB-14, 72 sa, 10 mg/ml	80
Şekil 4.22. Hücresizleştirilmiş ESM Hidrojellerine ilişkin türbidimetrik ölçüm sonuçları	81
Şekil 4.23. Şişme kinetiği için 48-kuyucuklu plaka içerisinde hazırlanan deselülerize akciğer hidrojelleri	82
Şekil 4.24. Deselülerize akciğer hidrojellerinin şişme kinetiğine ait sonuçlar.....	83
Şekil 4.25. Koyun akciğeri SEM görüntüleri (A) Doğal doku, (B) Hücresizleştirilmiş doku iskelesi, (C) 8 mg/ml deselülerize hidrojel (D) 10 mg/ml deselülerize hidrojel, ölçek boyutu: 5 µm, yakınlaştırma: 10.000X.	84
Şekil 4.26. 2 mM ASB-14, 72sa koşuluna ait hücresizleştirilmiş dokudan elde edilen 8 ve 10 mg/ml hidrojellerin SEM görüntüsü (A) 5000X, (B) 10000X	84
Şekil 4.27. Deselülerize hidrojeller ile hazırlanmış olan transwell insertler	86
Şekil 4.28. Deselülerize hidrojel üzerinde farklılaştırmaya alınan BEAS-2B hücrelerine ait TEER sonuçları, n=3	86
Şekil 4.29. BEAS-2B hücrelerine ait SEM görüntüleri (A) 250X, (B)1000X, (C) 5000X	87
Şekil 4.30. BEAS-2B hücreleri (A) Kontrol, (B) 8 mg/ml hidrojel	88
Şekil 4.31. BEAS-2B hücrelerinin proliferasyonu (A) Kontrol ve 0,1 mg/ml jel konsantrasyonu ile yüzeyi kaplanan plakalar üzerine ekilen hücrelere ilişkin proliferasyon sonucu, (B) 8 ve 10 mg/ml konsantrasyonuna sahip hidrojel üzerine ekilen hücrelere ilişkin proliferasyon sonucu, n=3, p:0,1234 (ns), 0,0332 (*), 0,0021 (**), 0,0002 (***), <0,0001 (****)	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. ESM bileşenleri ve akciğerde bulunduğu bölgeler [27]	10
Çizelge 2.2. Akciğer doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılan polimerler ve özellikleri [6, 95]	23
Çizelge 2.3. Sıvı, gaz ve süperkritik akışkanların fiziksel özelliklerinin gösterilmesi [121].....	27
Çizelge 3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Deselülerizasyon Koşulları	40
Çizelge 4.2. Deselülerize akciğer hidrojelinin türbidimetrik ölçüm sonuçları	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

16HBE14o	İnsan bronşiyal epitel hücre hattı
3R (iyileştirme)	Reduction (azaltma), Replacement (yerine koyma), Refinement
A549	Adenokarsinomik insan alveoler bazal epitel hücre hattı
Abs	Absorbans
Au	Altın
BEAS-2B	İnsan tümörijenik-olmayan akciğer epitel hücre hattı
Calu-3	İnsan akciğer kanseri hücre hattı
CO ₂	Karbondioksit
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
dH ₂ O	Distile su
dsDNA	Çif tiplikli DNA
HCl	Hidroklorik asit
MPa	Megapaskal
NaOH	Sodyum hidroksit
P, T	Basınç, Sıcaklık
P _c , T _c	Kritik basınç, Kritik sıcaklık
Pd	Paladyum
rpm	Round per minute (dakikadaki devir sayısı)
sCO ₂	Süperkritik karbondioksit
α , β , γ zincirleri	Proteinin iki boyutlu yapısı

Kısaltmalar

2B	İki boyutlu
3B	Üç boyutlu
AATD	Alfa-1 antitripsin eksikliği
ALI	Hava-sıvı ara yüzeyi
ASB-14	Amidosülfobetain-14
CD	Başkalaşım kümesi (Yüzey farklılaşma antijenleri)
CFTR	Kistik fibröz transmembran regülatör
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonyo]-1-propansülfonat
CMC	Kritik misel konsantrasyonu
dESM	Deselülerize ekstraselüler matriks
DMMB	1,9-Dimetil metilen mavisi çinko klorür çift tuzu
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ/WHO	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGTA	Etilen glikol tetraasetik asit
ESM	Ekstrasellüler matriks (Hücre dışı matriks)
GAG, sGAG	Glikozaminoglikan, Sülfatlı glikozaminoglikan
GPCR	G-protein bağlı reseptör
HMDS	Hekzametildisilazan
IPSC	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
İPF	İdiyopatik pulmoner fibrozis
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
MMP	Matriks metalloproteinaz
MSC	Mezenkimal kök hücre

NBF	Nötral tamponlu formalin
NIH	National Institutes of Health (Ulusal Sağlık Enstitüsü)
NSF	National Science Foundation (Ulusal Bilim Vakfı)
PAA	Perasetik asit
PAA	Poli(akrilik asit)
PAH	Pulmoner arteriyel hipertansiyon
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCL	Polikaprolakton
PEG	Polietilen glikol
PEI	Polietilenimin
PGA	Poliglikolik asit
PHEA	Polihidroksietilakrilamid
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik-ko-poliglikolik asit
PVA	Poli(vinil alkol)
RNA	Ribonükleik asit
SDC	Sodyum deoksikolat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez
SERPIN	Serin proteaz inhibitör
SIS	İnce bağırsak submukozası
Sub-10	Sülfobegin-10
Sub-16	Sülfobegin-16
TEER	Trans epitel elektriksel direnç
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü-beta
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Astım, Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) ve kistik fibrozis gibi kronik havayolu hastalıkları çok sayıda insanı etkilemekte ve bu hastalıkların görülme sıklığı dünya çapında giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ/WHO) verilerine göre, yaklaşık 334 milyon kişi astım; 65 milyon kişi KOAH hastalığına sahiptir. KOAH dünya genelinde üçüncü ölüm nedeni olarak yer almaktadır ve her yıl 3 milyon kişi KOAH nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Sürekli olarak virüs bakteri, alerjenler ve dizel egzoz partikülleri gibi çevresel etmenlere maruz kalan akciğer dokusu, homeostaziyi korumak için devam eden doku onarımı ve rejenerasyon süreci geçirmektedir. Ancak bu sürecin zararlı etmenler karşısında yetersiz olması durumunda çeşitli kronik akciğer hastalıkları ortaya çıkmaktadır.

Havayolu ile ilgili birçok hastalık mekanizmasının, ekstraselüler matriks (ESM) ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, solunum sistemi hastalıklarının moleküler patolojilerinin anlaşılması ve yeni tedavilerin geliştirilmesi için ESM davranışlarının incelenmesi kritik bir öneme sahiptir. Her organ kendi mikroçevresine sahip hücrelerin oluşturduğu dokulardan oluşmaktadır ve her dokunun sahip olduğu ESM yapısı bulunmaktadır. ESM'nin genel yapısı kolajen ve elastin gibi fibröz proteinler, laminin ve fibronektin gibi glikoproteinler ve proteoglikanlardan meydana gelmektedir. ESM bileşimini oluşturan bu proteinler ESM'nin fonksiyonlarını yerine getirmesine yardımcı olmaktadır. Kolajen ve elastin yapısal proteinlerdir hücresel bileşenlere mekanik dayanım ve elastikiyet sağlamaktadır. Laminin ve fibronektin gibi proteinler hücre tutunması ve hücre-hücre/hücre-matriks etkileşiminde rol oynamaktadır. Proteoglikanlar ise doku homeostazisi, farklılaşması ve onarımı için gerekli olan sinyal iletişimini gerçekleştirmektedir. Moleküler olarak bakıldığında zaman hastalık durumlarındaki hücresel aktivitenin hücre dışı matriks ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür. Bu nedenle ESM yapısının anlaşılması klinik çalışmalar ve doku mühendisliği yaklaşımları için değer taşımaktadır.

ESM doku mikro ortamı ve komşu hücreler bir dokunun büyümesi ve gelişiminin kontrolünde çok önemli role sahiptir. ESM, çok hücreli organizmaların fonksiyonel doku sınırlarını belirtmek ve mikro ortamlarını oluşturmak için ihtiyaç duydukları üç boyutlu çevrenin sağlanmasına yardımcı olmaktadır. Doku mühendisliği uygulamaları ise

fizyolojik ortamın doğal biyomateryal temsili olan ESM üzerinde yoğunlaşmaktadır. *In vivo* ve *in vitro* ortamda kullanılan biyomalzemelerin ESM üç boyutlu ortamını taklit edebilecek şekilde tasarlanması ön plana çıkmaktadır. Genellikle hücre kültürü çalışmalarında kullanılan düz ve sert plastik veya cam substratların, organizmalarda bulunan hücresel ortamı temsil etmediği kabul edilir. Geleneksel iki boyutlu tek tabakalarda büyütülen hücreler, hücre düzleşmesi ve iç hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi ile sonuçlanır ve bu tür değişikliklerin hücrelerin gen ekspresyon düzeylerini değiştirdiği ve protein sentezinde farklılıklara yol açabildiği bilinmektedir. Bu nedenle iki boyutlu hücre kültürüne fizyolojik olarak bir alternatif sağlamak için üç boyutlu hücre kültürleri geliştirilmiştir. Hücre-hücre ve hücre-ESM etkileşimlerini dikkate alan üç boyutlu kültür yöntemleri, hücrelerin morfoloji, farklılaşma, polarite, proliferasyon hızı, gen ekspresyonu ve genomik profiller dahil olmak üzere dokularda bulunan birçok kritik özelliği yansıtmaya izin vermektedir.

Hücresel davranış ve ESM yüksek oranda birbirine bağlıdır. Bu nedenle, hücrelerin matriksleriyle olan etkileşiminin anlaşılması ve açıklanması hastalıkların tedavisi için önemli bir adım olarak değerlendirilmektedir. Hücresel davranışların anlaşılması ve araştırılması için patolojik ve fizyolojik koşulları taklit edebilen *in vitro* kültür sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Deselülerizasyon adıyla literatüre geçen hücresizleştirme işlemi, ESM'nin herhangi bir dokudan minimum kayıp, hasar veya bozulma ile izole edilmesini sağlarken, içeriğindeki hücresel materyalin ise en üst düzeyde dokudan uzaklaştırılmasını gerektirmektedir. Literatürde deselülerizasyon için henüz tanımlanmış ve herkes tarafından kabul edilmiş bir protokol bulunmamaktadır. Genellikle optimum bir hücresizleştirme protokolü işlem süresi ve yöntemi ile DNA'dan uzaklaştırılmış deselülerize ESM (dESM) yapısının bileşim, yapısal ve mekanik özelliklerinin korunarak aralarında doğru bir uyuşmanın bulunmasıyla oluşturulmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında koyun akciğeri üzerinde, altı farklı deterjanın belirlenen konsantrasyon ve sürelerde uygulanmasıyla kimyasal; süperkritik karbondioksit (sCO₂) uygulamasıyla fiziksel deselülerizasyon gerçekleştirilerek akciğer dokusu için optimum bir protokol oluşturulması amaçlanmıştır. Ayrıca, bu dokulardan elde edilen hidrojeller, hücre çalışmalarında akciğer mikroçevresini *in vitro* koşullarda en iyi taklit eden ve etkili bir model olan hava-sıvı ara yüzeyi (ALI) kültür sistemiyle birlikte kullanılarak dESM hidrojellerin hücre kültür sistemine katkısı değerlendirilmiştir.

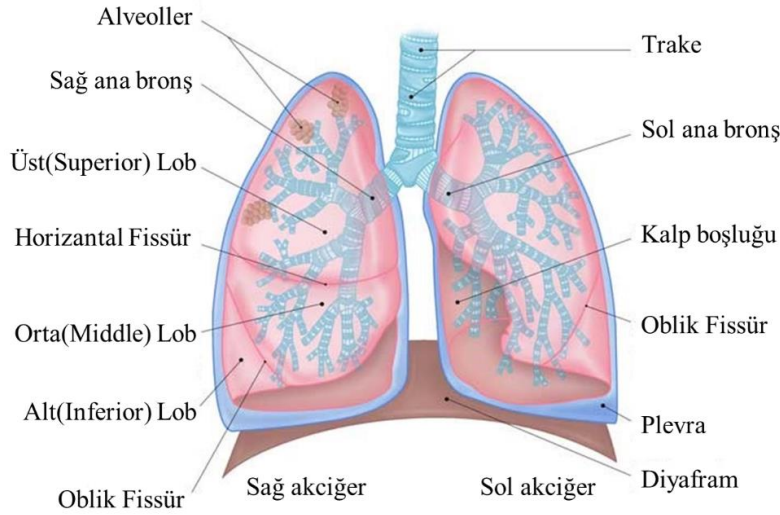
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Solunum Sistemi

Solunum sistemi, hücreler için gerekli olan oksijenin (O_2) atmosferden kana; metabolik olaylar sonucu oluşan karbondioksitin (CO_2) ise kandan atmosfere geçişini sağlamak üzere özelleşmiş bir sistemdir. Gaz değişimini sağlamak için solunum sistemi ve kardiyovasküler sistem birlikte çalışmaktadır [1]. Canlı vücudunda hava iletimi, havanın infiltrasyonu ve solunum işlevleri solunum sistemi tarafından yerine getirilir. Solunum sistemi, toraks-dışı bölge, trakeobronşiyol bölge ve alveolar bölge olmak üzere üç ana kısma ayrılmaktadır [2]. Üst solunum yolu olarak da adlandırılan toraks-dışı bölge, nazal ve oral kaviteler, farinks (yutak) ve larinks (gırtlak) bölgelerinden oluşurken; alt solunum yolu olarak adlandırılan trakeobronşiyol bölge, trake, bronşlar, bronşiyoller ve alveollerden oluşmaktadır [2, 3].

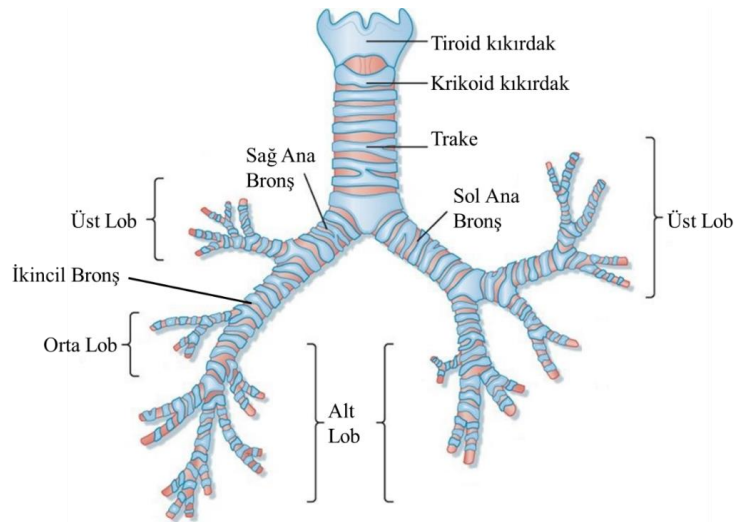
2.1.1. Akciğerin Anatomik Yapısı ve İşlevi

Akciğerler, göğüs boşluğunda yer alarak kalbi her iki yandan çevreleyen, gaz alışverişinin gerçekleştiği organdır [4]. Akciğerler, mediastinal boşluk yardımıyla sağ ve sol akciğer olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Sağ ve sol akciğerler ise fissürler yardımıyla loblara ayrılmaktadır. İnsanda, sağ akciğer oblik ve horizontal fissürler yardımıyla üç loba ayrılırken, sol akciğer oblik fissür yardımıyla iki loba ayrılmaktadır [1]. Her bir akciğer, plevral membran (plevra) adı verilen çift katlı seröz bir zar ile korunmaktadır. Mediasten ve göğüs duvarının iç yüzünü örten dıştaki zar “parietal plevra” olarak adlandırılırken; akciğer parankimini saran iç yüzeydeki zar “visseral plevra” olarak adlandırılmaktadır [5]. İki tabaka arasında kalan boşluğa plevral boşluk denilmektedir. Bu boşluk içindeki sıvı, membranlar arası sürtünmeyi azaltarak, soluk alıp verme sırasında akciğerlerin hareketini ve işlevini düzgün bir şekilde yerine getirmesini sağlamaktadır [5, 6]. Akciğerin makroskobik anatomisi Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



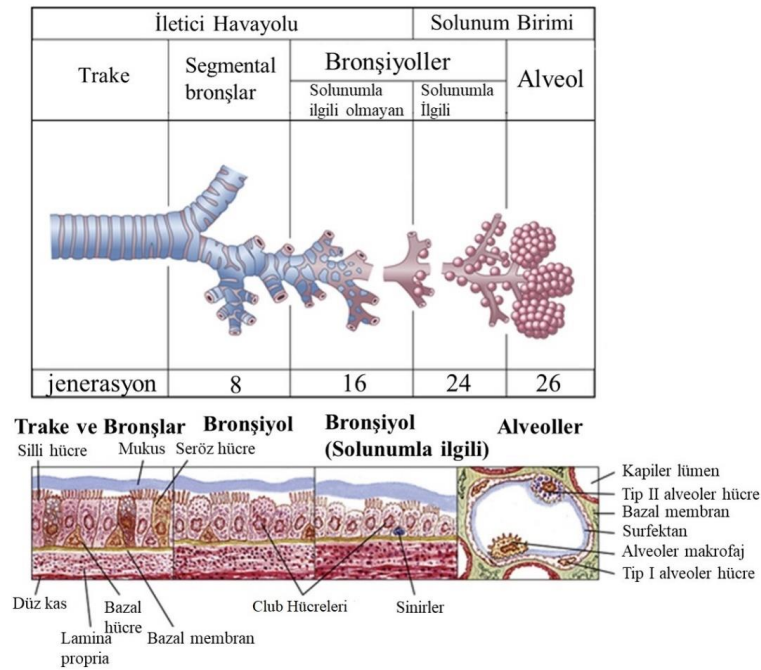
Şekil 2.1. Akciğerin genel görünüşü [7]

Alt solunum yolu anatomisinin temel yapısını “bronşiyal ağaç” oluşturmaktadır [8]. Bronşiyal ağaç “iletici havayolu” (conducting zone) ve “solunum bölgesi” (respiratory zone) olarak iki kısma ayrılmaktadır. İlk kısım, gaz alışverişinde görev almayan, ancak havanın iletimini sağlayan, trake, bronşlar, bronşiyoller ve terminal bronşiyoller kapsamaktadır. İkinci kısım ise respiratuvar bronşiyol ve alveolleri içeren gaz alışverişinin gerçekleştiği bölgeden oluşmaktadır [9]. Trake, bronşiyal ağacın başlangıç kısmında yer almakta ve hava iletimi için geniş bir kanal işlevi görmektedir. Trake, sağ ve sol olmak üzere iki ana bronşa ayrılmaktadır [10]. Ana bronşlar da dallanarak daha küçük bronş ve bronşiyoller oluşturmaktadır. Bu bronşların terminal kısımlarında ise gaz alışverişinin gerçekleştiği akciğerin fonksiyonel birimi olan alveoller bulunmaktadır [11]. Bronşiyal ağacın anatomik yapısı Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Bronşiyal ağacın genel görünümü [12]

Bronşiyal ağaç, hava iletimi, patojenlerin uzaklaştırılması, mukus üretimi ve taşınmasında etkili bir rol oynamaktadır [13, 14]. Bronşiyal ağacı oluşturan her bir yapının kendine özgü anatomisi ve işlevi bulunmaktadır [15]. Trake ve bronşlar, stabilite ve mukavemeti sağlayan, düz kaslara bağlı C-şekilli kıkırdak yapılardan oluşmaktadır. Kıkırdak yapısı, trakeden terminal bronşlara doğru ilerledikçe kaybolmaktadır [8, 16]. Ayrıca tüm solunum yolu, solunum işlevlerinin düzgün yerine getirilmesi ve olası dış etmenlerden korunmak için epitel hücre ile çevrilidir. Epitel hücre ve farklı hücre tipleri (Club hücreleri, goblet hücreler gibi) de trake, bronş, bronşiyol ve alveol bölgeleri boyunca spesifik fonksiyon ve mekanizmaları yerine getirecek şekilde farklılaşmaktadır (Şekil 2.3) [11].



Şekil 2.3. Havayolu ağacı boyunca farklılaşan hücre tipleri [17]

2.1.2. Ekstraselüler Matriks ve Akciğer Ekstraselüler Matriksi

Ekstraselüler matriks (ESM), tüm organ ve dokularda bulunan hücre dışı elementler olarak tanımlanmaktadır [18]. ESM, hücresel bileşenlere mekanik destek sağlamakla birlikte, doku homeostazisi, farklılaşması ve onarımı için gerekli olan sinyal iletişimini gerçekleştirmektedir. Aynı zamanda hücre-hücre etkileşimlerinde de rol oynamaktadır [19].

Ekstraselüler matriksin major bileşenleri fibröz proteinler (kolajen ve elastin), glikoproteinler (laminin ve fibronektin) ve proteoglikanlardır [18, 20]. Kolajen ve elastin yapısal proteinlerdir. Bu proteinler hücrelere mekanik dayanım ve esneklik sağlamaktadır. Laminin ve fibronektin proteinleri ise hücre tutunması, hücre-matriks etkileşimi gibi fonksiyonlarda görev almaktadır [21]. Ekstraselüler matriksin bir diğer ana bileşeni olan proteoglikanlar, biyolojik fonksiyonların yerine getirilmesi için büyük bir öneme sahiptir. Proteoglikanlara yan zincir olarak bağlanan ve tekrarlı disakkarit dizilerinden oluşan anyonik polisakkarit olan glikozaminoglikanlar (GAGs) hücrede çeşitli biyolojik fonksiyonların gerçekleşmesini sağlamaktadır. Proteoglikanlar, büyüme faktörleri ve büyüme faktörü reseptörleri ile etkileşime girmektedir. Ayrıca sitokinler ve matriks enzimleri gibi birçok molekül ile ilişkili olarak hücre içi sinyalleşme ve biyolojik işlemlerde rol almaktadır [22, 23].

2.1.2.1.Kolajen

Yara iyileşmesi, morfogenez, hücre göçü ve hücre tutunması gibi işlevlerin yerine getirilmesinde önemli bir rol oynayan kolajen, ESM'de en çok bulunan yapısal proteindir [24]. Hayvansal bir protein olan kolajen, vücuttaki toplam proteinlerin %25-35'ini oluşturmaktadır [25]. Aminoasit dizilerinin tekrarlı tripeptit yapılarından meydana gelen kolajen molekülünün yaklaşık 28 farklı türü bulunmaktadır [26]. Bu tripeptit α zincirlerinin bir araya gelmesiyle kolajen molekülünün karakteristik özelliği olan üçlü sarmal yapısı meydana gelmektedir. Üçlü sarmal yapıyı oluşturan aminoasitlerden biri glisindir. Bu nedenle kolajenin birincil yapısı $[\text{Gly-X-Y}]_n$ olarak formülize edilmektedir. Formülize edilen gösterimdeki X ve Y ifadesi yerine herhangi bir aminoasit gelebilmektedir, ancak bu X ve Y pozisyonlarının %20'sini prolin ve hidroksprolin oluşturmaktadır. Bu aminoasitlerin uygun dizilimi kolajenin sekonder yapısı ve stabilitesi açısından önemlidir [27].

Kolajenler yapısal özelliklerine göre farklı alt gruplara ayrılmaktadır. Tip I, II ve III kolajenler fibril kolajenler olarak adlandırılırken; Tip IV, V ve VI kolajenler fibril olmayan amorf kolajenlerdir [20]. Yetişkin akciğerinde en çok bulunan kolajen Tip I kolajendir. Tip III kolajen de akciğerde yüksek oranda bulunmaktadır. Tip I kolajenler daha kalın ve daha çok çapraz bağ içeren fibrilden oluşurken, Tip III kolajenler daha esnektir ve bozulmaya karşı hassastır. Tip IV kolajen, bazal membranın ana bileşenidir ve bazal membranı oluşturan diğer bileşenlerden olan laminin ve proteoglikanların

bağlanması için iskele görevi görmektedir. Tip II, IX ve XI kolajenler ise kıkırdak kolajeni olarak adlandırılmakta ve trakenin ana bileşenini oluşturmaktadır [20, 27].

2.1.2.2.Elastin

Elastin, esas olarak akciğerin her soluk alış-verişte genişleme ve eski haline dönme sırasındaki elastikiyetinden sorumlu bileşendir. Bunun dışında, ekstraselüler matriks esnekliği ve mekanik bütünlüğünü sağlamanın yanı sıra, hücre davranışlarının düzenlenmesinde de rol almaktadır. Elastin de kolajen gibi yapısal bir proteindir ve akciğerin interstisyel matriksinde bolca bulunmaktadır. Ayrıca, elastikiyetin önemli olduğu alveol, plevra, havayolu ve damarlarda da elastin yoğunluğu fazladır [25, 27]. Pulmoner kan damarlarında elastin içeriği %7-16 gibi bir değere sahiptir, havayolu elastin içeriği ise %3-5'tir [28].

Elastinler havayolu epitel hücreleri, fibroblast, endotel, düz kas hücreleri, kondrositler ve keratinositler gibi çeşitli hücrelerden “tropoelastin” adı verilen 60-70 kDa'lık bir öncü protein monomeri olarak sentezlenmektedir. Tropoelastin monomerlerinin lizil oksidaz enzimi aktivitesi sonucu çapraz bağlanma yoluyla olgun elastinler oluşmaktadır. Olgun elastinler, fibrillin, fibuin, Tip VIII kolajen ve diğer proteinlerin yardımıyla elastik fiberlerin oluşmasını sağlamaktadır [25]. Elastik lifler, %90 tropoelastin ve %10 mikrofibril proteinlerinden oluşmaktadır. Mikrofibriller ise elastin agregasyonu için iskele sağlayan protein olan fibrillin, mikrofibriller ile ilişkili glikoproteinler ve TGF- β (Transforming growth factor-beta) bağlayıcı proteinlerden oluşmaktadır. Akciğer elastikiyetini sağlamak için mikrofibril veya proteoglikanlar yardımıyla da mekanik olarak kolajenlere bağlanmaktadır [26, 29].

Tropoelastinlerin aksine çapraz bağlanma sonucu oluşan elastin lifler son derece çözünmez hale gelmektedir. Bu yapısal özellikleri sayesinde elastin lifler protein degradasyonuna karşı stabilite ve direnç göstermektedir [26]. Olgun elastinler tripsin ve kimotripsin benzeri proteazlar ile parçalanmamaktadır. Elastinin degradasyonuna yol açan proteazlar genellikle elastaz olarak adlandırılan alanin, glisin gibi küçük hidrofobik yan zincirlere sahip aminoasitleri içeren proteazlardır. Serin proteazlar da ağırlıklı olarak elastin degradasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca katepsinler ve matriksmetalloproteinaz (MMP) -2, -3, -7, -9, -10 ve -12 gibi proteazlar da elastolitik aktivite göstermektedir [28].

2.1.2.3. Glikoproteinler

Akciğer matriksinde yer alan glikoproteinler adezyon proteinleri olarak da adlandırılan hücre tutunmasında rol olan fibronektin, laminin, tenaskin, vitronektin gibi çeşitli proteinlerdir. Laminin ve fibronektin akciğer ESM'sinin majör proteinleri arasında yer almaktadır[24].

2.1.2.3.1. Laminin

Laminin proteini, molekül ağırlığı yaklaşık olarak 400-800 kDa olan, α , β ve γ zincirlerinden oluşan heterodimer yapıda bir glikoproteindir. Akciğer bazal membranında Tip IV kolajen molekülleriyle birlikte yer almaktadır. Lamininler hücre yüzey reseptörleri ve diğer ESM moleküllerine bağlanması açısından önemlidir. Birçok hastalık mekanizması ile yakından ilişkili olan lamininler embriyonik gelişim sürecinde de önemli bir yere sahiptir [22, 24]. Ayrıca bazal membranda gerçekleşen laminin ekspresyonunun akciğerde hücre farklılaşmasında rol oynadığı düşünülmektedir [27].

2.1.2.3.2 Fibronektin

Fibronektin, 230-250 kDa molekül ağırlığına sahip dimer yapıda bir glikoproteindir. Fibronektinin çözünür ve çözünmez formları bulunmaktadır. Çözünür formdaki fibronektin kan plazmasında bulunurken, çözünmez formda olan ve hücresel fibronektin olarak adlandırılan fibronektin ise epitel, fibroblast ve mezenkimal hücreler gibi çeşitli hücreler tarafından sentezlenmektedir [25, 30]. Fibronektin proteinleri, ekstraselüler matriks yapısı ve düzenlenmesi için kritik öneme sahiptir. Ayrıca hücre tutunması ve çoğalması, hücre göçü, hemostaz, embriyonik gelişim ve yara onarımı gibi pek çok biyolojik olayda rol almaktadır [25, 27]. Fibronektin proteini, sahip olduğu bağlanma yüzeyi ile ESM yüzeyine ve kolajen, tenaskin-C gibi diğer moleküllere tutunmaktadır [24].

Fibronektin proteini akciğerde genelde bazal membran ve interstiyumda bulunmasına karşılık, akciğer gelişimi sırasında dallanma bölgesinde yoğun olarak bulunmaktadır. Ayrıca fibronektinin dokudaki kolajen dağılım miktarı ile ilişkili olabileceği de düşünülmektedir [27].

2.1.2.4. Proteoglikanlar

Proteoglikanlar, bir çekirdek proteini ve doğrusal polisakkarit dizilerinden oluşan GAG proteinlerinin yan zincir olarak bağlandığı makromoleküllerdir [31]. Proteoglikanlar

mukopolisakkaritler olarak da adlandırılmaktadır [25]. Proteoglikanlar, bağ doku içerisinde lifli proteinleri kapsayan hidratlı ve jelatinimsi bir yapı oluşturmaktadır. Proteoglikanlar, sahip oldukları GAG grubuna ve büyüklüğüne göre sınıflandırılmaktadır. Proteoglikan aileleri, kondroitin sülfat içeren versikanlar, heparan sülfat içeren perlekan ve glipikanlar, kondroitin ve heparan sülfat içeren sindekanlar ve dermatan sülfat içeren dekorinler olmak üzere gruplara ayrılmaktadır. Bu proteoglikanlar akciğer ESM'sinin farklı bölgelerinde bulunmaktadır. Versikanlar interstisyumda bulunurken, dekorinler interstisyum ve epitelyal bazal membranda kolajen fibrillere bağlı olarak bulunmaktadır. Perlekanlar vasküler bazal membranda, sindekan ve glipikanlar ise hücre yüzeyinde bulunmaktadır [20, 23].

2.1.2.4.1. Glikozaminoglikanlar

Glikozaminoglikanlar, tekrarlı disakkarit dizilerinden oluşan doğrusal ve heterojen anyonik polisakkaritlerdir [20]. GAG'lar sülfatlanmış ve sülfatlanmamış olarak iki gruba ayrılmaktadır. Sülfatlanmış GAG'lar heparan sülfat, kondroitin sülfat, heparin, dermatan sülfat ve keratan sülfattır; sülfatlanmamış GAG'lar ise hyalüronik asitten oluşmaktadır. GAG'lar su dengesinin sağlanması, hücre tutunması, hücre göçü ve sinyal iletimi gibi önemli işlevlerden sorumludur [29].

ESM yapısında bulunan sülfatlanmamış GAG olan hyaluronik asit, bağ doku matrisini bir arada tutan ve stabilitesini sağlayan önemli bir bileşendir. Mezenkimal hücreler tarafından sentezlenen hyaluronik asit su dengesi, doku onarımında yer alırken, enfeksiyona karşı bir koruma görevi üstlenmektedir [20]. Sülfatlanmış GAG'lar ise hücre içinde sentezlenerek, sülfatlanmaktadır ve genellikle proteoglikanların yapısına katılmaktadır [32].

Akciğer parankiminde en çok bulunan GAG türleri heparan sülfat ve kondroitin sülfattır [31]. Heparan sülfat, hücre-matriks etkileşimi, kemokin ve büyüme faktörü aktivasyonu gibi fonksiyonlarda yer alırken; kondroitin sülfat ESM proteinlerinin aktivasyonu ve yıkımında meydana gelen biyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynamaktadır [32]. Ayrıca GAG proteinleri akciğer hastalıklarında görülen ESM yeniden yapılanmasıyla da ilişkilidir. Örneğin, heparin astımda meydana gelen havayolu aşırı duyarlılığı ve inflamasyonunda kritik bir öneme sahiptir. Heparin, kemokin ve sitokinlere bağlanarak doku hasarının hafifletilmesine katkı sağlayabilmektedir [25].

2.1.2.5. Akciğer Ekstraselüler Matriksi

ESM, temelde her doku için ortak bileşenlerden oluşmasına rağmen, matriks yapısı organın işlev ve anatomisine bağlı olarak dokudan dokuya farklılık göstermektedir [21, 26]. Akciğerin biyomekanik özellikleri yüksek oranda ekstraselüler matriks bileşenleri tarafından belirlenmektedir ve akciğer ekstraselüler matriksinin birçok önemli işlevi bulunmaktadır. Bunlar, mekanik gerilme, basınç dayanımı ve elastikiyet sağlama, interstisyel sıvı dinamiklerinin korunmasına katkıda bulunma, etkili bir gaz değişimi için havayolu direncinin düşürülmesi, büyüme faktörü, kemokin, sitokin ve hücre yüzey reseptörleriyle etkileşim kurarak hücre davranışlarının kontrolü, doku onarımı ve yeniden modelleme olarak sıralanabilmektedir [20]. Akciğer ekstraselüler matriksinin önemli kısmını kolajenler (Tip I, II, III, IV ve V) ve elastinler oluşturmaktadır. Bu yapısal proteinler, akciğerin soluk alıp verme sırasındaki mekanik dayanımına ve elastikiyetinin sağlanmasına yardımcı olmaktadır [24, 27]. Kolajenler akciğer kuru ağırlığının yaklaşık %60'ın oluştururken; elastinler yaklaşık %24'ünü oluşturmaktadır. Geriye kalan kısmını ise glikoproteinler (fibronektin, laminin vb.) ve proteoglikanlar oluşturmaktadır [26]. Proteoglikanlar akciğer ESM'sinin küçük bir kısmını oluşturmalarına rağmen pulmoner yapı ve fonksiyonlarının düzgün bir şekilde çalışması için oldukça önemli bir yere sahiptir [27]. ESM proteinlerinin miktarı bulundukları akciğer bölgesine göre değişmektedir, Akciğer ESM proteinlerinin dağılımı Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. ESM bileşenleri ve akciğerde bulunduğu bölgeler [27]

<i>ESM Bileşeni</i>	<i>Bulunduğu Yer</i>
<i>Kolajen Tip I</i>	Alveoler, bronşiyal ve vasküler duvarlar
<i>Kolajen Tip II</i>	Bronş ve Trake kıkırdağı
<i>Kolajen Tip III</i>	Tip I kolajenle birlikte bulunur
<i>Kolajen Tip IV</i>	Bazal membran
<i>Kolajen Tip V</i>	Bazal membran ve instertiyum
<i>Elastin</i>	Alveoler septa, kan damarları, bronş duvarları, plevra
<i>Laminin</i>	Bazal membran
<i>Fibronektin</i>	Bazal membran ve instertiyum
<i>Proteoglikanlar</i>	Alveolar duvar, bazal membran
<i>İntegrin (ESM reseptörleri)</i>	Mezenkimal ve epitel hücreler

Tüm organlarda olduğu gibi akciğer ESM'si de iki temel katmandan oluşmaktadır. Bunların ilki hücre ve dokulara destek sağlayan ve parankimi oluşturan interstiyel boşluklardır. İkinci katman ise epitel ve endotel hücrelerin altında özelleşen ince bir tabaka olan bazal membrandır [30, 33]. Ekstraselüler matriksin bu temel katmanlarının yapısı akciğer bölgesine göre değişmektedir [30]. Üst solunum yollarında ESM, daha çok havayolu çökmesinin engellemesi ve mukavemetinin sağlanması için yapısal destek elemanı olarak özelleşmişken, alt solunum yollarında birçok farklı ESM proteinin (laminin, fibronektin, kolajen, GAG, heparan sülfat, tenaskin-C, hyalüronan vb.) bir araya gelmesiyle özel bir yapı olan bazal membran tabakasını oluşturmaktadır [34, 35].

Akciğer ekstraselüler matriksi fibroblast, epitel, endotel ve immün hücreler gibi pek çok hücre tipi ile etkileşim halindedir [36]. Bu etkileşim oldukça önemlidir, çünkü alerjen, patojen, hava kirliliği gibi çevresel faktörler ile hasar gören epitel hücreler, dokudaki diğer hücrelerin fonksiyonunu etkileyen ESM yeniden yapılanmasını düzenleyebilmektedir. Bu nedenle birçok akciğer hastalığı ESM ile yakından ilgilidir [26].

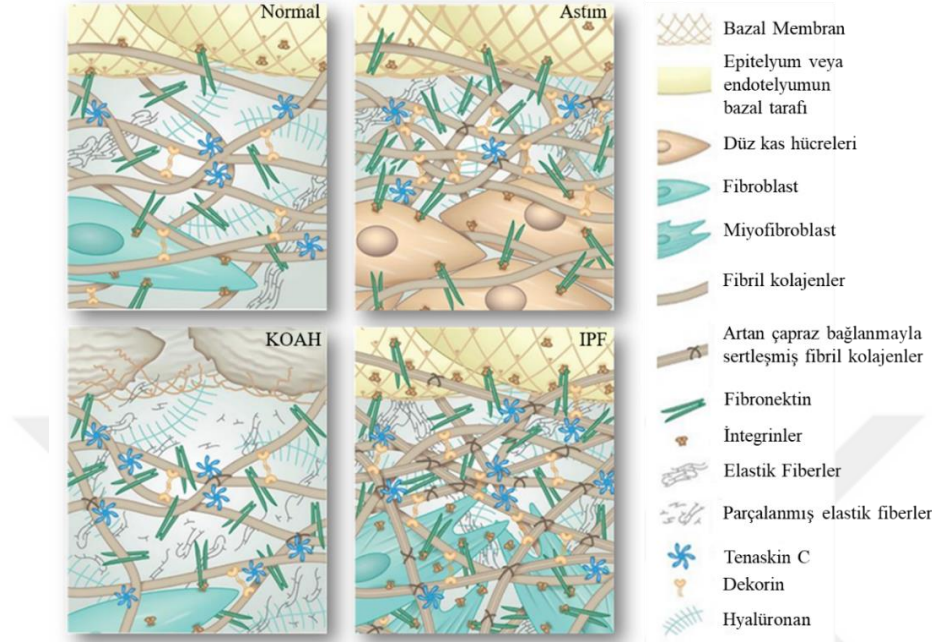
2.1.3. Akciğer Hastalıkları

Solunum yolu hastalıkları, solunum yolunu oluşturan doku ve hücrelerin hasara uğramasıyla gelişmektedir. Görülme sıklığı giderek yaygınlaşan havayolu hastalıkları dünya üzerinde milyonlarca kişiyi etkileyen önemli sağlık sorunlarından biridir [37].

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, her yıl 384 milyon kişi kronik obstrüktif akciğer hastalığından; 334 milyon insan astımdan etkilenmektedir ve 3 milyona yakın hasta KOAH nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Benzer şekilde her yıl 1,76 milyon hasta akciğer kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Bu oran akciğer kanserini en ölümcül kanser hastalıkları grubuna sokmaktadır [38, 39].

Akciğerler, toksik kimyasallar, bitki, hayvan, mantar ve bakteri kaynaklı alerjenler, dizel egzoz partikülleri gibi hava yolları üzerinde zararlı etkileri olan çevresel kirlleticiler ile sürekli olarak karşı karşıya gelmektedir. Sürekli olarak bu çevresel kirleticilere maruz kalan akciğer dokusu homeostaziyi korumak için devam eden doku onarımı ve rejenerasyon süreci geçirmektedir. Bu süreç havayolu yeniden modellenmesi (airway remodeling) olarak adlandırılmaktadır [40]. Bireyin genetik alt yapısına bağlı olarak havayolu hücrelerinin geçirmiş olduğu bu onarım ve yenilenme sürecinin yetersiz kalması sonucu astım, KOAH, idiyopatik pulmoner fibrozis (İPF), pulmoner arteriyel

hipertansiyon (PAH) gibi kronik havayolu hastalıkları ortaya çıkmaktadır [36]. Akciğer ESM yeniden yapılanması hastalıklara göre farklılık göstermektedir (Şekil 2.4.). Her bir hastalıkta yeniden modellenen ESM, çeşitli fonksiyonel sonuçlara yol açmaktadır [41].



Şekil 2.4. Sağlıklı durumda ve hastalıklarda ESM'nin yapısı [42]

2.1.3.1. Astım

Astım, birçok hücre ve hücresel elementin rol oynadığı havayolu kronik inflamatuvar bozukluğu olarak tanımlanmaktadır. Klinik semptomları, hırıltılı solunum, nefes darlığı, aşırı mukus üretimi, göğüs sıkışması ve öksürük ataklarına yol açan havayolu aşırı duyarlılığı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu semptomların çeşitli viral enfeksiyonlar, alerjenler, sigara dumanı, egzersiz ve stres gibi faktörlerle tetiklenebileceği ve ilerleyebileceği belirtilmektedir [29, 40]. Astım, akciğer dokusu ve havayolu duvarının kronik inflamasyonuna yol açmaktadır. Sonuç olarak, havayolunda inflamatuvar hücre ve mediyatörlerin (kemokin, sitokin, büyüme faktörü vb.) rol oynadığı çeşitli yapısal ve fonksiyonel değişiklikler meydana gelmektedir [29]. En belirgin yapısal değişiklik havayolu bazal membranın kalınlaşmasıdır. Subepitelyal bölgede fibronektin, hyalüronan, dekorin ve Tip I, III, IV kolajen birikmesi sonucu kalınlaşma olmaktadır [41, 42]. Aynı zamanda havayolu düz kas hücreleri ve goblet hücrelerinde hiperplazi meydana gelmektedir. Havayolu düz kas hücrelerinin fonksiyonu, yeniden yapılanma süreci ile yakından ilgilidir, çünkü ESM bileşenlerinin salgılanmasında görev almaktadır [42].

Sağlıklı bireylerde subepitelyal tabaka kalınlığı 5-6 µm iken, astımlı bireylerde bu kalınlığın 9 µm değerine ulaştığı belirtilmektedir [41].

2.1.3.2. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAİ)

DSÖ'nün tanımına göre KOAİ, akciğerdeki hava akışının kronik olarak tıkanmasıyla karakterize edilen bir akciğer hastalığıdır. Yakın bir zamana kadar KOAİ hastalığını tanımlamak için kullanılan “kronik bronşit” ve “amfizem” terimleri artık kullanılmasa da hastalığın teşhisinde etkili olan önemli fizyolojik değişimlerdir [40]. Sigara kullanımı KOAİ gelişimine neden olan en önemli faktörlerinden biridir.

KOAİ'ta görülen hava akışının kronik olarak tıkanması üzerinde etkili çeşitli fizyolojik değişiklikler bulunmaktadır. Bunlardan ilki havayolu duvarının kalınlaşmasına neden olan küçük havayolu yeniden yapılanmasıdır. Diğerleri, havayolunda meydana gelen kayıplar ve amfizem olarak adlandırılan alveol hava keseciklerinin genişlemesidir [42]. KOAİ'ta görülen antiinflamatuvar yanıt genellikle sayılarında artış görülen makrofaj, nötrofil, CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositleri gibi inflamatuvar hücreler ve proteazların artışında rol oynayan fibroblastlar ile yakından ilişkilidir [29]. KOAİ sırasında ortaya çıkan en belirgin yapısal değişiklik elastik liflerin, inflamatuvar hücrelerden salınan MMP gibi ESM proteinlerini parçalayan enzimler tarafından yıkıma uğramasıdır. Diğer yapısal değişiklikler hiyalüronan ve tenaskin C seviyesinde artış olması ve dekorin birikiminin azalmasıdır [29, 42].

2.1.3.3. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF)

İdiyopatik pulmoner fibröz, nedeni henüz bilinmeyen faktörlerden dolayı ESM proteinlerinin aşırı birikimi ve akciğerin yeniden yapılanma sürecine girmesi ile karakterize edilen bir akciğer hastalığıdır. Hastalığın teşhisi radyolojik ve fizyolojik bulgularla gerçekleştirilmektedir [43]. Akciğer dokusunda meydana gelen sertleşme solunum fonksiyonlarını etkileyerek nefes darlığı gibi klinik semptomlara neden olmaktadır.

İPF, fibroblast üretimi ve apoptozu ile ESM bileşenlerinin aşırı birikimi ve bozulması prosesleri ile yakından ilgilidir. Ayrıca, İPF gelişimi sırasında fibroblastlar, ESM sertliğini önemli ölçüde arttıran miyofibroblastlara dönüşmektedir. Bu durum, ESM bileşenlerinin birikimiyle birlikte kolajen ve elastinlerin çapraz bağlanması sonucu İPF'nin en belirgin yapısal değişikliği olan rijit yapının oluşmasına yol açmaktadır [42, 43].

2.1.3.4. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon (PAH)

Pulmoner hipertansiyon, vücuttaki kirli kanın temizlenmesi için kanı kalbin sağ tarafından akciğere getiren damarlar olan pulmoner arterdeki kan basıncının artması sonucu meydana gelen bir hastalıktır. PAH, nadir görülen hastalıklar arasında yer almasına rağmen ilerleyici bir hastalık olması nedeniyle önemlidir. Semptomları arasında göğüs sıkışması, nefes darlığı, çarpıntı, çabuk yorulma ve halsizlik görülmektedir [44].

PAH hastalığı, endotel hücrelerin fonksiyonlarında meydana gelen bozulma ve vasküler yeniden yapılanma ile karakterize edilen bir hastalıktır. Hastalık sırasında meydana gelen ESM yeniden modellenmesinde fibronektin ve tenaskin-c miktarlarında; elastin ve kolajen sentezinde ve düz kas hücrelerinin hiperplazisinde artış meydana gelmektedir. Pulmoner arterlerin yeniden şekillenmesi sonucu hiyaluronik asit gibi GAG'ların birikiminde de artış gözlenmektedir. Ayrıca MMP'lerin PAH patogeneğinde etkili bir rol aldığı düşünülmektedir [42].

2.1.3.5. Kistik Fibroz

Kistik Fibroz, salgı bezlerinin etkilenmesiyle birçok organda fonksiyon bozukluğuna yol açan genetik bir hastalıktır. Kistik Fibroz vücutta yer alan özellikle mukus üreten belirli salgı bezlerini etkilemektedir. Akciğer, pankreas, karaciğer, bağırsak gibi salgı bezleri ile yakından ilişkili organlar bu hastalıktan öncelikli olarak etkilenmektedir. Hastalığın semptomları arasında kalıcı öksürük, nefes darlığı ve akciğer enfeksiyonunun yanında, pankreas ve bağırsak obstrüksiyonu gibi bulgular yer almaktadır [44].

Kistik Fibroz hastalığı, Kistik Fibroz Transmembran Regülatör (CFTR) geninde meydana gelen mutasyondan kaynaklanmaktadır. CFTR geninde meydana gelen mutasyon sonucu sodyum dengesi bozulmaktadır. Bunun sonucunda, mukus taşınımı gibi çeşitli fonksiyonlarda aksaklıklar meydana gelmektedir. Bu nedenle meydana gelen mutasyondan ilk olarak epitel hücreler etkilenmektedir. Ayrıca, havayolu epiteli çeşitli patojen enfeksiyonlarına daha duyarlı hale gelmektedir [45].

2.1.3.6. Bronşektazi

Bronşektazi, enfeksiyon ve inflamasyon sonucu havayolunun aşırı genişlemesi olarak tanımlanmaktadır. Geri dönüşümsüz olan bu hastalık kronik öksürük, KOAH ve tekrarlayan havayolu enfeksiyonlarına yol açmaktadır. Bronşektazi patogeneğinde nötrofil ve makrofaj gibi inflamatuvar hücreler etkili bir rol oynamaktadır. Ayrıca, bronşiyal duvar, elastin ve düz kas hücrelerinin azalması sonucu zayıflamaktadır.

Hastalığın semptomları arasında öksürük ve balgam çıkartma bulunmaktadır. Ayrıca, havayolu kanaması da yaygın görülen semptomlardan biridir [46].

2.1.3.7. Alfa-1 antitripsin eksikliği (AATD)

Alfa-1 antitripsin eksikliği, serin proteaz inhibitör (SERPIN) proteini tarafından salgılanan bir glikoprotein olan α_1 -antitripsin düşük seviyede olmasıyla karakterize edilmektedir. SERPINA1 geni üzerinde bulunan bu protein α_1 -proteinase inhibitör olarak da adlandırılmaktadır. Bu glikoproteinin eksikliği çeşitli akciğer ve karaciğer hastalıklarına neden olmaktadır. α_1 -antitripsin eksikliğinin amfizem ile yakından ilgili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, α_1 -antitripsin seviyesinin düşüklüğü kişiyi KOAH ve bronşektazi gibi akciğer hastalıklarına yatkın hale getirmektedir [44, 47].

2.1.4. Akciğer Hastalıklarıyla İlgili Tedavi ve Yaklaşımlar

Astım, KOAH gibi kronik havayolu hastalıkları, dünya üzerinde milyonlarca kişiyi etkilemektedir. Görülme sıklığı giderek artan akciğer hastalık mekanizmalarının anlaşılması ve tedavi edici yaklaşımların geliştirilmesi klinik araştırmaların ilerlemesine büyük katkı sağlamıştır. Ancak günümüzde halen pek çok kronik akciğer hastalığının kesin tedavisi bulunmamaktadır. Mevcut tedaviler, semptomların azaltılması ve kontrol altında tutulmasına yönelik ilaç tedavileridir [48, 49]. Ayrıca son evreye ulaşan akciğer hastalıklarının tedavisinde cerrahi müdahaleye başvurulmakta ve organ nakli tek çözüm olarak değerlendirilmektedir [50]. Akciğer naklini gerektiren hastalıkların başında KOAH, İPF, kistik fibroz, AATD ve PAH gelmektedir. Trake çökmesi, bronşektazi ve çeşitli etkenler sonucu akciğerin havayolu, parankim ve plevra kısmında meydana gelen bazı yaralanmalar da cerrahi müdahale gerektiren durumlar arasındadır [51].

Günümüzde uygulanan astım ilaçları kontrol edici ve semptom giderici ilaçlar olarak iki gruba ayrılırken; KOAH tedavisinde yaygın olarak kullanılan terapötik araç bronkodilatör ilaçlardır [49]. Bu ilaçlar bronşlardaki düz kasların gevşemesine yardımcı olarak öksürük, göğüs sıkışması gibi semptomları azaltmakta ve havayolunu rahatlatmaktadır [49, 52]. Bu hastalık semptomlarının giderilmesinde anti-inflamatuar ajanlar (kortikosteroidler) ve Beta2-agonist gibi farmasötikler, inhalerler ile birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır [53]. PAH tedavisinde prostaglandin, endotelin reseptör antagonisti gibi onaylı ilaç tedavileri uygulanmaktadır [44]. Kistik fibröz tedavisi henüz bulunmamaktadır. Ancak hastalığın tedavisinde inhale antibiyotik gibi çeşitli ilaçların kullanımıyla birlikte gen terapisi, kök hücre transplantasyonu gibi genetik ve doku

mühendisliği yaklaşımları ön plana çıkmaktadır [54]. İPF tedavisinde en yaygın kullanılan tedavi ise antifibrotik ilaç tedavisidir. Ayrıca İPF, ilerleyici ve kronik bir hastalıktır. Hastalığın ileri seviyelerinde ise cerrahi müdahalelere ve transplantasyona başvurulmaktadır. Akciğer hastalıklarının ilaç dışı tedavilerinde ise genel olarak oksijen tedavisi ve pulmoner rehabilitasyon gibi yöntemler kullanılmaktadır [55].

Akciğer hastalık mekanizmalarının anlaşılması ve tedavi sistemlerinin iyileştirilmesi için yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir. Bu anlamda akciğer rejenerasyonu, ilaç geliştirme, kök hücre, doku mühendisliği gibi çalışmalar ön plana çıkmaktadır [56].

2.2. Doku Mühendisliği

“Doku Mühendisliği” terimi ilk defa 1988 yılında “National Science Foundation (NSF)” tarafından düzenlenen bir konferansta resmi olarak tanımlanmıştır. Bu tanımda doku mühendisliği, “normal ve patolojik memeli dokularında, yapı-fonksiyon ilişkisinin anlaşılması ve doku/organ işlevinin onarımı veya yenilenmesine yönelik biyolojik olarak yerine geçebilecek modellerin geliştirilmesi için uygulanan mühendislik ve yaşam bilimleri ilke ve yöntemler bütünü” olarak ifade edilmiştir [57, 58]. Daha sonra 1993 yılında Langer ve Vacanti yapmış olduğu çalışmalar ışığında doku mühendisliğini “Doku/organ fonksiyonlarının geri kazandırılması, devam ettirilmesi veya iyileştirilmesi için mühendislik ve yaşam bilimleri ilkelerini birleştiren disiplinler arası bir uygulama alanı” olarak tanımlamıştır [58, 59].

Doku mühendisliği uygulamaları üç temel bileşene dayanmaktadır. Bunlar, hücre, indükleyiciler (sitokin ve büyüme faktörleri vb.) ve doku iskeleleridir (tissue scaffold). Doku mühendisliğinin temel yaklaşımı, çalışmanın amacına uygun hücreleri, gerekli biyoaktif indükleyicilerle destekleyerek uygun doku iskeleleri üzerinde çoğaltıp elde edilen greftin hasarlı dokuya transplantasyonunu sağlamaktır [59].

Hücre kaynağı, doku mühendisliği uygulamalarının başarısında oldukça önemli bir faktördür. Çünkü, uygun sayıda hücre çoğalmasını sağlamakla birlikte hücrelerin kendi ekstraselüler matrikslerini oluşturabilme ve spesifik biyolojik fonksiyonlarını devam ettirebilme kapasiteleri büyük önem taşımaktadır [60]. Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan hücre türleri otolog, allojenik ve ksenojenik hücrelerdir. Otolog hücreler yüksek aktivite gösterdiği sürece en çok tercih edilen hücrelerdir. Çünkü kişinin kendisinden alınıp uygulandığı için herhangi bir immün yanıt oluşturmamaktadır. Ancak kişinin yaşlı olması veya ciddi bir hastalık durumlarda otolog hücreler yetersiz

gelmekte, allojenik ve ksenojenik kaynaklara başvurulmaktadır. Allojenik hücreler aynı türün farklı bireylerinden ve ksenojenik hücreler de farklı bir türden alınan hücreler olduğu için immün yanıt oluşuma karşılık immün baskılayıcı ilaç kullanımı gerektirmektedir [61]. Primer hücreler her ne kadar immünojenik uyum açısından ilk tercih edilen hücreler olsa da dokudan elde edilen bu hücrelerin genelde çoğalma potansiyelinin düşük farklılaşmış hücreler olduğu bilinmektedir. Bu duruma alternatif olarak kök hücreler ön plana çıkmaktadır. Kök hücrelerin doku mühendisliği uygulamalarında kullanımı umut vadeci olmuştur. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (IPSCs) ve mezenkimal kök hücreler (MSCs) otolog hücre transplantasyonu ve doku rejenerasyonu çalışmaları için potansiyel kaynak olarak değerlendirilmektedir [60, 62].

Büyüme faktörleri hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için büyük öneme sahiptir. Bu büyüme faktörleri hücrenin kendisi veya çevresindeki hücreler tarafından salgılanmaktadır. Hücrelerin kendi ekstraselüler matrikslerini oluşturmalarında etkilidir. Bu nedenle doku mühendisliği çalışmalarının ilerlemesinde önemli bir yere sahiptir [61].

Doku mühendisliği çalışmaları için diğer temel bileşen doku iskeleleridir. Doku iskelesi kullanımının amacı, hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için uygun ortamın oluşturulmasıdır. Doku iskeleleri hedef dokuya özgül mekanik özelliklere sahip olmalıdır. Doku iskeleleri biyouyumlu ve biyoinert özelliklere sahip sentetik veya doğal polimerlerden üretilmektedir [62]. Doku iskelesi için yaygın olarak kullanılan sentetik polimerler, polikaprolakton (PCL), poliglikolik asit (PGA), polilaktik asit (PLA), polilaktik-ko-poliglikolik asit (PLGA) gibi polimerlerdir [61]. Sentetik polimerler ile elde edilen iskeleler kullanım amacına uygun olarak biyobozunur veya biyobozunur olmayan formlarda üretilebilmektedir. Kolajen, kitosan, aljinat, hyalüronik asit gibi polimerler ise doku iskelesi üretiminde kullanılan doğal polimerlerdir. Doku iskelesi üretimi için sentetik ve doğal polimerler kullanımının çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır [63, 64]. Sentetik polimerlerle daha kararlı bir yapıda ve standart üretime sahip doku iskeleleri elde etmek mümkündür. Sentetik polimerler kullanılarak yapılan üretimde iskelenin mekanik özellikleri ayarlanabilmektedir ve bu iskeleler doğal malzemelerden elde edilen iskelelere göre daha iyi bir mekanik dayanım göstermektedir. Aynı zamanda, iskele üretimi standart özelliklere sahip olarak tekrarlı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir [51, 65]. Ancak, sentetik malzemelerden elde edilen doku iskeleleri, spesifik bağlanma bölgeleri, biyoindüktif etki ve yapısal yeniden şekillenme

gibi doğal dokuya ait özelliklerden yoksundur. Bu durum çoğu zaman hücrelerin tutunma ve çoğalmasında çeşitli olumsuzluklara neden olmaktadır [66]. Doğal ürünlerden elde edilen doku iskeleleri, sentetiklerle karşılaştırıldığında doğal ortama daha uygun bir mikroçevre sağlamaktadır. Bu sayede hücre tutunması, çoğalması ve hücre-hücre etkileşimi daha etkili bir biçimde gerçekleşmektedir. Ancak, çoğu zaman doğal ürünlerden elde edilen iskelelerin kimyasal bileşimi net olarak bilinmemektedir. Ayrıca doğal ürünlerden elde edilen iskeleler bütün bir ESM yapısını yansıtmamaktadır. Doğal malzemelerden elde edilen iskelelerin diğer bir dezavantajı da bu malzemelerin elde edildikleri kaynaklar dolayısıyla üretimden üretime farklılık göstermeleridir [64, 66]. Doku iskelesi üretmek için elektro eğirme, dondurarak kurutma, gaz köpükleştirme, faz ayrımı, kendiliğinden düzenlenme (self-assembly), kalıplama, 3B baskılama ve deselülerizasyon gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [64, 67-69].

Klinik açıdan doku mühendisliği, rejeneratif tıp ve transplantasyon çalışmaları ile yakından ilgilidir. Bunun yanı sıra, doku mühendisliği uygulamaları klinik öncesi ilaç çalışmaları ve hastalık mekanizmalarının anlaşılması gibi *in vitro* çalışmalar için de oldukça önemli bir yere sahiptir [70].

2.3. Akciğer Doku Mühendisliği

Günümüzde görülme sıklığı giderek artan solunum sistemi hastalıkları, küresel bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Tedavi ve organ nakli bekleyen hasta sayısı her yıl giderek artmaktadır. Ayrıca, donör organ yetersizliği çeşitli klinik ihtiyaçları beraberinde getirmekte ve kritik bir sorun oluşturmaktadır. Bu durumun önüne geçmek için geliştirilen doku mühendisliği uygulamaları umut vadetmektedir [48, 71]. Bunun yanı sıra, kaza veya hastalık sonucu cerrahi müdahale gerektiren bazı hasarlarda bütün akciğer yerine belli bir bölgeye odaklanılmaktadır. Bu hasarların onarılmasında ise doku mühendisliği yöntemleri ile üretilen greftler yardımcı olmaktadır [51].

Akciğer, anatomik ve fizyolojik olarak farklı görevlere sahip hücrelerin oluşturduğu oldukça karmaşık bir organdır. Akciğer üzerinde kırkın üzerinde farklı hücre tipi bulunmaktadır. Ayrıca, bu hücrelerin yaklaşık %60'ını doğal bağışıklık ve homeostazinin korunmasına yardımcı olan immün hücreler oluşturmaktadır [72, 73]. Akciğerin fonksiyonel birim olan alveollere havanın düzgün şekilde iletilmesi için akciğer dokusu boyunca pek çok farklı yapı bulunmaktadır. Ayrıca akciğerler, gaz değişiminin gerçekleştirilmesi için vasküler sistemle uyum içerisinde bulunmaktadır [72]. Akciğerler,

kompleks yapıya sahip bir organ olmasına rağmen gelişen doku mühendisliği ve hücre kültürü teknolojileriyle birlikte birçok *in vivo* ve *in vitro* modelin geliştirilmesi sağlanmıştır.

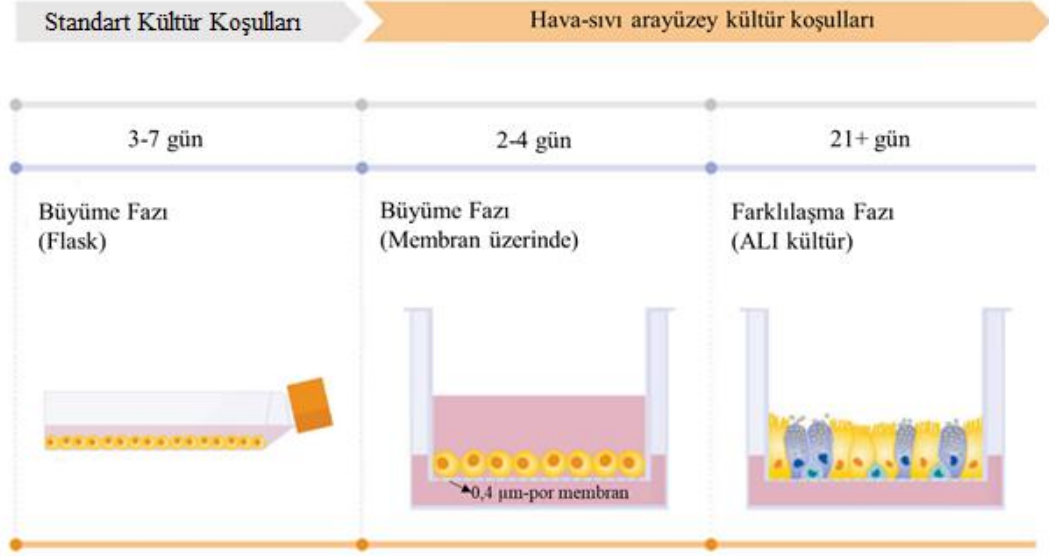
in vivo çalışmalar akciğer hastalık mekanizmalarının anlaşılması ve terapötiklerin geliştirilmesini sağlamak üzere kullanılan hayvan modellerini kapsamaktadır. Hayvan model sistemleri laboratuvar uygulamaları ve klinik araştırmalar arasında köprü görevi görmektedir. Ayrıca, *in vivo* model sistemleri, klinik çalışmalardan önce laboratuvar bulgularının ve hipotezlerin doğrulanması açısından oldukça önemlidir [74]. *in vivo* model için seçilecek organizmanın insan akciğerinin anatomi ve fizyolojisini yansıtabilecek özelliğe sahip olması gerekmektedir. Bu nedenle, akciğer modellemesi için fare, sıçan, domuz, koyun ve primatlar yaygın olarak kullanılmaktadır [75]. Hayvan modeli çalışmalarında, çeşitli antijenler kullanılarak hastalık indüklenebilmektedir. Bu sayede, hastalık patogenezinde rol oynayan değişkenlerin anlaşılması ve incelenmesi mümkün hale gelmektedir. Ayrıca, hayvan modelleri kök hücre ve *in vivo* transplantasyon uygulamaları için de son derece önemlidir [76]. Hayvan modeli, akciğer çalışmalarında çok önemli bir yere sahip olmasına rağmen bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Hayvan modeli, insanda ortaya çıkan hastalığın tüm özelliklerini ve fenotipini yansıtamamaktadır [77]. Akciğer anatomisi ve fizyolojisi türler arasında farklılık göstermektedir. Bu da deney hayvanlarından elde edilen sonuçların, insan havayolu hastalıkları üzerindeki etkisinin yorumlanmasını zorlaştırmaktadır [78]. Ayrıca, hayvan model çalışmalarının tekrarlanabilirliği düşüktür ve bu çalışmalar yüksek maliyetlidir [70, 77]. Bunun yanı sıra, deney hayvanlarının laboratuvarlarda kullanılması, etik kurallara uyulmasını gerektirmektedir. Bu kurallar Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health (NIH)) tarafından “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” adıyla yayımlanmıştır ve bu rehberde yer alan gereksinimleri karşılamayan modeller kabul edilmemektedir [77]. 1959 yılında William Russell ve Rex Burc tarafından yayınlanan “İnsani Deney Tekniği Prensipleri”nde hayvan deneyleri için 3R olarak adlandırılan ilkeler açıklanmıştır. Bu ilkeler Reduction (azaltma), Replacement (yerine koyma), Refinement (iyileştirme) olarak ifade edilmiştir [79]. *in vitro* modeller hayvan modellerinin sahip olduğu ve yukarıda kısaca verilen sorunlar karşısında iyi bir alternatif oluşturmaktadır.

in vitro modeller klinik öncesi hücre-hücre etkileşimi, büyüme, çoğalma, farklılaşma, polarite, gen ve protein ekspresyonu gibi hücresel davranışların incelenmesi için uygun

platform oluşturmaktadır [80]. *in vitro* çalışmalar, her ne kadar akciğerde meydana gelen tüm hücresel süreçleri bütünüyle yansıtmasa da hayvan modeli ve klinik uygulamalara nazaran daha kontrollü, tekrarlanabilir ve gerçek zamanlı ölçülebilen deney sistemleri olması yönleriyle hayvan deneylerine göre avantajlıdır [81].

Doku mühendisliği uygulamalarının başarısını etkileyen faktörlerden biri hücredir. *in vitro* çalışmalarda en sık başvurulmuş hücre kaynağı ise hücre hatlarıdır. Primer hücreler fizyolojik işlevini korumaları yönünden büyük bir avantaja sahip olmalarına rağmen hücre hatlarına nazaran daha kısa ömürlüdür. Hücre hatları, primer hücrelere göre daha kolay kültüre edilebilmesi, tek donörden ölümsüzleştirildiği için donörler arası farklılık göstermemesi, primer hücrelere göre daha uzun süre kullanılabilmesi gibi avantajlara sahiptir [81]. Bu nedenle, hücre hatları, primer hücre kaynağına erişiminin sınırlı olabileceği durumlarda her zaman basit ve etkili bir çözüm olmuştur [70, 80].

1980'lerin sonunda geliştirilen ve *in vitro* model olan hava-sıvı arayüzey (air-liquid interface (ALI)) model sistemi akciğer hücre çalışmaları için neredeyse vazgeçilmez hale gelmiştir (Şekil 2.5). Bu modelde, hücreler geçirgen bir membran üzerine ekilerek, çoğalmaları için alt ve üst hazneye besiyeri eklenerek çoğaltıldıktan sonra, farklılaşma aşamasında hücrelerin üst kısmında bulunan besiyeri çekilerek hücreler sadece alttan beslenir. Böylece hücrelerin üst kısımda hava ile teması sağlanarak akciğer fizyolojisi *in vitro* koşullarda kısmi olarak taklit edilmektedir [70]. ALI hücre kültür modeli yardımıyla hastalıkların moleküler mekanizmasının anlaşılması, çeşitli ilaç ve toksikoloji çalışmaları yürütülmektedir [82]. Akciğer hava-sıvı arayüzey modellerinde en sık kullanılan epitel hücre hatları A549, BEAS-2B, 16HBE14o- ve Calu-3'tür. BEAS-2B ve 16HBE14o-bronşiyal epitel hücre hatlarıdır. Bu hücreler, havayolu yapısı ve fonksiyonlarının incelenmesi için uygundur. Calu-3 ve A549 ise akciğer adenokarsinom hücre hatlarıdır [81]. Calu-3 hücreleri hava-sıvı arayüzeyinde iyi bir epitelyum farklılaşmasıyla birlikte sil ve mukus oluşumu gösterebilmektedir. A549 hücre hatları ise alveolar epitel hücreler için iyi bir model oluşturmaktadır [81, 82].



Şekil 2.5. Hücrelerin hava-sıvı arayüzey yöntemiyle farklılaştırılması [83]

Üç boyutlu (3B) hücre kültürü çalışmalarında kullanılan diğer modeller sferoid ve organoidlerdir [70]. Bu modeller kendi kendine organize olabilen çoklu hücre sistemlerinin oluşturduğu organ benzeri yapılardır, ancak organ özelliklerini bütünüyle yansıtmamaktadır. Sferoid ve organoid kültürler daha çok kanser çalışmaları için kullanılmaktadır. Bu modeller, kanser hücrelerinin sinyal iletimi, mikroçevresi gibi özelliklerinin incelenmesiyle birlikte kanser kök hücresi, akciğer gelişimi, homeostazi araştırmaları için de oldukça faydalı olmaktadır [63, 84].

“Organ-on-Chips” modeller de akciğer doku mühendisliği için kullanılan *in vitro* sistemlerdir. Bu sistemlerin amacı, mikroakışkan teknolojisi kullanılarak akciğerin yapay ve minyatür bir modelinin çip üzerinde taklit edilmesidir [63, 85]. Bu sistemler genellikle organa spesifik belirli mekanizmaları anlamak için tasarlanmaktadır. Organın bütününe yansıtmaması bakımından limitasyonları bulunmaktadır. Bu nedenle, bu modeller genellikle hastalık fenotiplerinin çıkarılması, ilaç ve toksikoloji çalışmaları için elverişlidir [63]. Akciğer için yapılan mikroakışkan çip tasarımları ise “Lung-on-a-chip” olarak adlandırılmaktadır. Bu modeller akciğer hastalıklarının patofizyolojik nedenleri, solunum ve akciğer fonksiyonlarının mekanik etkileri, alveol-bariyer mikroçevresi ve hava-arayüzey etkileşimlerinin araştırılması gibi laboratuvar çalışmalarının yürütülmesinde etkilidir [85, 86].

3B baskılama teknolojisi son yıllarda yaygın olarak kullanılan doku mühendisliği uygulamalarından biridir. 3B biyoyazıcı teknolojisiyle birlikte ise rejeneratif tıp alanında önemli adımlar atılmıştır. 3B biyoyazıcıların temel prensibi, hücrelerin biyo-mürekkep

(bioink) olarak adlandırılan baskı materyalinin içerisinde bulunarak istenilen biyokimyasal ve yapısal özellikleri sağlayacak şekilde 3B baskılanmasıdır [63, 87]. 3B biyobaskılama teknolojisi akciğer modelleme çalışmaları için de kullanılmaktadır [88-90]. Bu modeller henüz klinikte kullanılamasa da kanser çalışmaları, ilaç araştırmaları, organ-on-a-chip cihazlarının üretimi gibi laboratuvar çalışmaları için iyi bir seçenek olduğu düşünülmektedir [87] .

Hidrojeller, ekstraselüler matriks bazlı doku mühendisliği uygulamalarında oldukça büyük bir öneme sahiptir. Hidrojeller 3B baskılama, mikrokalıplama, elektroegirme ve enjekte edilebilir doku iskelesi üretim teknolojileriyle uyumlu biyomalzemelerdir. Hidrojeller poli(vinil alkol) (PVA), poli(akrilik asit) (PAA) gibi sentetik polimerlerden sentezlenebildikleri gibi aljinat, kolajen, hyalüronik asit gibi doğal polimerlerden de sentezlenebilmektedirler [91]. Ayrıca Matrigel gibi hücre türevli ESM hidrojeller *in vitro* hücre kültürünü desteklemek için akciğer doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda hücreleştirilmiş dokulardan elde edilen ESM hidrojeller *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar açısından önem kazanmaktadır [92].

Doku iskelesi üretimi diğer organlarda olduğu gibi akciğer çalışmaları için de kritik bir öneme sahiptir. Akciğerin heterojen yapısı, rejenerasyon için üretilecek doku iskelesine yönelik bir takım kriterleri gerektirmektedir [93]. Öncelikle, her biyomateryalin taşıması gereken özellik olan biyoyuumluluk, hücre yapışmasını kolaylaştıracak yüzey özelliklerine ve uygun mekanik dayanıma sahip olmalıdır. Biyobozunur bir materyal ise hücre çoğalmasını destekleyecek kadar dokuda kalmalıdır. Akciğerin gaz değişimini gerçekleştirmek için sahip olduğu özellikleri destekleyecek yeterli elastikiyet ve gözenek yapısına sahip olmalıdır. Akciğer fonksiyonunun yerine getirilmesi için sürekli ventilasyonun sağlanmasına uyumlu olmalıdır [93, 94]. Bu kriterler dikkate alınarak üretilen uygun tasarım ve modellerle doku greftleri oluşturularak akciğer yenilenmesine katkı sağlanabilmektedir. Akciğer uygulamaları için üretilen doku iskelelerinin akciğerlerin doğal mekanik dayanımı ve elastikiyetini uzun süre sağlayacak yapıya sahip olması beklenmektedir. Bu nedenle akciğer doku mühendisliği uygulamalarında metal ve seramik biyomalzemeler yerine doğal ve sentetik polimerler tercih edilmektedir [6, 95]. Akciğer doku iskelelerinin oluşturulmasında yaygın olarak kullanılan doğal ve sentetik polimerler Çizelge 2.2’de gösterilmiştir [6]. Son yıllarda oldukça yaygınlaşan doğal doku iskelesi elde etme yöntemi olan deselülerizasyonun akciğer transplantasyonu için umut vadeditici olduğu düşünülmekte ve bu yöndeki çalışmalar hızla devam etmektedir [71].

Çizelge 2.2. Akciğer doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılan polimerler ve özellikleri [6, 95]

Sentetik Polimerler		Doğal Polimerler		
Polimer Adı	Özellik	Polimer Adı	Özellik	
Polilaktik Asit (PLA)	-Yüksek hücre uyumu -Gaz geçirgenliği -Geniş yüzey alanı ve ESM mikroyapısına uyum -Yavaş bozunma hızı -Düşük dayanıklılık	Kolajen	-Yüksek biyouyumluluk -Ayarlanabilir biyobozunurluk -Uyumlu mekanik özellikler ve esneklik -Yüksek hücre etkileşimi	
Poliglikolik Asit (PGA)	-Yüksek bozunma hızı -Yüksek Young Modülü -Çekme dayanımı kaybı -Düşük çözünürlük	Elastin	-Yüksek esneklik -Uzun stabilite -Yüksek biyoaktivite -Kendi kendine organize olma (self-assembly)	
Poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA)	-Modifiye edilebilir bozunma hızı -Etkin yüzey özellikleri	İpek Fibroin	-Etkili biyomekanik özellik -Modifiye edilebilir yüzey özellikleri -Yüksek biyouyumluluk ve biyobozunurluk	
Polikaprolakton (PCL)	-Yüksek viskoelastik özellikler -Biyobozunur -Hidrofobik yüzey özelliği -Düşük ıslanabilirlik ve hücre tutunması	Kitosan	-İlaç taşıyıcı sistemler için kullanışlı -İlaç emilimi ve biyoyararlanımı artırma -Biyouyumlu ve biyobozunur.	
Pulmoner İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Kullanılan Polimerler				
Polilaktik Asit (PLA)	Poli (laktik asit-ko-Glikolik Asit) (PLGA)	Polihidroksietilakrilamid (PHEA)	Polietilenimin (PEI)	Polietilen Glikol (PEG)

2.4. Deselülerizasyon

Deselülerizasyon, ekstraselüler matriks bileşenlerine zarar vermeden, immün yanıt oluşturabilecek hücre materyalinin doku veya organdan uzaklaştırılmasıyla doğal doku iskelesi üretim yöntemidir [51].

Deselülerizasyon ve dokuya özgü ESM çalışmalarının temeli 1979-1980 yıllarına dayanmaktadır [96, 97]. 1995 yılında Badylak ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir makalede biyomatriks adı verilen ekstraselüler matriks bileşenlerinin önemli bir kısmının korunduğu yeni bir izolasyon yönteminden bahsedilmiştir. Bu çalışma ilk deselülerizasyon çalışması olarak kabul edilmektedir [98, 99]. İlerleyen yıllarda deri, vasküler doku, kalp kapakçığı gibi dokuların deselülerizasyonu gerçekleştirilmiştir [100-102]. 2008 yılında ise Ott ve arkadaşları tarafından ilk perfüzyon yöntemiyle tüm organ deselülerizasyonu gerçekleştirilmiştir [103, 104]. Günümüzde ise birçok organ üzerinde etkili deselülerizasyon gerçekleştirme çalışmaları devam etmektedir.

Deselülerizasyon yönteminin amacı, dokunun doğal ekstraselüler matriks yapısını oluşturan kolajen, elastin ve GAG gibi temel proteinler korunurken, immün yanıt oluşturabilecek nükleer ve hücreyel bileşenlerin ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Bu yöntemle elde edilen iskeleler doğal dokunun mekanik ve biyokimyasal bileşimini yansıtmaları açısından önemlidir. Bu sayede deselülerize iskeleler yeniden hücrelendirilerek çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kullanılabilir. *in vitro* çalışmalarda hücre-matriks etkileşimi gibi çeşitli biyolojik olayların incelemesi ve takibi gerçekleştirilirken, *in vivo* çalışmalarda ise doku greftleri üretilmektedir [50].

2.4.1. Deselülerizasyon Yöntemleri

Deselülerizasyon yöntemleri fiziksel, kimyasal ve enzimatik olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Kullanılan yöntem matriks yapısının korunmasını ve deselülerizasyon işleminin başarısını etkilemektedir. Deselülerizasyon işleminin etkinliğini arttırmak için bazen kombine yöntemler (fiziksel/kimyasal veya kimyasal/enzimatik vb.) tercih edilmektedir [105].

2.4.1.1. Fiziksel Yöntem

Deselülerizasyonun fiziksel olarak gerçekleştirilmesi, hücre zarının fiziksel yöntemlerle parçalanarak hücreyel materyalin uzaklaştırılması prensibine dayanmaktadır. Fiziksel

yöntemler, dondur-çöz, hidrostatik basınç, elektroporasyon, sonikasyon ve süperkritik CO₂'dir [105, 106].

2.4.1.1.1. Dondur-Çöz:

Deselülerizasyon uygulamalarında yaygın olarak kullanılan fiziksel yöntemlerden biri dondur-çöz yapmaktır. Bu yöntemde, doku seri halinde düşük ve yüksek sıcaklıklara maruz bırakılmaktadır [66]. Genellikle sıcaklık değerleri -80/37°C olarak kullanılmaktadır [105]. Dokular önce -80°C'de, daha sonra hızlı bir şekilde 37°C su banyosuna alınarak belli bir süre bekletilir. Bu işlem tekrarlı döngü sayısı kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Yöntemin optimizasyonu sıcaklık farkı ve döngü sayısı belirlenerek yapılmaktadır [105]. Bunun yanı sıra, bu işlem sıvı azot ve oda sıcaklığındaki tampon çözelti kullanılarak da gerçekleştirilmektedir [66]. Dondur-çöz yöntemi akciğer, kalp kapakçığı, tendon ve bağ doku gibi pek çok dokunun deselülerizasyonunda kullanılmıştır [107-110]. Bu yöntemde, dondurma işleminden kaynaklı buz kristalleri oluşabilmektedir. Oluşan buz kristalleri ve sıcaklık geçişi sırasında dokuda mekanik kayıplar meydana gelebilmektedir [111].

2.4.1.1.2. Hidrostatik Basınç:

Yüksek hidrostatik basınç, hücre zarının parçalanması için dokuya 600 MPa'dan daha yüksek basınç uygulanması prensibine dayanmaktadır [105]. 200 MPa üzerinde basınç kuvvetiyle hücre zarı, 600 MPa üzerinde mikroorganizma membranı ve 900 MPa üzerinde basınç ile de virüs kapsüllerinin parçalandığı bilinmektedir [112]. Bu yöntem ile deselülerizasyon, karaciğer akciğer gibi yoğun bir ESM yapısına sahip olmayan doku ve organlar için daha etkilidir [66]. Hidrostatik basınç uygulamasında temel kriterler basınç kuvvetinin optimizasyonu, sıcaklık, uygulama süresi ve döngü sayısı olarak değerlendirilmektedir [105, 113]. Literatürde hidrostatik basınç ile deselülerizasyon yönteminin kullanımı ve optimizasyonu için bir çok yayın yer almaktadır [113-116]. Optimize edilmemiş ve çok yüksek değere sahip basınç uygulaması ESM'nin mekanik yapısına zarar vermektedir. Ayrıca, hidrostatik basınç yöntemi ile gerçekleştirilen deselülerizasyonda çekirdek hücre kalıntıları tam olarak uzaklaştırılamamaktadır, bu da çeşitli immün yanıtların oluşması potansiyeli taşımaktadır [105].

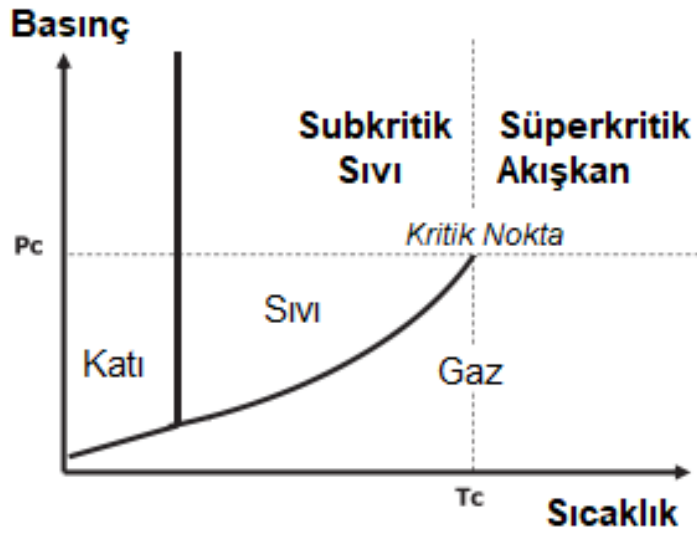
2.4.1.1.3. Sonikasyon:

Sonikasyon, yüksek frekansta ses dalgalarının oluşturduğu titreşimle birlikte hücre veya çeşitli kimyasal bileşiklerin parçalanması yöntemidir. Kimyasal ve enzimatik işlemlerle

birlikte hücre parçalanması ve homojenizasyon için yaygın olarak kullanılan sonikasyon işlemi, aynı zamanda fiziksel deselülerizasyon yöntemlerinden biridir [66]. Bu yöntem kimyasal ya da diğer fiziksel metodlarla birleştirilebilmektedir. Sonikasyon uygulaması, böbrek [117], larinks [118] ve aort [119] gibi dokuların deselülerizasyonu için kullanılmıştır.

2.4.1.1.4. Süperkritik CO₂ (sCO₂):

Süperkritik akışkanlar, ilk defa 1822 yılında Charles Cagniard de la Tour tarafından tanımlanmış, 1869 yılında ise Thomas Andrews tarafından adlandırılmıştır [120]. Süperkritik akışkan, maddenin fiziksel hal değişiminin iki boyutlu gösterimini yansıtan Basınç (P)-Sıcaklık (T) faz eğrisine göre tanımlanmaktadır. Basınç-sıcaklık diyagramında sıcaklık ve basınç arttıkça sıvı-buhar dengesini ifade eden eğrinin sonuna gelinmektedir, bu noktada sıvı ve gazın yoğunlukları birbirine yaklaşmaktadır. Bu noktanın üzerinde buharlaşma ısı sıfırdır ve iki faz birbirinden tam olarak ayıramamaktadır. Bu noktaya kritik noktası denilmektedir ve bu noktadaki basınç değeri P_c ; sıcaklık değeri ise T_c olarak ifade edilmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Süperkritik akışkanların genel gösterimi [121]

Bu noktanın üzerindeki maddeler “akışkan” olarak adlandırılmaktadır [120, 121]. Süperkritik akışkanlar, hem gaz hem de sıvı özelliklerini taşımaktadır. Yoğunlukları sıvılara benzerken, viskozitesi gazlarınkine benzerdir, yayınlılıkları (diffusivity) ise gaz ve sıvı halleri arasındadır (Çizelge 2.3) [122].

Çizelge 2.3.Sıvı, gaz ve süperkritik akışkanların fiziksel özelliklerinin gösterilmesi [121]

Özellikler	Viskozite (η , Pa.s)	Yayınırılık (D , m ² /s)	Özgül Ağırlık (ρ , kg/m ³)
Sıvı	10 ⁻³	10 ⁻⁹	600-1600
Gaz (Oda sıcaklığı, P ve T)	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	0,6-2
Süperkritik Akışkan ($T \sim T_c$, $P \sim P_c$, $T \sim T_c$, $P \sim 4P_c$)	10 ⁻⁵ -10 ⁻⁴	10 ⁻⁸	100-900

Süperkritik akışkanların düşük viskozite ve yüksek yayınırılık özelliklerine sahip olması ekstraksiyon işlemi için büyük bir avantaj sağlamaktadır. Süperkritik akışkanların ekstraksiyon işlemi için kullanılmasının ön araştırmaları 1879 yılında Hannay and Hogarth'ın yayınladıkları raporda yer almaktadır. Süperkritik ekstraksiyon için CO₂, n-pentan, azotoksit, etan gibi bir çok solvent kullanılmaktadır [123]. Ancak, karbondioksit ucuz olması, doğada saf halde yüksek miktarda bulunması, toksik olmaması, yanıcı olmaması ve çalışma sıcaklığının uygun olması nedeniyle en çok tercih edilen süperkritik solventi olmuştur [121]. Süperkritik CO₂'nin P_c değeri 7.8 MPa ve T_c değeri ise 31°C'dir. CO₂'nin süperkritik seviyeye ulaştığı basınç ve sıcaklık değerleri biyolojik koşullara yakın olması nedeniyle ürün saflaştırma, ilaç gelişimi, kontrollü salım ve doku iskelesi sterilizasyonu gibi çeşitli biyomedikal ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaya başlanmıştır. Süperkritik CO₂ daha önce sterilizasyon için daha yaygın olarak kullanılırken son yıllarda hücresizleştirme çalışmaları için de kullanılmaya başlanmıştır [124, 125]. Süperkritik CO₂'nin hücresizleştirme için kullanılması doku üzerinde deselülerizasyon ajanı kalıntısı kalmaması ve yıkama işlemi gerektirmemesi açısından avantaj sağlamaktadır [105]. Literatürde süperkritik CO₂ kullanılarak yapılan aort [126], optik sinir, miyokard, kornea [124, 127] ve akciğer atardamarı [128] hücresizleştirme çalışmaları bulunmaktadır.

2.4.1.2. Kimyasal Yöntem

Kimyasal deselülerizasyon yöntemi, hücrelerin dokudan uzaklaştırılmasında kimyasal ajanların kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Kimyasal yöntemde asit/alkali

çözeltiler, ekstraksiyon solventleri, hipotonik/hipertonik çözeltiler ve deterjanlar yaygın olarak kullanılmaktadır [129]. Kullanılacak olan reaktif seçimi dokunun biyomekanik yapısına uygun olarak gerçekleştirilmelidir [66].

2.4.1.2.1. Asit/Alkali Çözeltiler:

Asit ve baz çözeltileri, nükleik asitlerin parçalanması ve sitoplazma bileşenlerinin hidrolizinde etkilidir [130]. Alkali çözeltilerin hazırlanmasında yaygın olarak sodyum, potasyum tuzları ve kalsiyum çözeltileri kullanılırken; asit çözeltilerinde asetik asit, hidroklorik asit (HCl), sülfirik asit ve perasetik asit (PAA) kullanılmaktadır [66]. PAA dokudaki büyüme faktörlerine ve lipid yapısına zarar vermeden hücresizleştirme işlemi gerçekleştirdiği ve aynı zamanda sterilizasyon ajanı olarak kullanılabildiği için tercih edilen ve en yaygın kullanılan asitlerden biridir [130]. Etkili bir asit çözeltisi olan PAA ile gerçekleştirilen ince bağırsak submukozası (SIS) [131], idrar kesesi [132] ve safra kesesi [133] hücresizleştirme çalışmaları literatürde yer almaktadır. Ayrıca 2018 yılında Sengyoku ve arkadaşları tarafından yürütülen yüksek alkali seviyesine sahip sodyum hidroksit kullanılarak gerçekleştirilmiş fare akciğer deselülerizasyonu da asit/alkali çözeltiler ile yapılan çalışmalar arasındadır. Bunların yanında asit ve baz kullanımının sGAG gibi önemli ekstraselüler matriks bileşenlerinin ortamdaki uzaklaştırılmasına neden olması, perasetik asit gibi reaktiflerin aşındırıcı ve güçlü bir oksitleyici olması gibi çeşitli dezavantajları bulunmaktadır ve [105, 134].

2.4.1.2.2. Solventler:

Alkol, aseton, gliserol, butanol gibi çözücüler hücresizleştirme işleminde kullanılmaktadır. Bu çözücüler hücre dehidrasyonu ve lizisi için etkilidir. Ayrıca izopropanol, metanol gibi alkoller lipidlerin uzaklaştırılmasında oldukça etkili olmaktadır [135]. Ancak doku fiksatifleri olarak da kullanılan metanol ve etanol gibi alkollerin hücresizleştirme çalışmalarında kullanılması sırasında dikkatli olunması gerekmektedir. Çünkü bu solventler ESM'nin mekanik özelliklerini etkilemesinin yanı sıra ESM protein yapılarına da zarar verebilmektedir [135, 136]. Aseton ve tributil fosfat da deselülerizasyonda kullanılan solventlerdendir. Asetonun hücresizleştirme çalışmalarında kullanılması ESM proteinlerinin daha fazla çapraz bağ yapması ve doğal dokudan daha sert bir yapıda iskele elde edilmesiyle sonuçlanmaktadır [135]. Tendon gibi yoğun dokularda yaygın olarak kullanılan bu yöntemin, kalp kapakçığı ve yağ doku için de uygulanan hücresizleştirme çalışmaları bulunmaktadır [137-139].

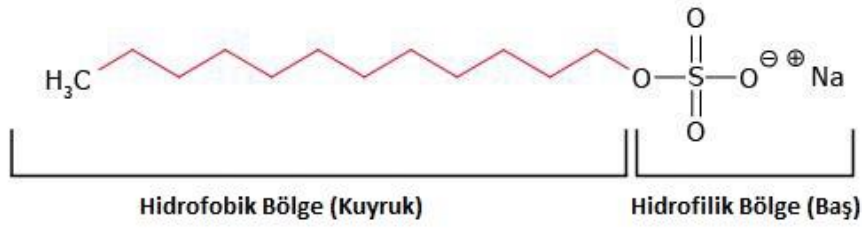
2.4.1.2.3. Hipotonik/Hipertonik Çözeltiler:

Deselülerizasyonda kullanılan hipotonik/hipertonik çözeltiler dokuda oluşturulan osmotik şok ile hücrelerin parçalanması prensibine dayanmaktadır. Hipotonik çözeltiler ESM yapısının korunmasında etkiliyken, hipertonik çözeltiler proteinin DNA'dan ayrılmasında etkilidir [140]. Ancak bu yöntem hücrelerin uzaklaştırılmasında tek başına yeterli olmamaktadır. Bu nedenle diğer yöntemle birlikte veya ön işlem olarak kullanılmaktadır[124, 130]. Etkili bir sonuç almak için dokulara birkaç döngü olacak şekilde hipotonik ve hipertonik çözelti uygulanmaktadır. Bu sayede, osmotik şokun etkisi artırılarak, hücre kalıntılarının dokudan uzaklaşması sağlanmaktadır [135].

2.4.1.2.4. Deterjanlar:

Deselülerizasyon işlemi için en yaygın kullanılan kimyasal ajanlar deterjanlardır. Deterjanlar, hücre zarının parçalanmasını ve DNA'nın proteinden ayrılmasını sağlayarak hücre materyalinin uzaklaştırılmasında etkili olmaktadır [135]. Deterjanlar hücre lipid çift tabakasını taklit edebilen amfipatik bir ortam sağlar, bu sayede deterjanların çözücü madde olarak kullanımı DNA/RNA izolasyonu, proteinlerin stabilizasyonu, denatürasyonu, hücre parçalanması gibi çeşitli biyolojik uygulamalar için önemlidir [141]. Deterjanların hücresizleştirme işlemindeki etkisi doku kaynağı ve uygulama süresine göre farklılık göstermektedir. Ayrıca deterjanların deselülerizasyon sürecinde kullanılmasının ardından kalan deterjanın ve hücre kalıntılarının uzaklaştırılması için bir yıkama prosedürü gerektirmektedir [134]. Hücresizleştirme için kullanılan deterjanlar tek tek uygulanabildikleri gibi farklı özelliklere sahip deterjanların kombinasyonları şeklinde de kullanılabilir [66].

Deterjanlar, alifatik veya aromatik karaktere sahip lipofilik hidrokarbon gruplar (kuyruk) ve polar veya yüklü hidrofilik gruplar (baş) içeren amfipatik moleküllerdir (Şekil 2.7). Suyun yüzey gerilimini düşürdükleri için yüzey aktif madde olarak da adlandırılmaktadır. Polar baş grubunun iyonik karakteri deterjanların sınıflandırılmasında etkili olmaktadır. Deterjanlar iyonik, iyonik olmayan ve zwitteriyonik olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır [141, 142].



Şekil 2.7. Deterjanın kimyasal yapısının şematik gösterimi [141]

İyonik Deterjanlar:

İyonik deterjanlar anyonik veya katyonik net bir yüke sahip baş ve düz bir hidrokarbon zincirinden oluşan kuyruk kısmından oluşmaktadır. İyonik deterjanlar membran proteinlerinin parçalanmasında oldukça etkilidir [141]. Bu deterjanlar protein-protein bağları üzerinde etkili olduklarından proteinlerin denatürasyonuna neden olmaktadır. Deselülerizasyon işleminde en yaygın kullanılan iyonik deterjanlar sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum deoksikolat (SDC) ve Triton X-200'dür [134, 136]. SDS en yaygın kullanılan deselülerizasyon ajanıdır. Çünkü hücresel komponentleri dokudan yüksek oranda uzaklaştırmasında etkilidir. Ancak bunun yanında matrisin doğal yapısında değişime ve GAG'ların uzaklaştırılmasına neden olmaktadır [106, 134]. SDS yaygın olarak kullanılmasına rağmen hücresel proteinlerin denatürasyonuna ve mekanik stabilitenin azalmasına neden olmaktadır. SDC de deselülerizasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan diğer bir iyonik deterjandır. SDC hücresel komponentleri dokudan iyi bir şekilde uzaklaştırmasının yanı sıra doku yapısına SDS'ten daha çok zarar vermektedir ve genelde iyonik olmayan veya zwitter iyonik karakterdeki diğer deterjanlarla birlikte kullanılmaktadır [134].

İyonik Olmayan Deterjanlar:

İyonik olmayan deterjanlar yüklü olmayan hidrofilik baş kısmına sahip deterjanlardır. Bu deterjanlar lipid-lipid ve lipid-protein bağları üzerinde etkili oldukları ve protein-protein etkileşimlerini kıramadıkları için denatüre edici olmayan deterjanlar olarak adlandırılmaktadır. Bu özellikleri sayesinde iyonik olmayan deterjanlar biyolojik olarak aktif olan membran proteinlerinin izolasyonunda kullanılmaktadır [141]. Hücresizleştirme işlemi için yaygın olarak kullanılan iyonik olmayan deterjanlardan biri Triton X-100'dür. Triton X-100 karaciğer, akciğer, deri gibi bir çok organın hücresizleştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Triton X-100 ile farklı dokularda yapılan deselülerizasyon sonucunda tartışmalı bulgular elde edilmiştir. Kalp kapakçığı

deselülerizasyonunda etkili olduğu gösterilirken, kan damarı, tendon ve bağ dokuda hücrel materyalin tamamen uzaklaştırılmasında etkili olmadığı gösterilmiştir [134]. Yağdan uzaklaştırma işleminde ise başarılı bir deterjan olarak değerlendirilmektedir. İyonik olmayan deterjanlar iyonik deterjanlar ile karşılaştırıldığında doğal doku yapısına daha az zarar vermektedir [134, 136].

Zwitteriyonik Deterjanlar (Bipolar) :

Zwitteriyonik deterjanlar, hem iyonik hem de iyonik olmayan deterjanların özelliklerine sahiptir. Bu deterjanlar iyonik olmayan deterjanlar gibi net bir yüke sahip değildirler, iletkenlik ve elektroforetik gibi özelliklerden yoksundurlar. Bunun yanı sıra, iyonik deterjanlar gibi protein-protein etkileşimlerinin kırılmasında etkili olmaktadır [141]. Ayrıca zwitter iyonik deterjanlar proteinlerin uzaklaştırılmasında iyonik olmayan deterjanlara kıyasla daha etkilidir. Deselülerizasyon işleminde yaygın olarak kullanılan zwitteriyonik deterjanlar 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), sülfobatin-10 (sb-10) ve -16 (sb-16) dır [134]. Bu deterjanlar yeterli seviyede hücrel materyalin uzaklaştırılması ve ESM yapısını yüksek oranda koruması açısından hafif deterjanlar olarak kabul edilmektedir [66].

Tez Çalışmasında Kullanılan Deterjanlar ve Kimyasal Özellikleri:

Tez çalışması kapsamında SDS, Triton X-100, CHAPS, Sodyum kolat hidrat, NP-40 ve ASB-14 deterjanları kullanılmış bu deterjanların akciğer deselülerizasyonu üzerine olan etkileri incelenmiştir. Tez çalışması sırasında kullanılan deterjanların kimyasal yapıları Şekil 2.8’de gösterilmiştir.

SDS: Deselülerizasyon işleminde en yaygın kullanılan deterjanlardan biri olan SDS, iyonik deterjanlar grubunda yer almaktadır. $C_{12}H_{25}NaO_4S$ kimyasal formülüyle ifade edilen ve molekül ağırlığı 288,38 g/mol olan SDS, anyonik deterjanlar grubundadır. Kritik misel konsantrasyonu (CMC) 25°C’de 7-10 mM ve ortalama misel molekül ağırlığı ise 18.000 Da’dır [143]. Hidrofobik kuyruk kısmı düz bir hidrokarbon zincirinden oluşmaktadır. İyonik bir deterjan olması sebebiyle protein-protein ve protein-lipid bağları üzerinde etkilidir [144] . SDS deterjanı DNA izolasyonu, SDS-PAGE gibi uygulamalarda hücrelerin parçalanması veya proteinlerin denatüre edilmesi ve boyutuna göre ayrılması amacıyla da kullanılmaktadır.

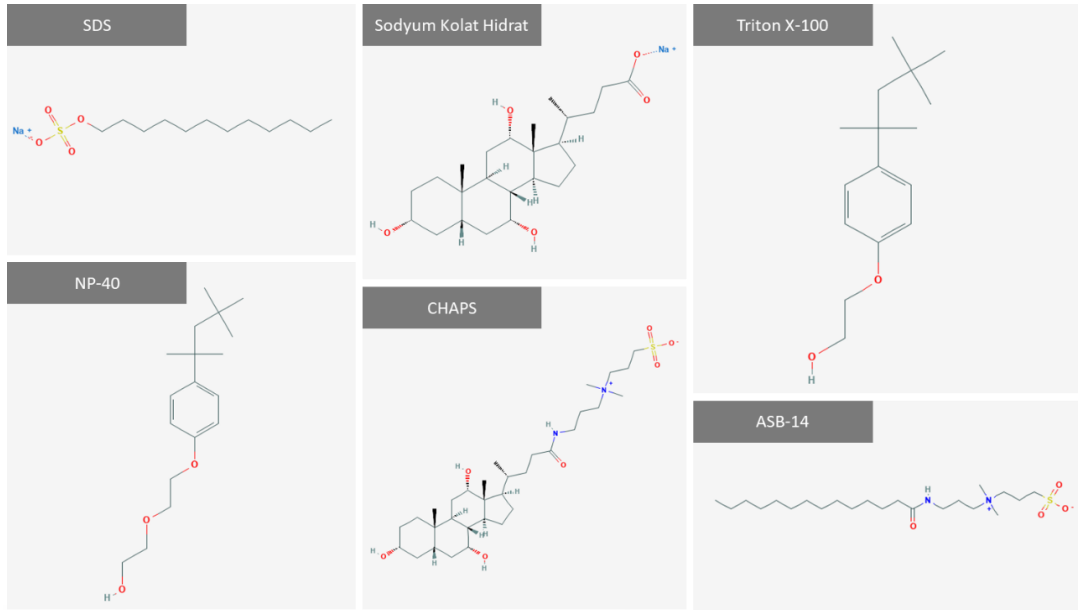
Triton X-100: Triton X-100 deterjanı yüksüz polioksietilen hidrofilik baş grubuna ve bir aromatik hidrokarbon grubuna sahip iyonik olmayan deterjandır. $t\text{-Oct-C}_6\text{H}_4\text{-(OCH}_2\text{CH}_2)_x\text{OH}$, $x= 9\text{-}10$ formülüyle ifade edilmektedir. Yaklaşık olarak 625 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. 25°C'deki CMC değeri 0,2-0,9 mM, ortalama misel molekül ağırlığı ise 90.000 Da'dır. Protein ve DNA ekstaksiyonu, immünohistokimya, immünofloresan ve SDS-PAGE gibi analiz yöntemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır [143].

CHAPS: Yüksüz bir baş grubuna sahip olan CHAPS deterjanı 614,88 g/mol molekül ağırlığına sahip zwitteriyonik bir deterjandır. Molekül formülü $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ 'tir. Membran proteinlerinin çözünmesinde etkilidir. 25°C'deki CMC değeri 6 mM, ortalama misel molekül ağırlığı ise 6.150 Da'dır [143].

Sodyum kolat hidrat: Sodyum kolat safra tuzu (bile salt) deterjanları olarak adlandırılan grup içerisinde yer alan anyonik bir deterjandır. Membranın parçalanması ve membran proteinlerinin ekstraksiyonu için kullanılmaktadır. Sodyum deoksikolata kıyasla proteinleri denatüre edici özellikte değildir [143]. Moleküler formülü $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_5 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ olmak üzere, susuz halinin molekül ağırlığı 430,55 g/mol'dür. Kritik misel konsantrasyonu 25°C'de 9-15 mM'dir. Ortalama misel molekül ağırlığı ise 900-1.300 Da'dır [145].

NP-40: NP-40 deterjanı membran proteinlerini çözdürmek için kullanılan iyonik olmayan bir deterjandır. Molekül ağırlığı 680 g/mol'dür. Kritik misel konsantrasyonu 25°C'de 0,059 mM; ortalama misel molekül ağırlığı ise 90.000 Da'dır.

ASB-14: Amidosulfobetaine-14 (ASB-14) deterjanı da diğer deterjanlar gibi proteinlerin çözünmesi için kullanılan zwitteriyonik bir deterjandır. Ayrıca ASB-14'ün proteinleri çözme özelliklerinin CHAPS deterjanına göre daha iyi olduğu bilinmektedir. $\text{C}_{22}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ moleküler formülüyle ifade edilen bu bileşiğin molekül ağırlığı 434,68 g/mol'dür. 25°C'deki CMC değeri 8 mM'dir [146].



Şekil 2.8. Tez çalışması kapsamında kimyasal deselülerizasyon ajanı olarak kullanılan deterjanların molekül yapıları [144]

2.4.1.3. Biyolojik/Enzimatik Yöntem

Biyolojik ajanlar kullanılarak yapılan deselülerizasyon işlemi enzimler ve enzimatik olmayan ajanlar aracılığıyla gerçekleştirilmektedir [135]. Enzimatik deselülerizasyon yöntemi peptit ve nükleotit bağların kırılmasında proteaz, esteraz ve nükleaz gibi enzimatik ajanların kullanılması prensibine dayanmaktadır. Deselülerizasyon işleminde en yaygın kullanılan enzimler DNaz, RNaz gibi nükleazlar; tripsin, dispaz gibi proteazlar ve lipaz gibi esterazlardır, aynı zamanda α -gal epitopunun uzaklaştırılmasında etkili olan α -galoktozidaz enzimi de kullanılmaktadır [135, 147]. Enzimler sayesinde doku veya organda bulunan hücresel bileşenler seçici olarak ayrılabilir. Örneğin tripsin, arjinin veya lizin aminoasitlerinin karboksil ucundaki hücreye yapışan proteinleri parçalayarak hücrelerin dokudan uzaklaştırılmasına yardımcı olur [147]. Ancak bunun yanında uzun süre enzim maruziyeti kolajen proteinlerine zarar vermektedir. Kolajenler iyonik deterjanlara karşı dayanıklı olmalarına rağmen enzimatik ajanlar karşısında dayanıksız olduğu görülmüştür [147-149]. Enzimler, deselülerizasyon ekstraselüler matriks proteinlerine zarar vermesi, mikroyapısında değişiklik meydana getirmesi ve dokunun biyomekanik yapısını etkilemesi nedeniyle tek başına kullanılmamaktadır. Enzimin uygulama süresini kısaltmak amacıyla diğer deselülerizasyon yöntemleriyle birlikte yardımcı deselülerizasyon ajanı olarak tercih edilmektedir [150].

Biyolojik yöntemlerin bir diğeri ise enzimatik olmayan şelatlayıcı ajanların ve toksinlerin kullanılmasıdır. Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve etilen glikol tetra asetik asit (EGTA) en yaygın kullanılan şelatlayıcı ajanlardır. Bu bileşikler, metal iyonlarının ayrılmasıyla hücrelerin proteinlerden uzaklaştırmasına yardımcı olmaktadır. Bu ajanlar tek başına deselülerizasyon işleminin tamamlanması için yetersiz oldukları için genellikle diğer yöntemlerle kombine bir şekilde kullanılmaktadır [135, 147]. Ayrıca, latruncilin B gibi toksinler de deselülerizasyon işlemi için kullanılmaktadır [106].

2.4.2. Akciğer Deselülerizasyonu ve Doku Mühendisliği Uygulamaları

Akciğer, en az kırk farklı hücre tipine sahip oldukça karmaşık bir biyomatriske yapısına sahiptir. Bu karmaşık yapı, akciğer doku mühendisliğinin tarihsel gelişiminin diğer alanlara nazaran daha yavaş bir gelişim göstermesine neden olmuştur. Ancak son yıllarda doğal ve sentetik biyomalzemeler ile yapılan çalışmalar hız kazanmaktadır. 1980'li yıllarda deselülerizasyon yönteminin bulunması ve ilerleyen yıllarda hız kazanmasıyla birlikte akciğerle ilgili de pek çok deselülerizasyon çalışması yapılmıştır [51]. Bu sayede bilinen üretim yöntemleriyle tam olarak taklit edilemeyen akciğer ekstraselüler matriksinin, makro ve mikro yapısının yüksek oranda korunması sağlanmıştır [51, 151].

Akciğer hücresizleştirme çalışmalarının temeli 1980'li yıllara kadar uzanmaktadır. 1981 yılında Kuttan ve arkadaşları tarafından; 1986 yılında ise Lwebuga-Mukasa ve arkadaşları tarafından alveolar bazal membran çalışmaları gerçekleştirilmiştir [152, 153]. İlerleyen yıllarda Ott ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen tüm organ deselülerizasyonu ve perfüzyon çalışmalarıyla deselülerizasyon uygulaması önemli bir gelişme kaydetmiştir [103]. 2010 yılında Petersen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada sıçan akciğerinin perfüzyonla deselülerizasyonu gerçekleştirilmiş ve yine aynı çalışmayla birlikte insan akciğerine ilişkin yapılan ilk deselülerizasyona ait veriler kaydedilmiştir [154]. Aynı yıl Ott ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada sıçan akciğerinin perfüzyon yöntemiyle deselülerizasyonu Triton X-100 deterjanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir [155]. 2012 yılında ise Wallis ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada SDS, Triton X-100/SDC ve CHAPS deterjanının akciğer deselülerizasyonu üzerine olan etkisinin karşılaştırıldığı bir çalışma yapılmıştır [156]. Yine benzer bir şekilde 2013 yılında O'Neill ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise insan ve domuz akciğeri üzerinde üç farklı metotla yürütülen deselülerizasyon işlemlerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında yapılan karakterizasyon ve hücre

çalışmaları sonucunda, CHAPS deterjanının hem domuz hem de insan akciğeri için iyi bir seçenek olduğu belirtilmiştir [157]. Sonraki yıllarda, akciğer ve trake deselülerizasyon çalışmaları devam etmiş, farklı ajanlarla fiziksel ve kimyasal deselülerizasyon metotları, farklı hayvan akciğerleri üzerinde uygulanarak uygun bir deselülerizasyon protokolü oluşturulmaya çalışılmış, uygulanan protokoller çeşitli karakterizasyon yöntemi ve hücre çalışmaları ile doğrulanmıştır [51, 158-161]. Ayrıca, insan kadavralarından alınan sağlıklı ve hastalıklı akciğer örnekleri üzerinde yapılan hücresizleştirme çalışmalarıyla hastalık mekanizmalarının anlaşılması ve transplantasyon kısıtlamasının önündeki klinik problemlere çözüm aranmıştır [162, 163]. Optimize edilmeye çalışılan akciğer deselülerizasyon yöntemlerine doku mühendisliği uygulamaları da eklenmiştir. Pouliot ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada akciğer ekstraselüler matriksinden ilk defa hidrojel elde edilmiştir [164]. Deselülerize dokulardan elde edilen hidrojeller *in vitro* deney koşullarının etkinliğinin artırılması açısından önem taşımaktadır [165, 166].

2.4.3. Deselülerizasyon Avantaj ve Dezavantajları

Deselülerizasyon doğal doku iskelesi elde etme yöntemlerinden biridir. Son yıllarda kullanımı giderek yaygınlaşan bu yöntemin çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Deselülerizasyonla elde edilen iskeleler, doğal dokunun mekanik özelliklerini yansıtmaktadır. Bu yöntemle doğal dokunun sahip olduğu üç boyutlu mikroyapıyı elde etmek mümkün hale gelmektedir. Mikroyapının elde edilmesi matriks yapısında bulunan spesifik bağlanma bölgesi ve biyoindüktif özelliklerin korunmasını sağlamaktadır [66, 167]. Ayrıca, deselülerizasyon yönteminde hücresel antijenler uzaklaştırıldığı için immünojenik etki oldukça düşük bir seviyeye inmektedir. İmmünojenik etkinin düşük olması ksenojenik kaynakların kullanımına izin vermektedir. Deselülerizasyon yöntemiyle elde edilen iskeleler neredeyse bütün bir ekstraselüler matriksi yansıttığı için *in vivo*'ya daha yakındır [66].

in vivo ve *in vitro* çalışmalar için bir çok avantaja sahip olan deselülerizasyon yönteminin çeşitli limitasyonları bulunmaktadır. Hücresizleştirme, doku kaynağının özellikleri (cinsiyet, yaş, hastalık geçmişi vb.), dokunun yoğunluk, kalınlık ve bileşen içeriği gibi özelliklerinden etkilenmektedir. Bu nedenle, her doku için ayrı optimizasyon gerektirmektedir. Ayrıca, deselülerizasyonun başarılı gerçekleştirilememesi sonucu immünojenik yanıt oluşabilmektedir. Yine deselülerizasyon yöntem ve uygulama şekline

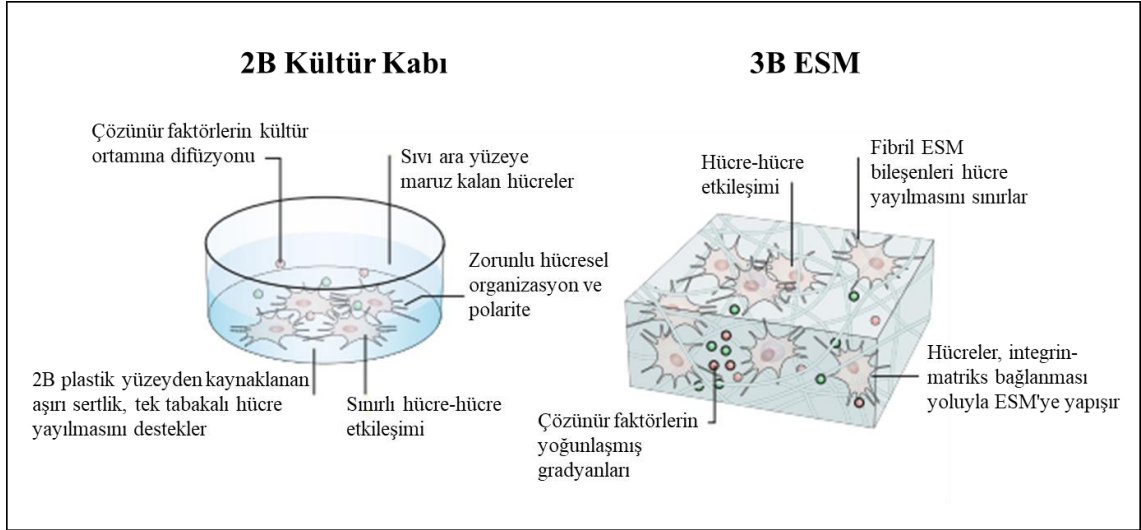
bağlı olarak iskele yapısının biyomekanik özelliklerinde bozulma meydana gelebilmektedir [66, 105].

2.5. Hidrojeller

Hidrojeller, ağırlıklarının %30'undan fazla su tutma kapasitesine sahip, fiziksel veya kimyasal çapraz bağlar yoluyla bütünsel yapısını koruyan üç boyutlu hidrofilik biyomalzemelerdir [91]. Bir malzemenin hidrojel olarak adlandırılması için ağırlık veya hacminin en az %10'unu su oluşturmaktadır. Hidrojeller, ilk olarak 1960 yılında Wichterle ve Lím tarafından rapor edilmiştir [168, 169].

Hidrojeller, hücrelerin doğal mikroçevrelerini taklit etmesi açısından etkili olması sebebiyle en sık kullanılan doku iskelelerinden biridir. Hidrojeller, doğal veya sentetik olarak iki gruba ayrılmaktadır. Doğal hidrojeller, kolajen, hyaluronik asit, aljinat, jelatin, dekstran, kitosan, fibrin gibi doğal polimerlerden oluşurken sentetik hidrojeller daha çok polietilen oksit, polietilen glikol (PEG), polivinil alkol, poliakrilamid, gibi polimerlerden oluşmaktadır [170, 171]. Doğal hidrojellerin yapısı ve bileşimi doğal hücre dışı matriksine benzer ve uyumlu olduğu için etkilidir. Ancak, üretimden üretime farklılık oluşabilmesi, immünojenisite riski ve doğal hidrojellerin nispeten daha zayıf mekanik dayanıma sahip olması bu malzemelerin kullanımın da sınırlayıcı faktör olarak rol oynamaktadır. Diğer taraftan, sentetik polimerler kullanılarak elde edilen hidrojeller her ne kadar molekül ağırlığı, mekanik dayanımı ve biyobozunur özellikleri bakımından özelleştirilebilir ve standart olarak üretilir olsa da bu hidrojellerin üretiminde sıklıkla kullanılan çapraz bağlayıcıların sitotoksisiteye sebep olma ihtimali gibi dezavantajları bulunmaktadır [170].

Hidrojeller, hücre davranışlarını düzenleyen olayların ortaya çıkarılması, hücrelerin çoğalma ve farklılaşması için gerekli ortamın sağlanması açısından oldukça yararlıdır. Ayrıca çoğu yumuşak dokuya benzer mekanik özellikleri sayesinde doğal ekstraselüler matriks ortamını taklit edebilmesi ve hücre tutunmasını desteklemesi açısından hidrojeller geleneksel kültür sistemlerine kıyasla daha etkili bir kültür ortamı sağlamaktadır (Şekil 2.9) [171].



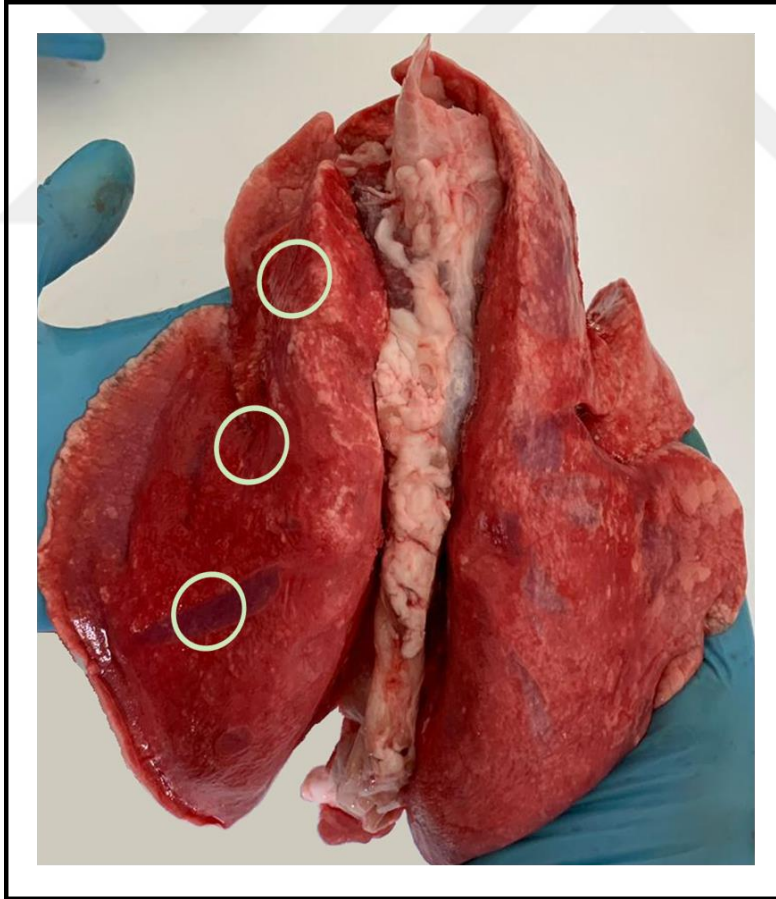
Şekil 2.9. Standart 2B hücre kültür yöntemi ile 3B hidrojel karşılaştırılması [91]

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan birçok hidrojel kolajen, hyalüronik asit ve elastin gibi ESM bileşenlerinden veya Matrigel gibi ESM proteinlerinin karışımından elde edilmiştir. Ekstaselüler matriksin kompleks yapı ve işleve sahip olması yapay ve bir bütün olarak taklit edilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda yapılan çalışmalar dokudan doğal olarak elde edilen ESM yapısı üzerinde odaklanmaktadır. ESM doku iskelelerinin hidrojele dönüştürülmesinin keşfi bu malzemelerin *in vitro* ve *in vivo* kullanım alanını ve faydasını genişletmiştir [92]. ESM hidrojel sentezi temelde iki prensibe dayanmaktadır. Bunlar; 1) ESM proteinlerinin enzimatik veya kimyasal yolla monomerik bileşenlerine çözdürülmesi, 2) monomerik bileşenlerin yeniden kendi içindeki ağ yapılarını oluşturmalarını indüklemek için sıcaklık ve pH kontrolü altında nötralizasyon işlemidir [92]. Son yıllarda, yapılan çalışmalarda idrar kesesi [172], kornea [173], kalp dokusu [174], pankreas [175], akciğer [164] gibi pek çok farklı doku veya organdan deselülerizasyon sonrası elde edilen ESM iskeleden hidrojel sentezi gerçekleştirilmiştir. Deselülerize hidrojeller farklı hücre tiplerinin yönlendirilmesi için gerekli biyokimyasal özelliklere sahip olmasına rağmen mekanik özellikleri doğal dokuyla karşılaştırıldığında daha düşük kalmaktadır. Ayrıca, ESM hidrojeller ile yapılan çalışmalar henüz ilerleme aşamasındadır ve çeşitli optimizasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Mekanik, malzeme özellikleri ve üretim yönteminin hidrojel etkinliği üzerine etkisiyle birlikte bu hidrojellerin hücre davranışı ve doku yeniden şekillenmesini üzerindeki etki mekanizmalarının anlaşılması için kombine *in vitro* ve *in vivo* modellere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sayede, hidrojellerin klinikte kullanımının ilerlemesine katkı sağlanmış olacaktır [92, 176].

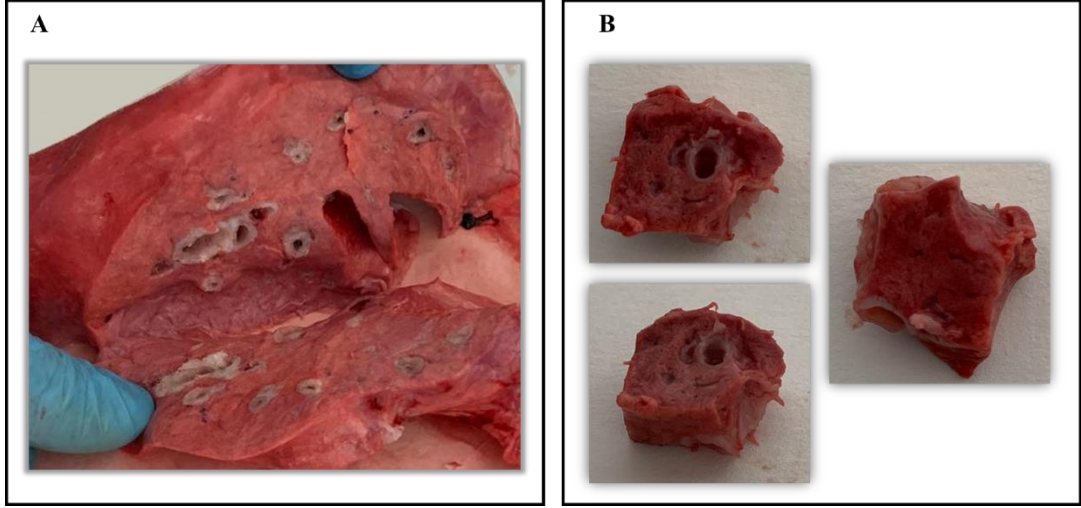
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Doku Temini ve Kesit Alınması

Akciğer deselülerizasyonunda kullanılacak doku kaynağı olarak koyun akciğeri seçilmiştir. Deselülerizasyon işleminde kullanılacak olan koyun akciğeri, mezbahadan temin edilerek, hızlı bir şekilde laboratuvara getirilmiştir. Yeni disekte edilmiş koyun akciğeri Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Kesit alma sırasında kullanılacak laboratuvar malzemeleri (bistüri, pens vb.) otoklavlanmış ve devamında ultraviyole ışın (UV) ile steril edilmiştir. Deselülerizasyon işlemi için kullanılacak olan doku kesit boyutu 1 cm³ olarak belirlenmiş olup doku kesitleri sağ ve sol akciğerden, bronş ve bronşiyolları içerecek şekilde akciğerin üst, orta ve alt kısımlarından alınmıştır. Ayrıca doku kesitlerinin ağırlık tayinleri yapılarak, deselülerizasyon işlemine kadar -80°C’de saklanmıştır. Alınan doku kesitleri Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Kimyasal deselülerizasyon için kullanılan olan koyun akciğeri



Şekil 3.2. (A) Koyun sol akciğeri bronş ve bronşiyolleri gösteren kesit. (B) Deselülerizasyon işlemi için akciğerin çeşitli bölgelerinden alınan doku kesitleri

3.2. Deselülerizasyon İşlemi

3.2.1. Kimyasal Deselülerizasyon Yöntemi

Koyun akciğerinin kimyasal deselülerizasyonu için en yaygın kullanılan kimyasal deselülerizasyon ajanı olan deterjanlar kullanıldı. Çalışma kapsamında SDS (J.T.Baker, ABD), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Almanya), CHAPS (Biobasic, Canada) gibi deselülerizasyon işleminde sıklıkla tercih edilen deterjanlarla birlikte akciğer deselülerizasyonunda kullanılmamış olan sodyum kolat hidrat (Sigma-Aldrich, Almanya), NP-40 (Biobasic, Canada) ve ASB-14 (Serva, Almanya) olmak üzere altı farklı deterjan kullanıldı ve bu deterjanların farklı konsantrasyonlarının deselülerizasyon süresi üzerindeki etkisi incelendi. Çalışmada kullanılan deterjan isimleri, konsantrasyonları ve uygulama süreleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Deselülerizasyon Koşulları

Deterjan	Kategori	Deterjan Konsantrasyonu	Deselülerizasyon Süresi
SDS, Sodyum Kolat Hidrat	İyonik	%0,5 ve %1 (w/v)	48 ve 72 saat
Triton X-100, NP-40	Non-iyonik	%0,5 ve %1 (v/v)	48 ve 72 saat
CHAPS, ASB-14	Zwitteriyonik	2 mM, 4 mM, 8 mM ve 12mM	48 ve 72 saat

Deselülerizasyon protokolü dört ana basamaktan oluşmaktadır:

1. Kandan uzaklaştırma: Deselülerizasyon işlemine başlamadan önce, kanın uzaklaştırılması için dokular fosfat tamponlu salin (PBS) veya distile su ile yıkanmaktadır.
2. Deselülerizasyon: Bu basamakta dokuların uygun deselülerizasyon ajanına maruz bırakılmasıyla hücresel komponentlerin uzaklaştırılması sağlanmaktadır.
3. Yıkama: Yıkama işleminde matriks deselülerizasyon sırasında uygulanan kimyasal kalıntılardan arındırılmaktadır. Yıkama PBS kullanılarak gerçekleştirilmektedir.
4. Antibiyotik uygulaması: Kontaminasyon riskine karşı, elde edilen deselülerize matriksler antibiyotik içeren PBS içerisinde bekletilmektedir.

Uygulanan deselülerizasyon protokolü aşağıda belirtilmiştir:

1. Yeni disekte edilmiş koyun akciğerinden alınan ve -80°C’de saklanan 1 cm³’lük kesitler bir gece öncesinden -20°C ve uygulamanın yapılacağı gün +4°C’ye getirilerek kademeli bir şekilde çözündürme işlemi gerçekleştirildi.
2. Deterjan uygulamasından önce dokudaki kanı uzaklaştırmak için dokular önce distile su ile yıkandı, ardından 1X PBS (Gibco, ABD) ile 30 dakika çalkalayıcı üzerinde tutularak yıkama işlemi tamamlandı.
3. Yıkama işleminin ardından dokular ilgili deterjan çözeltileri içerisinde konularak deselülerizasyon işlemi başlatıldı. Çözeltiler doku başı 20 ml olacak şekilde hazırlandı ve orbital karıştırıcı hızı ~ 200 rpm olarak ayarlandı.

4. Deterjan solüsyonları her 24 saatte bir değiştirildi.
5. Deterjan uygulamasının ardından kalıntıların uzaklaştırılması için bir yıkama protokolü gerektiği için deterjan uygulama süresinin (48 veya 72 saat) ardından yıkama işlemine geçildi [105, 134].
6. Yıkama işlemi 1X PBS ile yapıldı. Yıkama süresi deterjan uygulama süresi ile eşit tutuldu. Yıkama işlemi için kullanılan PBS de deterjanlar çözeltileri gibi her 24 saatte değiştirildi.
7. Yıkama işleminin ardından dokular, %1'lik Pen/Strep (Gibco, Almanya) antibiyotik içeren 1X PBS içerisinde +4°C'de 24 saat bekletildikten sonra analize kadar -80°C'de saklandı [163].

3.2.1. Fiziksel Deselülerizasyon Yöntemi

Fiziksel deselülerizasyon yöntemi için sCO₂ kullanılmıştır. Dokular sCO₂ uygulamasının etkinliğini arttırmak için sCO₂ ile temas etmeden önce bir ön işleminden geçirildi. Fiziksel deselülerizasyon sırasında izlenen adımlar aşağıdaki gibidir [124]:

1. Ön işlem basamağı için dokular ilk önce kanın uzaklaşması için 1X PBS ile yıkandı.
2. Ardından dokular için 10mM Tris-HCl (pH 7,9) hipotonik çözeltisi içerisinde dondur-çöz işlemi gerçekleştirildi. Dokular -20°C'de 1 saat dondurulduktan sonra, hızlıca 37°C'ye alınarak 1 saat boyunca çözölmeleri beklendi. Bu işlem 5 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi.
3. Dondur-çöz döngüsünün ardından dokular önce hipotonik çözelti (10mM Tris-HCl (pH 7,9) içerisinde 12 saat inkübe edildi; hemen ardından 0,05M Tris-HCl (pH 7,6) içerisinde 1,5M NaCl olacak şekilde hazırlanan hipertonic çözelti içinde oda sıcaklığında 12 saat orbital karıştırıcıda inkübe edildi.
4. Ön işlemin tamamlanmasının ardından dokular sCO₂ cihazı içerisine yerleştirildi ve 4500 psi basınçta bir saat boyunca deselülerizasyon işlemi gerçekleştirildi.
5. Proses kesikli olarak gerçekleştirildi, ko-solvent olarak %70 etanol kullanıldı.

3.3. Matriks Karakterizasyonu

Deselülerizasyon işlemi sonrası nükleer içeriklerin dokudan ne kadar uzaklaştırıldığını ve ekstraselüler matriks bileşenlerinin ne kadar korunduğunu test etmek için çeşitli nitel ve nicel analiz yöntemleri kullanıldı.

3.3.1. Nitel Analiz Yöntemleri

Deselülerize doku iskelelerinin nitel karakterizasyonu için histolojik boyama yöntemleri kullanılmaktadır. Histolojik boyamalar ile doku iskelesinin çekirdek, kolajen, elastin ve GAG tayinleri yapıldı. Çekirdek analizi için Hematoksilen ve Eozin; kolajen analizi için Masson's Trichrome; elastin analizi için Van Gieson ve GAG için Alsiyan Mavisi boyamaları gerçekleştirildi ve ışık mikroskobunda görüntüleme yapıldı.

3.3.1.1. Fiksasyon, Doku Takibi ve Parafin Bloklama

Histoloji boyamaları için izlenmesi gereken temel basamaklar aşağıdaki gibidir [177, 178]:

- Fiksasyon (Tespit)
- Doku Takibi
 - Dehidrasyon (suyunu alma)
 - Saydamlaştırma (clearing)
 - Sertleştirme (infiltrasyon)
- Parafin bloklama
- Kesit alımı
- Boyama
- Kapatma (mounting)

Deselülerize doku ve kontrol olarak kullanılan doğal dokunun hücre yapısının bozulmadan korunması için öncelikli olarak fiksasyon işlemi gerçekleştirildi [179].

1. Fiksasyon işlemi %10 Nötral Tamponlu Formalin (NBF) (Bright Slide, Türkiye) içerisinde 24 saat gerçekleştirildi.
2. Formalini uzaklaştırmak için dokular 12-24 saat arasında akan suyun altında yıkama işlemine bırakıldı.
3. Yıkama işleminin ardından dokular %70 alkol içerisine alınarak doku takibi işlemine başlandı. Doku takibinin ilk adımı olan dehidrasyon işleminde doku içerisindeki suyu uzaklaştırmak için dokular artan alkol serisinden geçirildi. Doku takibi dehidrasyon işlem basamakları Şekil 3.3'te belirtildiği gibi uygulandı.

%70 etanol, 1 saat ➡ %80 etanol, 1 saat ➡ %95 etanol, 1 saat ➡ %100 etanol, 1 saat

Şekil 3.3. Doku takibi dehidrasyon basamakları

4. Dehidrasyon aşamasının ardından saydamlaştırma (clearing) adımı için dokular Ksilen (Tekkim, Türkiye) içerisinde iki saat bekletildi. Her bir saatte ksilen yenilendi.
5. Sonraki aşamada dokular ksilen içerisinden alınıp 70°C’de eritilmiş parafin (Hda, Türkiye) içerisine konuldu ve parafin infiltrasyon işlemi gerçekleştirildi.
6. Sertleştirme (infiltrasyon) basamağının ardından dokular parafin blok içerisine gömüldü ve parafin bloğun donmasının ardından mikrotom (Leica, Almanya) yardımıyla 5 µm kalınlığında doku kesitleri alındı.
7. Doku kesitlerinin alınmasının ardından lam üzerindeki fazla parafin uzaklaştırılarak boyama işlemine geçildi.

3.3.1.2. Hematoksilen ve Eozin Boyaması

Hematoksilen ve Eozin boyaması dokunun nükleer içeriğinin görüntülenmesi için yaygın olarak kullanılan temel histolojik boyama yöntemlerinden biridir. Hematoksilen boyası mor rengiyle nükleer içeriğin boyanmasını sağlarken; Eozin boyası pembe renklidir ve sitoplazmanın görüntülenmesine katkıda bulunur [178]. Hematoksilen&Eozin boyaması için ticari olarak satın alınan “Hematoxylin and Eosin Stain Kit” (ScyTek Laboratories, ABD) kullanılmıştır. Boyama sonrasında sitoplazma bileşenleri pembe renkli görünürken çekirdekler mor/mavi renkte görünmektedir.

Boyama prosedürüne başlamadan önce lamaların üzerinde kalan parafini uzaklaştırmak için deparafinizasyon işlemi uygulandı. H&E boyaması kit protokolüne göre gerçekleştirildi:

1. Deparafinizasyon işleminin ardından lamalar distile sudan geçirilerek doku kesitlerinin üstünü tamamen kaplayacak şekilde Hematoksilen, Mayer’s (Lillie’s Modification) solüsyonu uygulandı ve 5 dakika inkübe edildi.
2. Daha sonra dokuyu fazla boyadan arındırmak için lamalar distile su ile iki kez durulandı.
3. Bu aşamadan sonra dokular üzerini tamamen kaplayacak şekilde uygulanan “Bluing Reagent” solüsyonuyla 10-15 saniye inkübe edildi.
4. Lamalar tekrar distile suyla iki kez durulandı ve saf alkol içerisine konuldu.
5. Doku kesitleri bu sefer de sitoplazma boyaması için Eozin Y solüsyonuyla kaplanarak 2-3 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonrasında lamalar saf alkol kullanılarak durulandı ve 1 dakika saf alkolde bekletilerek dehidre edildi.

7. Daha sonra lamalar temizlenerek uzun süre korunması için kapatıldı. Kapatma (mounting) işlemi Entellan (Thermo Fisher Scientific, ABD) mounting medium ile gerçekleştirildi.

3.3.1.3. Masson's Trichrome Boyaması

Doğal ve hücreleştirilmiş doku iskelerinin kolajen liflerinin kalitatif tayini için Masson's Trichrome Boyaması gerçekleştirilmiştir. Masson's Trichrome Boyaması bağ doku fibrillerinin boyanması ve görüntülenmesi için kullanılan çoklu bir histolojik boyama yöntemidir [179]. Masson's Trichrome ticari olarak satın alınan "Trichrome Stain Kit (Modified Masson's)" (ScyTek Laboratories, ABD) protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu boyama sonucunda kolajenler mavi, kas lifleri kırmızı ve çekirdekler koyu kırmızı-siyah/mavi olarak görünmektedir.

Boyama işlemine başlamadan önce lamalar deparafinizasyon işlemine tabi tutuldu (3.3.1.2'de açıklanmıştır.) ve kit protokolüne göre boyama yapıldı:

1. Deparafinizasyon ve hidratlama işlemlerinin ardından lamalar, doku kesitlerinin üzerine önceden 56°- 64°C'de ısıtılmış olan Bouin solüsyonundan 5-10 damla damlatılarak 60 dakika boyunca beklemeye bırakıldı.
2. Ardından musluk suyu altında lamalar tamamen temizlenene kadar durulandı ve bir kez distile sudan geçirildi.
3. Bir sonraki aşamada Weigert Hematoksilen (A) ve Weigert Hematoksilen (B) solüsyonları eşit miktarda karıştırılarak doku kesitleri üzerine kaplayacak şekilde uygulandı, lamalar bu şekilde 5-10 dakika bekletildikten sonra 2 dakika boyunca akan musluk suyu altında durulandı ve distile sudan geçirildi.
4. Daha sonra lamaların üzerine 5-10 damla kit içerisinde bulunan Biebrich kırmızısı /asit fuksin solüsyonu damlatılarak 5-15 dakika beklendi ve lamalar distile su ile durulandı.
5. Doku kesitlerinin üzerine 5-10 damla fosfomolibdik/fosfotungstik asit solüsyonu eklenerek 10-15 dakika daha önce boyanmış olan doku kesitlerinin farklılaşması beklendi.
6. Durulama yapılmadan doku kesitlerinin üzerine 5-10 damla anilin mavisi damlatılarak 5-10 dakika beklendi ve sonrasında lamalar distile su ile yıkandı. Sonraki aşamada doku kesitlerinin üzerine %1 asetik asit damlatılarak 3-5 dakika beklendi.

7. Hemen ardından hızlı bir şekilde 2 kere %95'lik alkol ve sonrasında 2 kere de saf alkol ile dehidrasyon işlemi gerçekleştirildi.
8. Daha sonra lamalar önce ksilende bekletildi, ardından Entellan ile kapatıldı.

3.3.1.4. Alsiyan Mavisi Boyaması

Deselülerize doku iskelerinin karakterizasyonunda incelenmesi gereken diğer bir önemli ESM proteini de glikozaminoglikanlardır. Akciğer dokularının glikozaminoglikan içeriğinin histolojik analizi Alsiyan mavisi boyama yöntemiyle yapılmıştır. Boyama işlemi ticari olarak satın alınan “Alsiyan Mavisi (pH 2.5) Boyama Kiti” (ScyTek Laboratories, ABD) protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Uygulama sonucunda çekirdeklerin kırmızı; sitoplazmanın pembe, hyalüronik asit ve glikoproteinlerin ise mavi renkte görünmesi beklenmektedir.

Alsiyan Mavisi boyaması sırasında takip edilen basamaklar aşağıdaki gibidir:

1. Boyama işlemine başlamadan önce lamalar deparafinizasyon işlemine tabi tutuldu ve distile suyla hidratlandı.
2. İlk olarak 3 dakika asetik asit solüsyonu içerisinde inkübe edildi.
3. Ardından alsiyan mavisi (pH 2.5) solüsyonu içerisinde 15 dakika 37°C'de bekletildi
4. Lamalar asetik asit solüsyonu ile kısaca durulandıktan sonra, 2 dakika akan musluk suyu altında yıkandı ve 2 kez distile sudan geçirildi.
5. Daha sonra lamalar Nuclear Fast Red solüsyonunda 5 dakika bekletilerek boyandı.
6. Boyanın uzaklaştırılması için 2 dakika akan musluk suyu altında yıkandı hemen arkasından 2 kez distile sudan geçirildi.
7. Dehidrasyon işlemi için lamalar artan alkol serisinden geçirildi.
8. Son aşamada lamalar ksilenden geçirilerek kapatma işlemi uygulandı.

3.3.1.5. Van Gieson's Boyaması

Elastinlerin histolojik gösterimi için ticari olarak satın alınan Elastic Stain Kit (Modified Verhoff's) (ScyTek Laboratories, ABD) kiti kullanılmıştır. Boyama sonucunda elastik fiberlerin siyahtan maviye doğru veya siyah; çekirdeklerin maviden siyaha doğru; kolajenlerin kırmızı; kas ve diğer yapıların ise sarı renkte gözlenmesi beklenmektedir.

Van Gieson's Boyaması için izlenen basamaklar aşağıdaki gibidir:

1. Boyama işlemine başlamadan önce elastik boyama çalışma solüsyonu hazırlandı. Çalışma solüsyonu için 5 damla hematoksilen solüsyonu (%5), demir klorür solüsyonu (%10) ve Lugol iyot solüsyonundan ikişer damla eklenerek iyice karıştırıldı.
2. Boya uygulamalarından önce lamalar deparafinize edildi ve distile su ile hidratlandı.
3. Lamaların üzerine doku kesitlerini tamamen kaplayacak şekilde hazırlanan çalışma solüsyonu eklendi ve 15 dakika inkübe edildi. Lamalar musluk suyunda boya tamamen uzaklaşana kadar durulandı.
4. Ardından demir klorür (%2) farklılaştırma solüsyonu 10-15 damla olacak şekilde uygulandı. Uygulamanın ardından lamalar bir kez musluk suyunda durulandı ve sonrasında 2 kez distile sudan geçirildi.
5. Lamalar mikroskopta incelendi farklılaşmanın başarıyla gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi.
6. Farklılaşmanın başarıyla gerçekleşmesinin ardından bir sonraki adım olan sodyum tiyosülfat solüsyonu (%5) uygulamasına geçildi. Kesitlerin üzerine 4-5 damla sodyum tiyosülfat solüsyonu (%5) solüsyonu uygulandı ve 1 dakika beklendi.
7. Ardından tekrar lamalar bir kez musluk suyunda durulandı ve sonrasında 2 kez distile sudan geçirildi.
8. Daha sonra lamaların üzerine 4-5 damla Van Gieson solüsyonu uygulandı ve 2-5 dakika inkübasyona bırakıldı.
9. Van Gieson solüsyonunun uygulamasının ardından lamalar iki kere %95'lik alkol ile durulandı sonrasında dehidrasyon için saf alkole alındı.
10. Dehidrasyon işleminden sonra lamalar ksilende bekletildi ve kapatıldı.

3.3.2. Nicel Analiz Yöntemleri

Hücresizleştirilmiş doku iskelelerinin matriks karakterizasyonu için kullanılan kantitatif analiz yöntemleri DNA izolasyonu, sGAG, kolajen ve elastin miktar tayinidir.

3.3.2.1. DNA İzolasyonu

Hücresizleştirilmiş doğal doku iskelerinin DNA miktarının ölçülmesi deselülerizasyon işleminin başarısını değerlendirmek açısından önemlidir. DNA miktarının ölçülmesi, uygulanan deselülerizasyon yönteminin immün yanıt oluşturabilecek hücresel materyalin uzaklaştırılmasında ne kadar etkili olduğu konusunda fikir vermiştir [135].

Doğal doku ve hücresizleştirilmiş dokulardan DNA izolasyonu “E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit” (Omega Biotek, ABD) protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Elde edilen DNA miktarları mikro-hacim spektrofotometre cihazıyla (Quawell, Çin) ölçüldü.

1. DNA izolasyonuna başlamadan önce dokular 50°C’de 16 saat kurutuldu [163]. Kurutma işleminin ardından dokuların kuru ağırlıkları ölçüldü. Doğal ve hücresizleştirilmiş dokular n=3 olacak şekilde mikrotüplere konularak etiketleme yapıldı.
2. Dokuların üzerine 200 µl TL tamponu ve 25 µl Proteinaz K eklenerek dokular gece boyu 55°C’de parçalanmaya bırakıldı.
3. Liziz işleminin tamamlanmasının ardından dokular maksimum hızda ($\geq 10,000 \times g$) 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant pellete zarar vermeden dikkatli bir şekilde yeni bir 1,5 ml’lik tüpe aktarıldı.
4. Örneklerin üzerine 220 µl BL tamponu eklendikten sonra 15 saniye vortekslenerek iyice karıştırıldı ve örnekler 70°C’de 10 dakika inkübe edildi.
5. Örneklerin üzerine 220 µl %100 etanol eklendikten sonra kısa bir santrifüjle iyice karıştırıldı ve tüpün içerisinde bulunan tüm çözelti HiBind® DNA Mini Column tüpüne aktarıldı. Bir dakika maksimum hızda santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüjün ardından filtrat kısmı uzaklaştırıldı.
6. Kolonların üzerine 500 µl HBC tamponu eklendi ve maksimum hızda 30 saniye santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
7. Filtrat kısmı uzaklaştırıldıktan sonra kolon içerisine 700 µl DNA yıkama tamponu eklendi ve maksimum hızda 30 saniye santrifüj edildi. Bu işlem bir kere daha tekrar edildi.
8. Daha sonra fazla alkolü uzaklaştırmak için kolonlar boş şekilde 2 dakika maksimum hızda santrifüj edildi ve elüsyon aşamasına geçildi.
9. Bu aşamada kolonlar yeni 1,5 ml’lik tüplere aktarılarak üzerlerine 70°C’de ısıtılmış olan elüsyon tamponu 100-200 µl eklendi.

10. Örnekler oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildikten sonra maksimum hızda 1 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen DNA miktarı mikro-hacim spektrofotometreyle ölçüldü ve örnekler -20°C’de saklandı.

11. Sonuçlar dokuların kuru ağırlıklarına göre normalize edildi.

3.3.2.2. sGAG Analizi

Glikozaminoglikanlar, yüzde olarak akciğer ESM’sinin küçük bir kısmını oluşturmalarına rağmen hücre matrisi etkileşimi ve biyolojik fonksiyonların düzenlenmesi gibi önemli rollere sahip proteinlerdir. Kondroitin ve heparan sülfat gibi sülfatlanmış glikozaminoglikanlar ESM’de yüksek miktarda yer almaktadır ve sGAG miktarının ölçülmesi hücreleştirilmiş doku iskelelerinde korunan GAG miktarının belirlenmesinde kullanılmaktadır [180].

Glikozaminoglikan miktarının belirlenmesi 1,9-Dimetil metilen mavisi çinko klorür çift tuzu (DMMB) boyası ile yapılmıştır. Pozitif yüklü DMMB boyası negatif yüklü glikozaminoglikanlara bağlandığında boyanın metakromazi özelliğine bağlı olarak absorbanı değişimine neden olmaktadır [180]. DMMB boyasının bağlandığı örnek konsantrasyonuna bağlı olarak maviden mora doğru bir renk değişimi meydana gelmektedir.

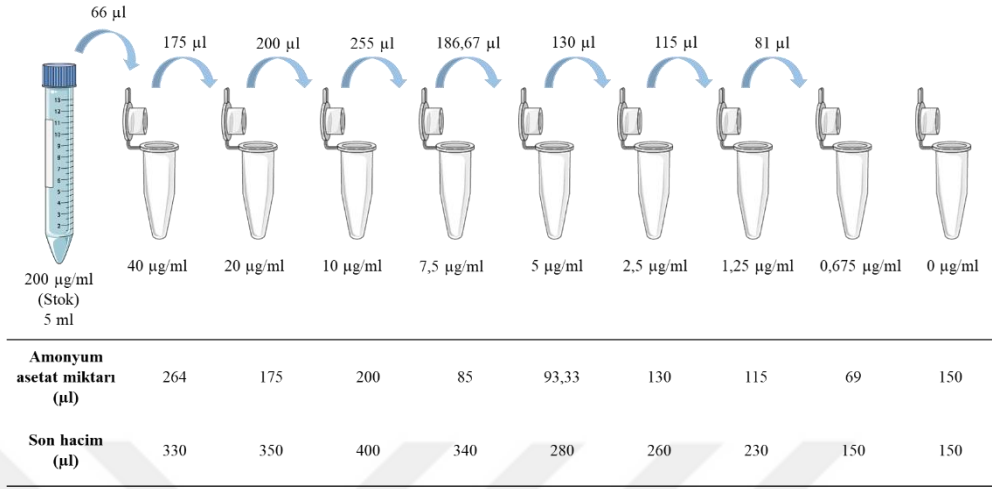
DMMB Boyasının hazırlanması:

1. DMMB boyası için son hacim 250 ml olacak şekilde 40 mM NaCl, 40 mM glisin (Promega, ABD) ve 0,1 HCl (J.T. Baker, ABD) içeren bir çözelti hazırlandı.
2. Hazırlanan bu çözeltinin içerisine 4 mg DMMB (SantaCruz, Almanya) boyası eklenerek çözündürme işlemi için şişe gece boyu manyetik karıştırıcıda bırakıldı [181]. DMMB boyası ışıktan etkilendiği için şişenin etrafı alüminyum folyo ile sarıldı.
3. DMMB boyasının çökelti oluşturma ihtimaline karşılık uygulamaya başlamadan önce kullanılacak olan miktar 0,45 µm gözenek büyüklüğüne sahip şırınga filtresinden geçirilerek hazır hale getirildi.

Kondroitin sülfat standart konsantrasyonunun hazırlanması:

1. DMMB standardı için 200 µg/ml konsantrasyonunda “Bovine chondroitin 4-sulfate” (Sigma, Almanya) stok solüsyonu hazırlandı.
2. Standart eğri oluşturmak için stok solüsyondan seri seyreltme yapılarak 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 7,5 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,675 µg/ml ve 0

$\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında standart çözeltileri hazırlandı (Şekil 3.4). Tüplerdeki son hacim en az 150 μl olacak şekilde hesaplama yapıldı.



Şekil 3.4. Kondroitin sülfat standart konsantrasyonlarının hazırlanması

DMMB Analizi:

1. Sülfatlanmış glikozaminoglikan miktarının belirlenmesi için doğal ve deselülerize dokuların kuru ağırlıkları ölçüldü. Ağırlıkları belirlenen dokular 1,5 ml'lik tüpler içerisine alınarak üzerlerine 100 mM amonyum asetat çözeltisi içerisinde 1 mg/ml konsantrasyona sahip olacak şekilde hazırlanan Proteinaz K çözeltisinden 500 μl eklendi ve 60°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.
2. Hazırlanan standart çözeltileri ve örnekler her bir kuyucuğa 40 μl hacminde üç tekrarlı olarak dağıtıldı. Daha sonra her bir kuyucuğun üzerine 200 μl DMMB boyası eklenerek bekletmeden 525 nm'ye ayarlanmış olan mikroparka okuyucuyla (Perkin Elmer, ABD) absorbans ölçümü gerçekleştirildi.
3. Elde edilen konsantrasyon değerleri dokuların kuru ağırlıklarına göre normalize edildi.

3.3.2.3. Kolajen Analizi

Kolajen miktarının tayini için "Hydroxyproline Assay Kit" (Biovision, Almanya) kullanılmıştır. Hidroksiprolin, kolajenin yapıtaşını oluşturan ve stabilitesini sağlayan temel aminoasitlerden biridir. Neuman ve arkadaşları 1950 yılında yaptığı çalışmada kolajenin içindeki hidroksiprolin oranının yaklaşık olarak %13,5 olduğunu ve bu değer total kolajen miktarının belirlenmesi için dönüştürme faktörü olarak kullanıldığını belirtmiştir [182-184].

Uygulanan kit protokolü aşağıdaki gibidir:

1. Başlamadan önce kontrol ve deselülerize dokular kurutuldu ve dokuların ağırlıkları ölçüldü.
2. Ardından dokular vidalı kapaklı polipropilen tüplere alındı. Hidroliz işlemi için dokuların üzerine 100 µl dH₂O ve 100 µl HCl (12N) eklenerek 120°C’de 3 saat inkübe edildi.
3. Hidroliz aşamasından sonra oluşan ve yer çekimi etkisiyle alt kısımda toplanan peletlere dokunmadan tüpün üst kısmından 10 µl alınarak 3 tekrarlı olacak şekilde 96-kuyucuklu plaka kuyularına dağıtıldı.
4. Daha sonra örnekler kurumaya bırakıldı.

Ölçüm yapılmadan önce kit protokolüne uygun olarak Kloramin T, DMAB Reaktifi ve standart hazırlanmıştır. Kloramin T ve DMAB Reaktifi her seferinde taze olarak hazırlanmış ve miktarları örnek sayısına bağlı olarak hesaplanmıştır.

Kloramin T reaktifinin hazırlanması için her bir kuyucuğa 6 µl Kloramin T konsantresi ve 94 µl oksidasyon tamponu konulacak şekilde örnek sayısına göre hesaplama yapıldı ve uygun hacimde çözelti hazırlandı.

DMAB Reaktifi için her bir kuyucuğa 50 µl DMAB konsantresi ve 50 µl perklorik asit /isopropanol solüsyonu konulacak şekilde örnek sayısına göre hesaplama yapıldı ve uygun hacimde çözelti hazırlandı.

Standart eğri oluşturmak için kit içerisinde 1 mg/ml konsantrasyonunda bulunan hidroksiprolin standardı 0,1 mg/ml’ye seyreltildi. Seyreltilmiş olan bu çözeltiden her bir kuyucuğa 0, 2, 4, 6, 8, 10 µl konularak 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1 µg/kuyu konsantrasyonundaki hidroksiprolin standartları oluşturuldu.

Reaksiyonun gerçekleştirilmesi:

1. Standart ve örneklerin bulunduğu her bir kuyucuğa 100 µl Kloramin T reaktifi eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında beklendi.
2. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µl DMAB reaktifi eklenerek 60°C’de 90 dakika inkübe edildi.
3. Ardından mikropilaka okuyucuda (Perkin Elmer, ABD) 560 nm’de absorbans değerleri ölçüldü.
4. Sonuçlar dokuların kuru ağırlığına göre normalize edildi.

3.3.2.4. Elastin Analizi

Doğal doku ve hücreleştirilmiş dokuların elastin miktarı tayini Fastin Elastin Assay kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Deneye başlamadan önce dokuların kuru ağırlıkları ölçüldü ve deney sonunda bu ağırlıklara göre normalizasyon yapıldı. Deney protokolü aşağıdaki gibidir:

1. Ağırlıkları ölçülen dokular 1,5 µl mikrotüplere alındı ve üzerine 750 µl 0,25 M oksalik asit çözeltisi eklenerek 100°C'de 60 dakika inkübe edildi.
2. İnkübasyon bittikten sonra tüpler bir süre oda sıcaklığında beklenerek soğutuldu. Ardından 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjün ardından ekstrakt kısmı alınarak yeni bir 1,5 µl mikrotüpe aktarıldı.
3. Geride kalan dokunun üzerine tekrar 750 µl oksalik asit eklenerek inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin amacı dokuda suda çözünmez formda bulunan elastini suda çözünür forma getirmektir.
4. Oksalik ekstraksiyonunun üç kere tekrarlanması ardından kör, standart ve örnekler için mikrotüp çıkarılarak etiketleme yapıldı.
5. Kör tüp için 100 µl 0,25 M oksalik asit, standartlar için 50, 25 12,5 ve 6,25 µl α-elastin standardı ve elliser mikrolitre ekstraktlardan alınmış örneklerin üzerine her tüpteki hacimle eşit olacak şekilde elastin çöktürme tamponu eklendi. Vorteksleme yapılarak 15 dakika beklendi.
6. 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjün ardından tüpün içerisindeki sıvı boşaltıldı ve tüpün içinde kalan sıvı ince bir peçete yardımıyla uzaklaştırıldı.
7. Tüplerin içerisine 1 ml boya reaktifi eklendi ve tüpler alt-üst edilerek karıştırıldı.
8. Tüpler mekanik çalkalayıcı üzerinde 90 dakika bekletilerek boyanın α-elastinlere bağlanması sağlandı.
9. 10,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve ardından boya uzaklaştırılarak tüpün içerisindeki sıvı 25 µl'den fazla kalmayacak şekilde peçete yardımıyla absorbe edildi. Bu aşamada elastin-boya kompleksi tüpün duvarında görünen kırmızı-kahverengi benzeri bir renk değişikliğine neden olmaktadır.
10. Tüplerin üzerine 250 µl boya disosiyasyon (ayrışma) reaktifi eklendi ve iyi bir şekilde karışması için vorteks yapıldı.
11. Tüplerin içerisinde yer alan tüm içerik iyice karıştırılarak düz-tabanlı 96-kuyucuklu plakaya alındı ve 513 nm'de mikroparka okuyucuda (Perkin Elmer, ABD) okuma yapıldı.

3.3.3. SEM Görüntüleme

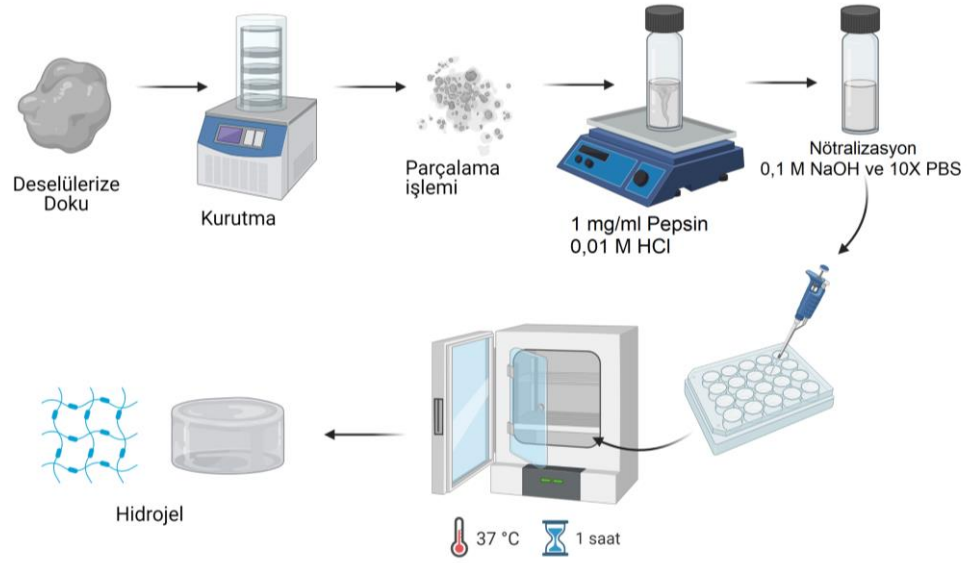
Doğal ve hücreleştirilmiş dokuların yüzey analizi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntüleme yapılmıştır. Deselülerize iskeleler SEM ile görüntüleme yapılmadan önce bir ön işleme tabi tutulmuştur:

1. Dokular %2,5 gluteraldehit ile fikse edildi.
2. Dokular artan alkol konsantrasyonlarından (%30, %50, %70, %80, %90 ve %100) geçirilerek dehidre edildi.
3. Dehidrasyon işleminin ardından üzerlerine hekzametildisilazan (HMDS) damlatılarak kurumaya bırakıldı.
4. Kurutma işleminden sonra iskele yüzeyleri 6 nm altın (Au)-paladyum (Pd) kaplaması yapılarak taramalı elektron mikroskopunda (Tescan, Çekya) görüntüleme yapıldı.

3.4. Deselülerize Dokudan Hidrojel Sentezi

Hücreleştirilmiş dokulardan hidrojel sentezi için Freytes Metodu kullanıldı [172].

1. Dokuların kuru ağırlıkları tartıldı ve parçalandı.
2. Dokular son konsantrasyon 15 mg/ml olacak şekilde, 1 mg/ml pepsin içeren 0.1 M HCl içerisinde 48 saat boyunca oda sıcaklığında (25°C) sabit karıştırma hızında hidrolize edildi.
3. Hidrolize edilen viskoz hidroliz çözeltisi, 0,01M NaOH (Hidroliz çözelti hacminin 1/10'u oranında) ve 10X PBS (Hidroliz çözelti hacminin 1/9'u oranında) ile nötralize edildi. Çözeltiyi istenilen pre-jel konsantrasyonuna getirmek 1X PBS kullanılarak çözelti pH'ı $7,4 \pm 0,2$ olarak ayarlandı. Nötralizasyon işleminin tamamı +4°C'de gerçekleştirildi. Nötralizasyon işlemi sonucunda 8 ve 10 mg/ml konsantrasyonda pre-jel çözeltileri hazırlandı.
4. Jelleşme işleminin gerçekleşmesi için pre-jel çözeltileri 37°C'ye ayarlanmış etüvde 1 saat inkübe edildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Deselülerize Dokulardan Hidrojel Sentezi

3.5. Hidrojel Karakterizasyonu

3.5.1. Reolojik Analiz

Elde edilen hidrojellerin mekanik özellikleri reometre cihazı (Malvern, Birleşik Krallık) ile analiz edildi.

1. İlk olarak örnekler sabit frekans (1 rad/sn (0,1592 Hz)) değerinde gerinim taramasına tabi tutuldu.
2. Gerinim taramasının ardından cihaz 10°C'ye ayarlanarak, pre-jel formu plaka üzerine yayılarak cihaz ayarlamaları yapıldı. Sıcaklık taraması için sabit 1 rad/s (0,1592 Hz) ve %1 uzama değerlerinde sıcaklık 37°C'ye yükselirken iki saniyede bir ölçüm alındı [185] .
3. Sıcaklık taramasının ardından sabit 37°C, 1 rad/s (0,1592 Hz) ve %1 uzama değerlerinde zamana bağlı depolama ve kayıp modül değerleri ölçüldü.

3.5.2. Jelleşme Kinetiği

Jelleşme kinetiği türbidimetrik analiz yöntemiyle gerçekleştirildi [172].

1. Türbidimetrik ölçüm için 100 µl pre-jel solüsyonu n=3 olacak şekilde 96-kuyucuklu plakalara konuldu. Bu işlem +4°C'de gerçekleştirildi.
2. Mikroplaka okuyucu 37°C'ye ayarlandı.

3. Plaka mikroparka okuyucuya yerleştirilerek 405 nm’de 60 dakika boyunca her 3 dakikada bir ölçüm alındı.
4. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki denklem yardımıyla hesaplandı:

$$NA = (A - A_0) / (A_{\max} - A_0)$$

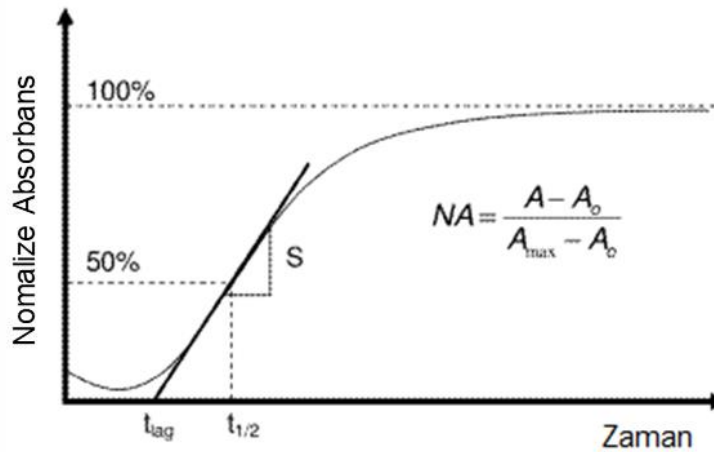
NA= Normalize absorbans değeri

A= Herhangi bir zamandaki absorbans değeri

$A_{\max}$ = Maksimum absorbans değeri

A_0 = Minimum absorbans değeri

Normalize edilmiş değerlerden elde edilen grafik ile t_{lag} (gecikme fazı), $t_{1/2}$ (nihai türbiditenin yarısına kadar ulaşması gereken süre), t_{95} (nihai türbiditenin %95’ine ulaşmasına kadar gerekli olan süre) ve S (jelleşme hızı) değerleri hesaplandı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Turbidimetrik analiz sonucunda t_{lag} , $t_{1/2}$ ve S'in hesaplanması [172]

3.5.3. Hidrojellerin Şişme Kinetiği

Hidrojellerin su tutma kapasitesinin ölçülmesi için şişme testi uygulandı [186].

1. 8 ve 10 mg/ml konsantrasyondaki hidrojeller 48-kuyucuklu plaka içerisinde 500 μ l konularak 37°C’de 1 saat inkübe edilerek hazır hale getirildi.
2. Hazırlanan jeller dikkatli bir şekilde 48-kuyucuklu plakadan alınarak 24-kuyucuklu plaka içerisine aktararak 24 saat boyunca 37°C’de 1X PBS içerisinde inkübe edildi.
3. PBS ile inkübasyon sonrası hidrojellerin ağırlıkları ($W_{\text{şişme}}$) ölçüldü.

4. Daha sonra bu jeller 50°C’de 48 saat kurutularak kuru ağırlıkları (W_{kuru}) ölçüldü.
5. Şişme oranı (S) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı;

$$\%S = ((W_{\text{şişme}} - W_{kuru}) / W_{kuru}) * 100$$

3.5.4. Hidrojellerin Yüzey Özellikleri

Hidrojellerin yüzey özelliklerinin incelenmesi ve çapraz bağlanmanın gösterilmesi için SEM görüntüleme yapılmıştır. Hücreli ve hücresiz hidrojel örnekleri 3.3.3.2.’de belirtildiği gibi hazırlanmış ve 4 nm Au/Pd ile kaplandıktan sonra SEM görüntüleme yapılmıştır.

3.6. Hücre Kültürü

Tez kapsamında yer alan hücre kültür çalışmaları insan, sağlıklı, bronşiyal epitel hücre hattı olan BEAS-2B (CRL-9609, American Type Cultural Collection, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. BEAS-2B hücreleri 1988 yılında Curtis C. Harris ve arkadaşları tarafından 12SV40 adenovirüsü ile transfeksiyon ve ardışık pasajlama yoluyla ölümsüzleştirilmiştir [187]. Çoğaltılan hücreler deselülerize hidrojeller üzerine ekilerek transwell insert yardımıyla air-liquid interface (ALI) sisteminde farklılaşmaya alınarak 1, 7, 14 ve 21. günlerde TEER; 96-kuyucuklu plakalara ekilerek ise 1, 3, 5 ve 7. günlerde ise hücre sayısı ölçümü yapılmıştır.

3.6.1. Deselülerize Hidrojeller ile Hücre Kültür Çalışmaları

Deselülerize dokular hidrojel sentezi ve hücre kültürü aşamasından önce steril hale getirilmiştir. Hidrojel sentezi sırasında kullanılan tüm çözeltiler (HCl, NaOH, PBS) 0,22 µm PVDF şırınga filtresinden geçirilerek kullanılmıştır.

3.6.1.1. Hidrojel Sterilizasyonu:

1. Dokular 30 µg/ml DNaz ile 1 saat boyunca 37°C de inkübe edildi.
2. Dokular 1X PBS ile orbital çalkalayıcı üzerinde 12 saat boyunca yıkandı.
3. Dokular küçük parçalar halinde 16 saat boyunca 50°C etüvde kurutuldu.
4. Kuru ağırlıkları tartıldı.
5. Dokular %3’lük Pen/Strep içerisinde 4 saat orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
6. Antibiyotik uygulamasının ardından dokular, 2 saat boyunca %70’lik etanolde kabin içerisinde bekletildi ve ardından UV ile steril hale getirildi.

7. Steril hale getirilen dokulardan steril şartlar altında ESM hidrojel sentezi gerçekleştirildi.
8. Elde edilen pre-jel çözeltileri için hücre ekimine geçmeden önce son olarak UV kullanılarak terminal sterilizasyon yapıldı.

3.6.1.2. Hücre Kültür Plakalarının Hazırlanması:

Plakaların hidrojelle kaplanması:

0,1 mg/ml konsantrasyona sahip pre-jel konsantrasyonu hazırlanarak, 24-kuyucuklu plaka içerisine yerleştirilen transwell insertlerin membranı üzerine 60 µl olacak şekilde eklendikten sonra, +4°C’de bekletildi. Hücre ekiminden pre-jel solüsyonu uzaklaştırıldı ve kuyucukların içi 1X PBS ile yıkanarak transwell membranı üzerine $1,0 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi.

Hidrojel üzerine hücre ekimi:

8 mg/ml ve 10 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan pre-jeller 60 µl alınarak transwell insert membranı üzerine eklendi. Daha sonra plaka 37°C’de 1 saat bekletildi. Elde edilen hidrojeller üzerine $1,0 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi.

3.6.2. BEAS-2B Hücrelerinin Çoğaltılması

1. BEAS-2B hücreleri flask yüzey alanının %80’ini kaplayacak hale gelinceye kadar 25 cm²’lik flasklarda BEGM (Lonza, Clonetics) besiyeri ile çoğaltıldı.
2. Hücrelerin belirtilen yoğunluğa ulaşmasının ardından hücreler tripsinle kaldırıldı ve Thoma lamında hücre sayımı gerçekleştirildi.
3. 0,4 µm por çapına sahip transwell insertler üzerine $1,0 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.
4. Hücreler BEGM besiyeri kullanılarak çoğaltıldı. BEGM besiyeri insülin, transferrin, hidrokortizon, epinefrin, GA100 (gentamisin ve amfoterisin), retinoik asit, triiyodotironin, EFG (epidermal büyüme faktörü) gibi biyolojik ajanlar içermektedir.
5. Hücreler, iki günde bir değiştirilen besiyeriyle inkübe edildi ve transwell insert yüzey alanını %100 kaplayacak seviyeye geldiğinde farklılaştırma adımına geçildi (Yaklaşık 4. gün).
6. Farklılaştırma için hücrelerin üst kısmında ve transwell insertin alt çemberinde yer alan besiyeri uzaklaştırıldı. Alt hazneye B-ALI farklılaştırma besiyeri eklendi.

Transwellin üst kısmına besiyeri eklenmeden hücrelerin hava ile temas etmesi sağlandı.

7. Hücreler, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren ortam koşullarında inkübe edildi.
8. Alt haznedeki farklılaştırma besiyerinin iki günde bir değiştirilerek 21 gün boyunca farklılaşma işlemine devam edildi.

3.6.3. Hücre Proliferasyonu

BEAS-2B hücrelerinin proliferasyonunun analizi için 96-kuyucuklu plakalar 3.6.1.2.'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Flask yüzey alanının %80'ini kaplayacak hale gelinceye kadar 25 cm²'lik flasklarda BEGM besiyeri ile çoğaltılan BEAS-2B hücreleri, başlangıç hücre konsantrasyonu 1,0x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96-kuyucuklu plakalara ekildi. Hücre proliferasyonunun analizi 1., 3., 5. ve 7. günlerde CyQuant Cell Proliferation Assay (Thermo Fisher Scientific, ABD) kitine uygun olarak gerçekleştirildi:

1. 1., 3., 5. ve 7. günlerde kuyucuklardaki besiyeri çekilerek 1X PBS ile yıkama yapıldı. Plakalar -80°C'ye kaldırıldı.
2. Ölçüm için kit protokülüne uygun olarak çalışma solüsyonu ve standart hazırlandı.
3. Çalışma solüsyonunun hazırlanması için kullanılacak olan kuyucuk sayısına göre hesaplama yapılarak kit içerisindeki hücre-liziz tamponu ultra saf su ile 20X konsantrasyondan 1X konsantrasyonuna seyreltilti. CyQuant GR boyası ise hücre-liziz tamponu ile 400 kat sulandırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı.
4. Standart eğri oluşturmak için kullanılacak olan λ DNA standart konsantrasyonu CyQuant GR boya içeren hücre-liziz tamponu kullanılarak 100 µg/ml'den 1 µg/ml'ye seyreltilti. 1 µg/ml standart çözeltisinden her bir kuyucuk içerisinde 200 µl olacak şekilde seri seyreltmeler yapılarak 0, 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ng/ml konsantrasyonlarında DNA standartları oluşturuldu.
5. Çalışma solüsyonu her bir kuyucuğa 200 µl eklenerek 2-5 dakika inkübe edildi.
6. Son olarak eksitasyon = 480 nm ve emisyon = 520 nm olacak şekilde mikropłaka okuyucuda ölçüm alındı.

3.6.4. TEER Ölçümü

ALI kültürde farklılaştırılan hücreler için Trans Epitel Elektriksel Direnç (TEER) ölçümü gerçekleştirilmiştir. TEER ölçüm yöntemi, apikal ve bazal besiyerleri arasında elektrik

akımını ölçen bir elektrot çubuk yerleştirilerek gerçekleştirilmektedir. TEER ölçüm protokolü aşağıda belirtilmiştir:

1. Ölçümden önce besiyeri ve PBS su banyosunda 37°C 'ye ısıtıldı.
2. Transwell insertin üst kısmına 200 µl PBS eklendi.
3. PBS eklenmiş insert 5 dakika etüvde inkübe edildi.
4. TEER ölçüm cihazı ile direnç ölçüldü.
5. Üst kısımdaki PBS uzaklaştırıldı.
6. Transwell insertin alt kısmına yeni besiyeri eklendi ve hücreler etüve kaldırıldı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Tez kapsamı boyunca elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizi Graph Pad Prism 9.0.0 programıyla yapılmıştır. Veriler $\pm$ ortalama standart hata ile gösterilmiştir. Proliferasyon sonuçları hariç tüm analizlerde tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA) kullanılmıştır. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. Proliferasyon sonuçlarının analizinde ise çift yönlü varyans analizi (Two way ANOVA) kullanılmıştır. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

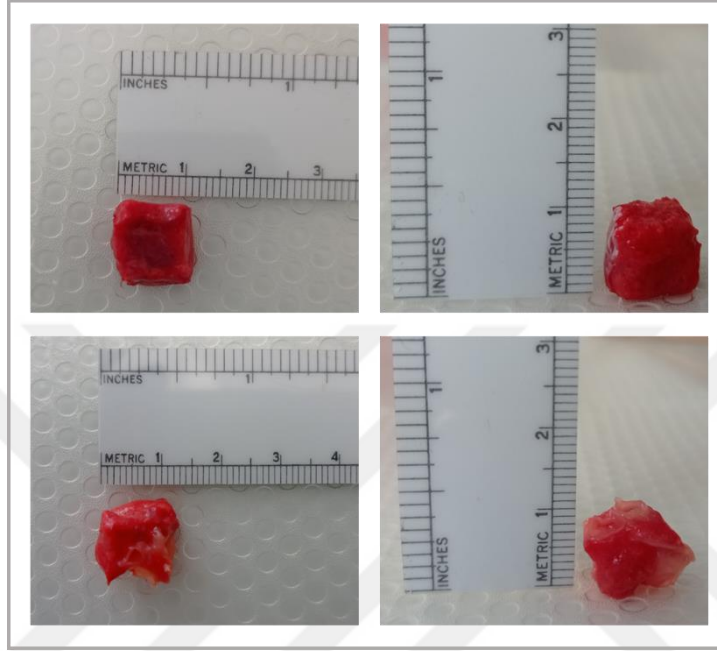
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında akciğer hücreleri için optimum bir kültür ortamı sağlayacak ve akciğer ekstraselüler matriksini yansıtacak hücresizleştirilmiş doğal doku iskelesi üretimi amaçlanmıştır. Literatürde akciğer deselülerizasyonu için optimize edilmiş ve standart kabul edilen bir yöntem henüz bulunmadığı için çalışma kapsamında farklı deselülerizasyon metodlarının etkinliği karşılaştırılmıştır [188]. Koyun akciğeri kullanarak elde edilmek istenen doku iskelesi için SDS, Triton X-100, CHAPS, Sodyum Kolat Hidrat, NP-40 ve ASB-14 deterjanları kullanılmıştır. Bu deterjanların seçilmesinde her bir deterjanın kendi içerisindeki avantaj ve dezavantajları düşünülerek akciğer dokusu için en uygun deterjan ve yöntem belirlenmeye çalışılmıştır. SDS gibi iyonik deterjanlar güçlü çözündürücü maddeler olup protein etkileşimlerini ve aktivitelerini bozmaktadır. Buna karşılık, non-iyonik deterjanlardan NP-40, Triton X-100 ve zwitteriyonik olan CHAPS gibi deterjanlar daha az denatüre edici maddelerdir. Bu deterjanlar proteinleri nispeten daha korunmuş şekilde tutar; ancak hücre altı organellerden ve zarlardan proteinleri çıkarmada daha az etkili olduğu gösterilmiştir [189]. Yapılan çalışmalarda doku üzerinde kalan lipofilik antijenlerin hidrofilik antijenlere göre daha şiddetli immün yanıtı uyurabileceği öne sürülmüştür [190]. Lipofilik antijenlerin uzaklaştırılmasında farklı tipte deterjanların farklı başarıları olmasına rağmen, zwitteriyonik sülfobetain deterjan ailesi (ASB-14, ASB-16) aday ksenojenik dokulardan bu zorlu bileşenlerin uzaklaştırılmasında özellikle umut vaat etmiştir [191]. Tez çalışması kapsamında SDS, Triton X-100, Sodyum kolat hidrat, NP-40 deterjanları için %0,5 ve %1; ASB-14 için 2, 4, 8 ve 12 mM; CHAPS için ise 2, 4 ve 8 mM (pH=8 ve pH=12) konsantrasyonlarındaki çözeltileri kullanılarak 48 ve 72 saat deselülerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İskelelerin karakterizasyonu için histolojik boyama, DNA izolasyonu, ESM proteinlerinin sayısal analizi ve SEM görüntüleme yapılmıştır. Daha sonra elde edilen doku iskelelerinden deselülerize hidrojel sentezi gerçekleştirilmiştir. Hidrojellerin karakterizasyonu reolojik ölçüm, turbidimetrik analiz, şişme kinetiği ve SEM görüntüleme analiz yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca elde edilen deselülerize hidrojellerin başarısı hücre kültür çalışmalarıyla değerlendirilmiştir.

4.1. Matriks Karakterizasyonu

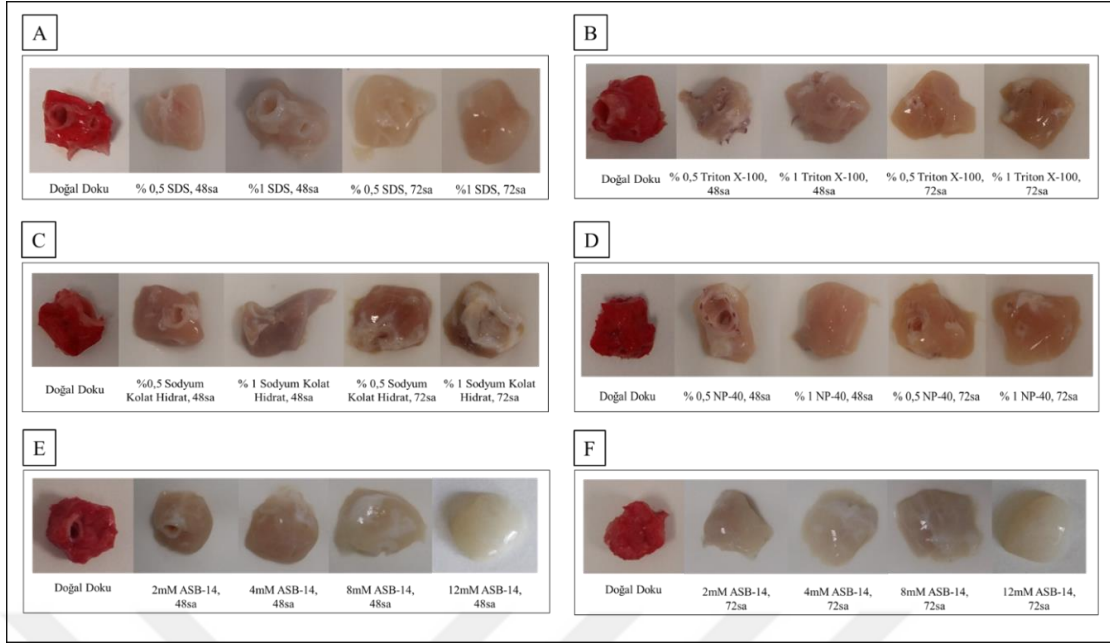
4.1.1. Deselülerizasyon Öncesi ve Sonrası Görüntüleme

Deselülerizasyon için koyun akciğerinden 1 cm³'lük kesitler alınmıştır. Akciğerin farklı bölgelerinden alınan doku kesitleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir



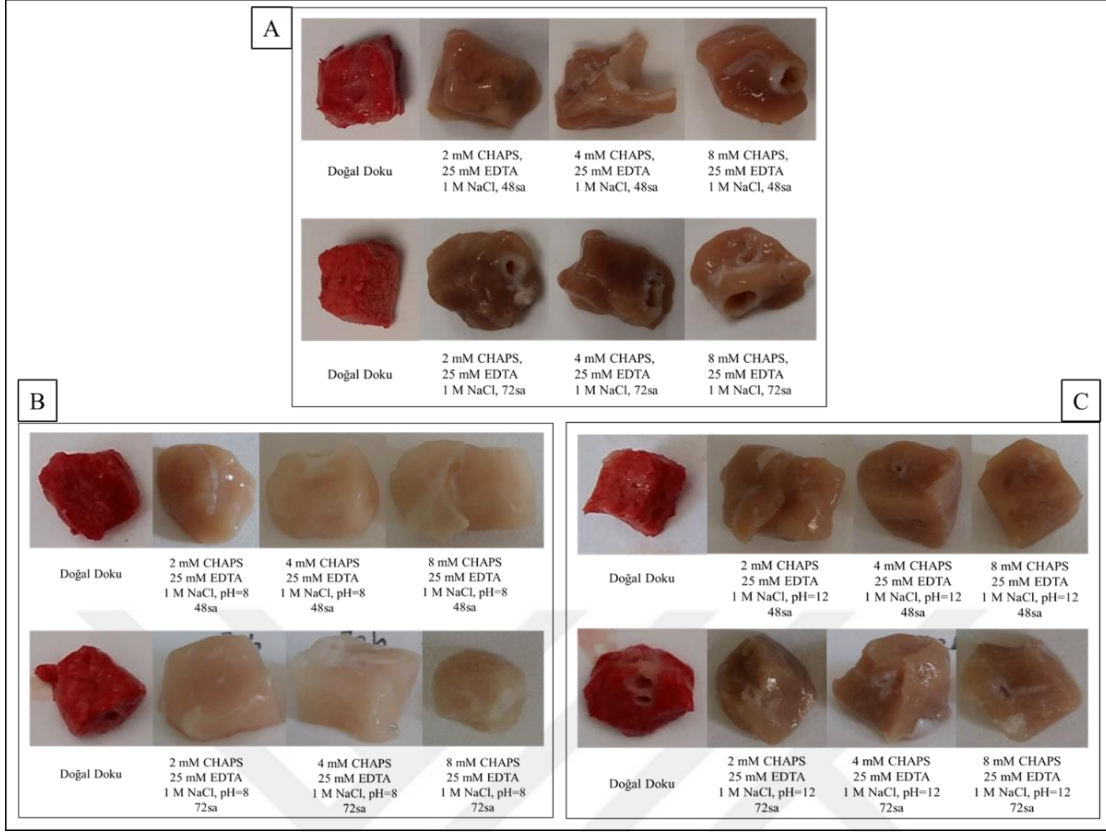
Şekil 4.1. Deselülerizasyon işlemi için kullanılmış olan 1 cm³'lük doku kesitleri

Dokular SDS, Triton X-100, CHAPS, Sodyum kolat hidrat, NP-40 ve ASB-14 deterjanlarının farklı konsantrasyonlarıyla 48 ve 72 saat deselülerize edilmiştir. Dokuların morfolojik değişimlerini değerlendirmek için deselülerizasyon öncesi ve sonrası görüntüleme yapılmıştır. Bu deterjanların konsantrasyon ve uygulama süreleri literatür bilgisi ve ön deneme sonuçlarına göre belirlenmiştir [156, 157, 192]. 2010 yılında Ott ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada % 0,1 SDS ve %1 Triton X-100 deterjanları kullanılarak akciğer deselülerizasyonu gerçekleştirilmiştir [155]. 2013 yılında O'Neill ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 1,8 mM SDS, 8 mM CHAPS (25 mM EDTA, 1 M NaCl) deterjanlarının da kullanıldığı üç farklı kimyasal deselülerizasyon metodunun insan ve domuz akciğeri üzerindeki etkisi karşılaştırılmıştır [157]. Ayrıca, 2014 yılında Nonaka ve arkadaşları tarafından %1 SDS deterjanın kullanıldığı fare akciğeri deselülerizasyonu çalışması gerçekleştirilmiştir [193]. SDS, Triton X-100, Sodyum kolat hidrat, NP-40 ve ASB-14 deterjanlarıyla yapılan deselülerizasyon sonrası görüntüler sırasıyla Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Koyun akciğerinden alınan doku kesitlerinin deselülerizasyon öncesi ve sonrası görüntüsü (A) SDS, 48 ve 72 saat, (B) Triton X-100, 48 ve 72 saat, (C) Sodyum kolat hidrat, 48 ve 72 saat, (D) NP-40, 48 ve 72 saat, (E) ASB-14, 48 saat ve (E) ASB-14, 72 saat deselülerizasyon öncesi ve sonrası görüntüleri

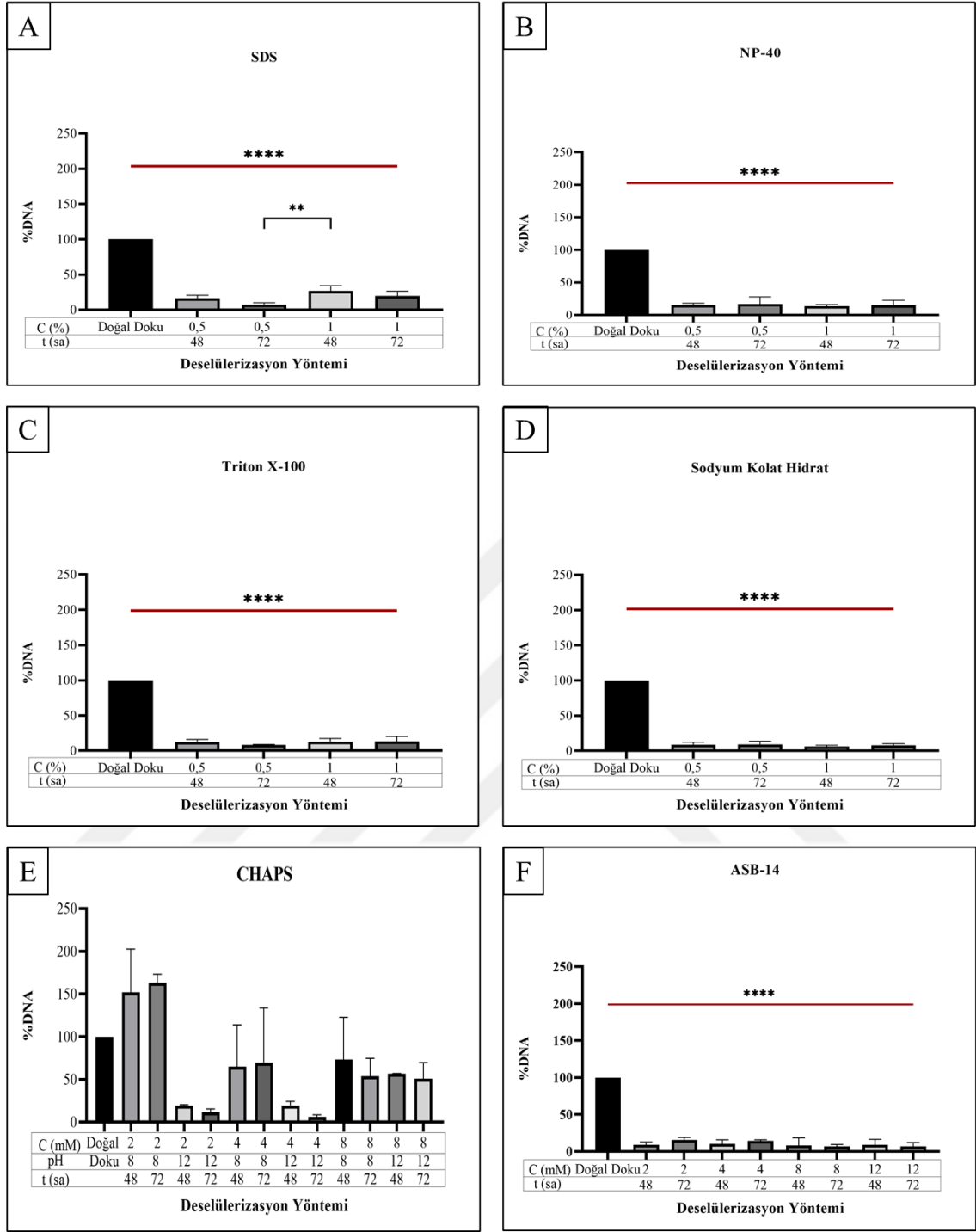
CHAPS deterjanı için 25 mM EDTA ve 1 M NaCl çözeltisi içerisinde, 2 mM, 4 mM ve 8 mM konsantrasyonlarında CHAPS deselülerizasyon çözeltisi hazırlanmış, 48 ve 72 saatlik uygulama gerçekleştirilmiştir [151]. Tekrarlanan uygulama sonucunda etkili bir sonuç alınamamıştır. 2014 yılında Tsuchiya ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada farklı pH seviyelerindeki CHAPS konsantrasyonunun akciğer deselülerizasyonu üzerinde olan etkisi incelenmiştir [194]. Buradan hareketle CHAPS deterjanının etkinliğini arttırmak için pH=8 ve pH=12 değerlerinde, 25 mM EDTA ve 1 M NaCl çözeltisi içerisinde, 2 mM, 4 mM ve 8 mM konsantrasyonunda deterjan çözeltileri hazırlanarak deney tekrarlanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. (A) CHAPS, 48 ve 72 saat (B) CHAPS, pH=8, 48 ve 72 saat (C) CHAPS, pH=12, 48 ve 72 saat deselülerizasyon öncesi ve sonrası görüntü

4.1.2. DNA İzolasyonu

Matriksin nicel karakterizasyonu için öncelikli olarak DNA izolasyonu yapılmıştır. CHAPS hariç bütün deterjanlarda yapılan koşullarda çekirdeklerin doğal dokuya göre % 80'den fazlası uzaklaştırılmıştır. SDS, Triton X-100, Sodyum Kolat Hidrat, NP-40 ve ASB-14 deterjanlarıyla yapılan deselülerizasyon koşullarına ilişkin DNA izolasyon sonuçları Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Deselülerizasyon uygulaması sonrası DNA Sonuçları (A)SDS, (B) NP-40, (C) Triton X-100, (D)Sodyum Kolat Hidrat, (E) CHAPS, (F)ASB-14, C=konsantrasyon, t=süre, n=3, p:0,1234 (ns), 0,0332 (*), 0,0021 (**), 0,0002 (***), <0,0001 (****)

SDS deterjanı ile yapılan deselülerizasyon işlemi sonrasında en etkili olan koşul % 0,5 konsantrasyon ve 72 saat bulunmuştur. Triton X-100 ile yapılan deselülerizasyon

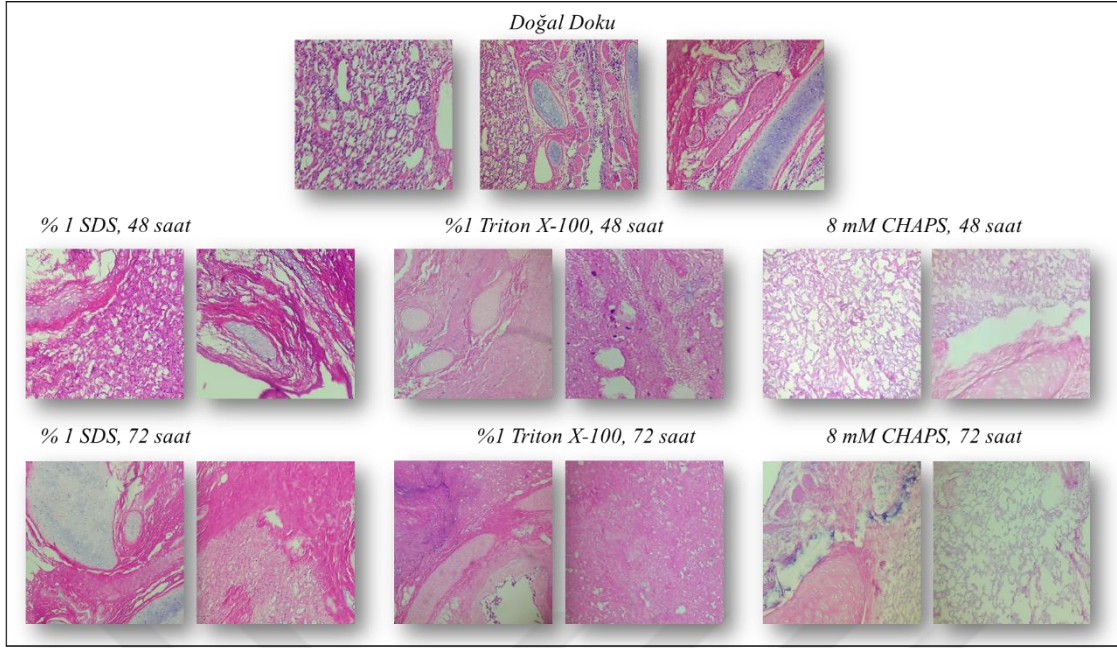
sonrasında en etkili koşul SDS deterjanı ile benzer şekilde % 0,5 konsantrasyon ve 72 saattir ve DNA miktarını %90'ın üzerinde azaltmıştır [105]. Sodyum kolat hidrat ve ASB-14 deterjanları ise benzer olarak nükleer içeriğin uzaklaştırılmasında genel olarak % 90'ın üzerinde başarı göstermiştir. %1 sodyum kolat hidrat, 48 saat ve ASB-14 deterjanının 8 ve 12 mM, 72 saat uygulamaları sonucunda doğal dokuya kıyasla en az % 93'lük bir azalma söz konusudur. ASB-14 deterjanının ksejonik kaynakların uzaklaştırılmasındaki etkinliği sığır perikardiyum çalışmalarında gösterilmiştir [195]. Bu çalışma ile de ASB-14 deterjanının akciğer deselülerizasyonu üzerindeki gelecekteki çalışmalar için umut vadeditici olabileceği sonucuna varılmıştır. NP-40 deterjanı ile yapılan deselülerizasyon sonucunda genel olarak DNA miktarında %80 bir azalma vardır. Bu oran SDS, Triton X-100, Sodyum kolat hidrat ve ASB-14 deterjanıyla yapılan deselülerizasyona kıyasla daha düşük kalmaktadır. CHAPS ile gerçekleştirilen deselülerizasyon işlemi sonucunda ise DNA miktarında ortalama %60 bir azalama meydana gelmiştir. Çalışmamızda kullanılan diğer deterjanlarla karşılaştırıldığında çekirdeklerin uzaklaştırılmasında en az etkiye sahip deterjan CHAPS olmuştur. Literatürde yapılan çalışmalarda CHAPS'in akciğer deselülerizasyonu için etkili bir ajan olduğu söylenmektedir [36, 157]. O'Neill ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, insan ve domuz akciğerinin SDS, CHAPS ve 3 aşamalı metot adı verilen yöntemle deselülerizasyonu sonucunda DNA miktarı %95'in üzerinde uzaklaştırılmıştır [157]. Ancak, 2014 yılında Gilpin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada SDS, SDC ve CHAPS deterjanlarıyla gerçekleştirilen insan akciğer deselülerizasyonu çalışmasında, CHAPS'in DNA'yı uzaklaştırma üzerine olan etkisinin SDS ve SDC'ye göre daha düşük olduğu bulunmuştur [196]. 2019 yılında Fernández-Pérez ve arkadaşları tarafından SDS, Triton X-100 ve dondur/çöz yönteminin karşılaştırıldığı kornea çalışmasında SDS'in DNA miktarını doğal dokuya kıyasla yaklaşık %80 azalttığı gösterilmiş ve bu değer istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Günümüzde deselülerizasyon işleminin başarısını değerlendirmek için kabul edilmiş evrensel bir standart bulunmamaktadır. Crapo ve arkadaşları etkili bir deselülerizasyon işleminin gerçekleşmiş olması için, deselülerize ESM'nin mg başına içerdiği çift iplikli DNA (dsDNA) 50 ng'dan az ve DNA fragment uzunluğunun 200 bp'den kısa olması ve H&E veya DAPI boyamasında gözle görülür çekirdek olmaması gerektiğini belirtmişlerdir [135]. Bunun yanı sıra Casali ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada dokuların sertlik, hücre yoğunluğu, ESM kompozisyonu vb. özellikler açısından büyük farklılıklar gösterebileceğini bu nedenle de deselülerizasyonla ilgili süreçlerin spesifik dokuya göre uyarlanması gerektiğini vurgulamışlardır [197]. Ayrıca,

son yıllarda yapılan çalışmalarda lipofilik antijenlerin hidrofilik antijenlere göre daha etkili greft spesifik immün yanıt oluşturacağı öne sürülmüştür. Aynı çalışmada lipid antijenlerinin en az %92'sinin uzaklaştırılmasının, greft spesifik immün yanıtın üstesinden gelmek için gerekli olduğu vurgulanmıştır [191]. ASB-14 deterjanın G-protein bağlı reseptör (GPCR) gibi membran proteinlerini CHAPS'a göre daha iyi bir şekilde çözdüğü gösterilmiştir [198].

Çalışma kapsamında başarılı sonuçların belirlenmesinde DNA'nın yüzde azalma miktarı dikkate alınmış, DNA miktarında doğal dokuya kıyasla %90 ve üzeri bir azalma gösteren başarılı olarak kabul edilmiştir.

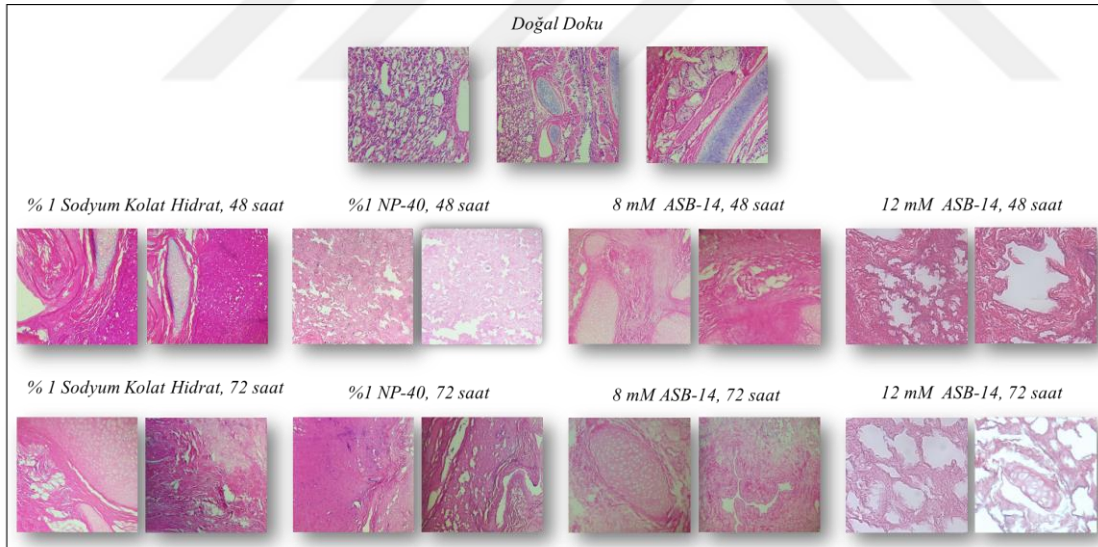
4.1.3 Histoloji Analiz Sonuçları

Elde edilen deselülerize dokuların nitel anaalizi için dört farklı histolojik boyama yöntemi kullanılmıştır. Çekirdekler H&E; kolajenler Masson's Trichrome; sGAG'lar alsiyan mavisi ve elastinler ise Van Gieson's boyamaları kullanılarak gözlemlenmiştir. Deney koşullarına ilişkin DNA sonuçlarının değerlendirilmesinin ardından H&E boyama yöntemi ile çekirdek boyaması yapılarak elde edilen görüntüler değerlendirilmiştir. H&E boyamaları SDS, Triton X-100, Sodyum kolat hidrat ve NP-40 deterjanlarının %1'lik konsantrasyonuyla 48 ve 72 saat yapılan deselülerizasyon sonucu elde edilen dokular için gerçekleştirilirken ASB-14 ve CHAPS deterjanının 8 mM konsantrasyonuyla 48 ve 72 saat deselülerizasyonu sonucunda elde edilen dokular için yapılmıştır. SDS, Triton X-100 ve CHAPS deterjanıyla 48 ve 72 saat süreyle gerçekleştirilen deselülerizasyon işlemine ilişkin H&E sonuçları Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. SDS, Triton X-100 ve CHAPS deterjanlarına ilişkin H&E boyama sonuçları

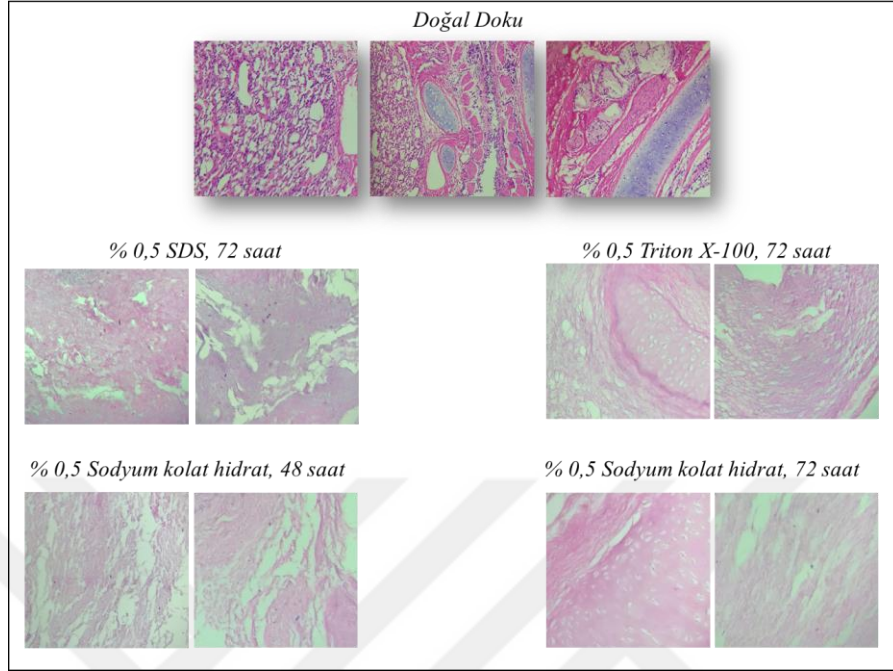
Sodyum kolat hidrat, NP-40 ve ASB-14 deterjanına ilişkin H&E boyama sonuçları ise Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Sodyum kolat hidrat, NP-40 ve ASB-14 deterjanlarına ilişkin H&E boyama sonuçları

Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’da çalışmada uygulanan yüksek konsantrasyonlara ait koşulların H&E boyama görüntüleri yer almaktadır. Bu koşullar içerisinde yer almayan ancak DNA miktarı %90’ın üzerinde azalma göstermiş olan %0,5 Sodyum kolat hidrat, 48 saat; %0,5

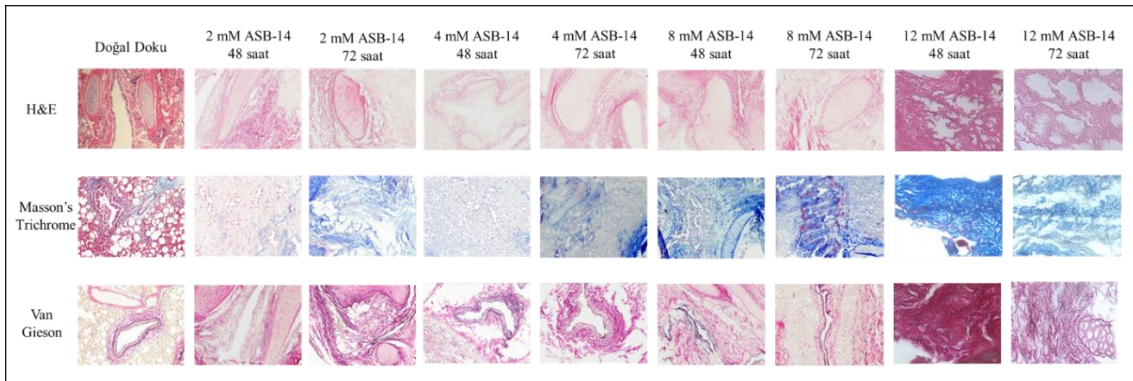
SDS, Triton X-100 ve Sodyum kolat hidrat, 72 saat koşullarına ilişkin sonuçlar ise Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. %0,5 Sodyum kolat hidrat,48 saat; %0,5 SDS, Triton X-100 ve Sodyum kolat hidrat, 72 saat koşullarına ilişkin H&E boyama sonuçları

Histolojik boyamalar DNA izolasyonundan elde edilen sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmiştir. Crapo ve arkadaşlarının belirttiği gibi histolojik boyamalar için belirlemiş oldukları başarı kriteri gözle görülür çekirdeğin olmamasıdır [135]. Uygulanan koşulların çoğunda doğal dokuya kıyasla hücrelerin dokudan uzaklaştırıldığı görülmüştür. Ancak, çoğu kesitte akciğerin üst, orta ve alt kısımlarından alınan ve bronş ve bronşiyollerini içeren doku parçalarının parankimal kısmında hücrelerin uzaklaştırılması daha etkili bir şekilde gerçekleşmesine rağmen, bronşların olduğu kıkırdak bölgedeki çekirdeklerin tam olarak uzaklaşmadığı ve parankime göre çekirdek kalıntıları olduğu görülmüştür. ASB-14 deterjanıyla gerçekleştirilen deselülerizasyon sonrasında alınan doku kesitlerinde parankim ve bronş kısmındaki hücrelerin oldukça etkili bir şekilde dokudan uzaklaştırıldığı ve gözle görülür çekirdek bulunmadığı gözlemlenmiştir. Tebyanian ve arkadaşlarının 2019 yılında yapmış oldukları çalışmada, akciğer kesitlerinin hücresizleştirilmesinde kullanılan CHAPS, CHAPS+SDS ve CHAPS+TritonX-100 deterjanlarının 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca uygulanması sonucu akciğerdeki yapısal etkiyi karşılaştırmışlardır. Bu değerlendirmeyi de histoloji, immüno Floresan boyama ve SEM analiziyle yapmışlardır. Değerlendirme sonucunda

yüksek deterjan konsantrasyonu ve uzun süreli uygulamalarda üç boyutlu akciğer mimarisinin yok olduğunu; düşük deterjan konsantrasyonlarında ise bu üç boyutlu mimarinin korunduğunu göstermişlerdir [192]. Liu ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptığı bir çalışmada sığır perikardiyumunun %1 SDS ve %1 ASB-14 ile kademeli olarak deselülerizasyonu gerçekleştirilerek farklı yöntemler kullanılarak üretilen iskelelerin hem ESM hasarının hem de deterjan kalıntısının yeniden hücrelendirme çalışmalarındaki hücre yapışması ve hücre popülasyonuna etkisi incelenmiştir. Perikardiyumun ASB-14 ve SDS deterjanlarıyla hücresizleştirilmesinden ve hücresizleştirilmiş iskelelerin yeniden hücrelendirilmesinden sonra histolojik boyama yapılmış ve matriks yapısı gösterilmiştir. Bu çalışmada SDS ile yapılan uygulamaların ASB-14 ile yapılan uygulamaya göre daha toksik etki gösterdiği ve ASB-14'ün hücre çalışmaları için elverişli bir doku iskelesi üretimini destekleyebileceği ortaya konmuştur [195]. Tez çalışması kapsamında DNA miktarında %90 üzerinde bir azalma gösteren ve H&E boyama sonuçlarında parankim ve bronşlarda çekirdeklerin iyi bir şekilde uzaklaştığı görülen ASB-14 deterjanının akciğer deselülerizasyonunda umut vadeci olduğu düşünülmektedir. Bu deterjana ilişkin sonuçların kapsamlı değerlendirilmesi için ASB-4 deterjanının 2 mM, 4 mM, 8 mM ve 12 mM konsantrasyonlarında 48 ve 72 saat boyunca gerçekleştirilen deney koşullarına ilişkin ESM proteinlerinin boyamaları yapılmıştır. ASB-14 deterjanıyla yapılan koşullara ilişkin H&E, Masson's Trichrome ve Van Gieson boyama sonuçları Şekil 4.8' de gösterilmiştir.

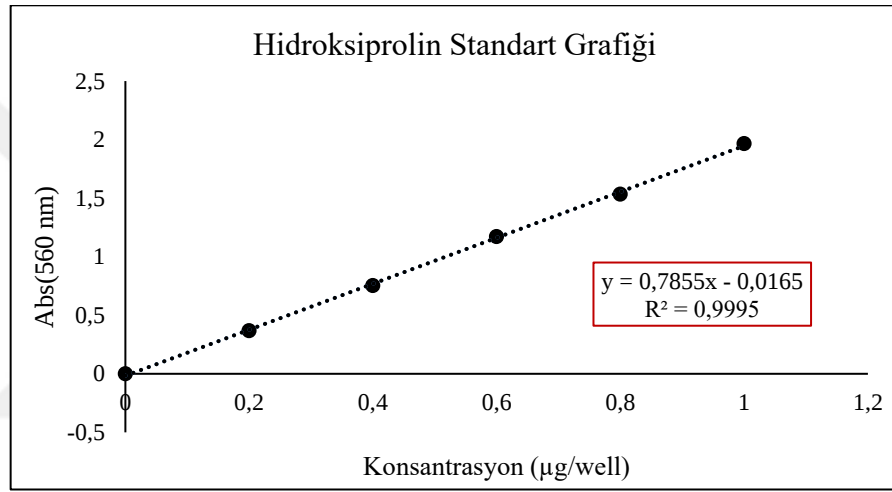


Şekil 4.8. ASB-14 deterjanına ilişkin H&E, Masson's Trichrome ve Van Gieson Boyama sonuçları

4.1.4. Hidroksiprolin Analiz Sonuçları

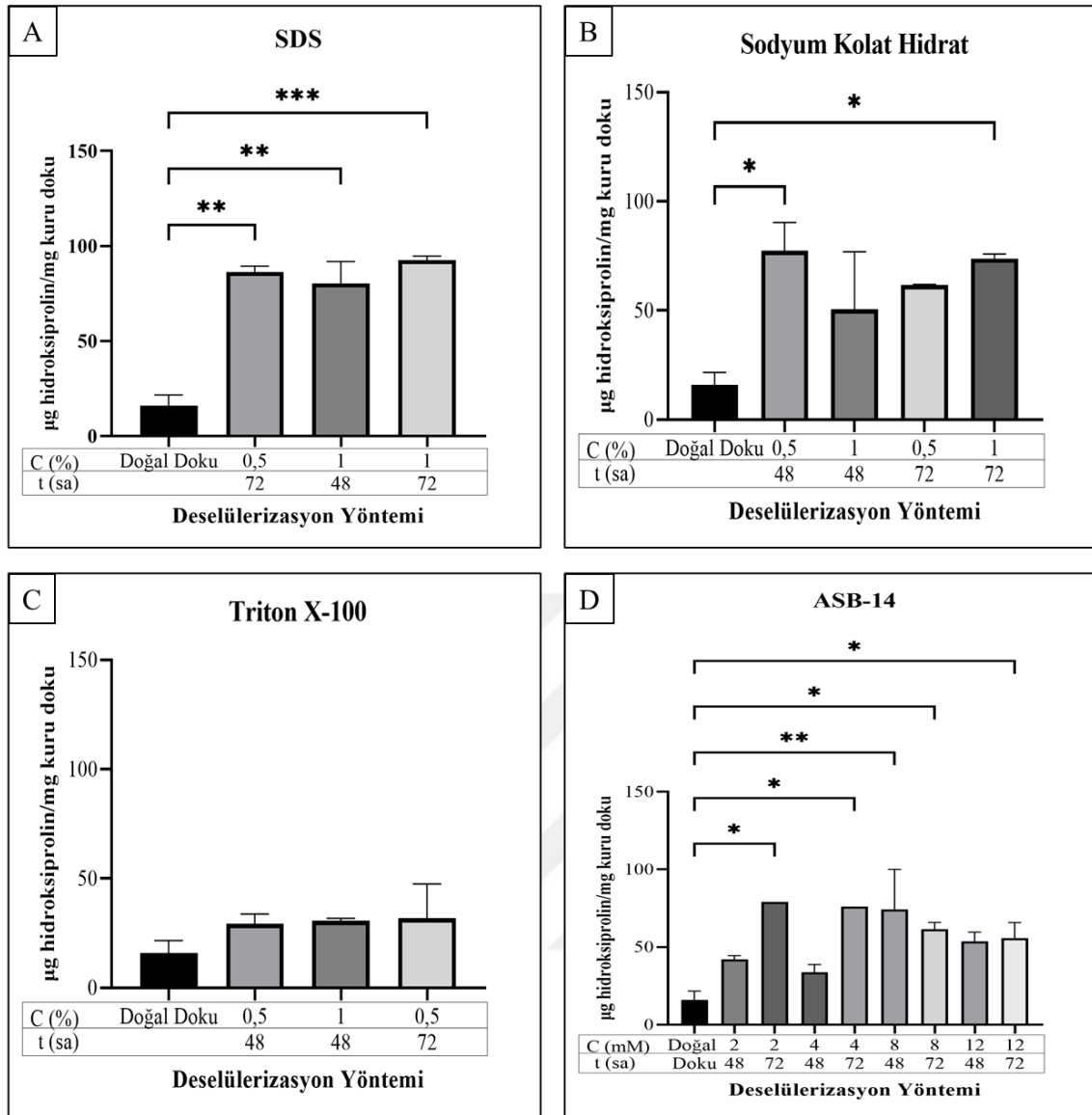
Kolajenler akciğer ekstraselüler matriksinin yaklaşık %60'ını oluşturması nedeniyle oldukça önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle deselülerize akciğer iskelelerinde kolajen

miktarının korunması mekanik dayanım ve hücre tutunması açısından büyük bir önem taşımaktadır. Yapılan DNA analizi sonucunda çekirdek miktarında %90 ve üzeri bir azalma gösterdiği için etkili olduğu düşünülen %0,5 SDS 72sa, %1 SDS 48sa, %1 SDS 72sa, %0,5 NP-40 72sa, %0,5 Triton X-100 48sa, %0,5 Triton X-100 72sa, %1 Triton X-100 48sa, %0,5 sodyum kolat hidrat 48sa, %0,5 sodyum kolat hidrat 72sa, %1 sodyum kolat hidrat 48sa, %1 sodyum kolat hidrat 72sa, 2 mM ASB-14 48sa, 2 mM ASB-14 72sa, 4 mM ASB-14 48sa, 4 mM ASB-14 72sa, 8 mM ASB-14 48sa, 8 mM ASB-14 72sa, 12 mM ASB-14 48sa ve 12 mM ASB-14 72sa koşullarına ilişkin kolajen miktarının belirlenmesi için hidroksiprolin ölçüm kiti kullanılmıştır. Hidroksiprolin standart grafiği Şekil 4.9’da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Hidroksiprolin standart grafiği

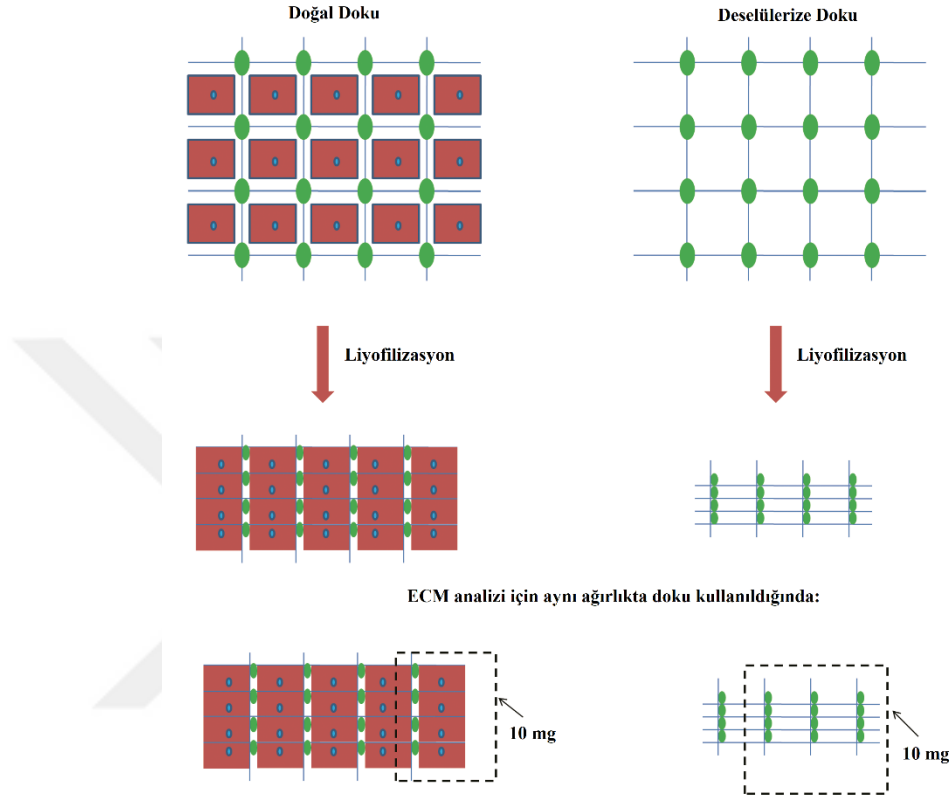
Hidroksiprolin miktarları tüm koşullarda doğal dokunun sahip olduğu değer üzerinde çıkmıştır. Triton X-100 deterjanına ilişkin koşullarda hidroksiprolin miktarının doğal dokuya kıyasla artış miktarı diğer deterjanlara göre daha azdır. SDS, Sodyum kolat hidrat, Triton X-100 ve ASB-14 deterjanlarıyla yapılan deselülerizasyon sonucu analiz edilen hücreleştirilmiş doku iskelelerinin hidroksiprolin miktarlarına ilişkin sonuçlar ise Şekil 4.10’de verilmiştir.



Şekil 4.10. Hidroksiprolin analiz sonuçları (A)SDS, (B) Sodyum kolat hidrat, (C)Triton X-100 ve (D) ASB-14, C=konsantrasyon, t=süre, p: 0,1234 (ns), 0,0332 (*), 0,0021 (**), 0,0002 (***), <0,0001 (****)

Elde edilen deselülerizasyon sonuçlarında hidroksiprolin miktarı doğal dokuya göre daha yüksek çıkmıştır. sGAG, kolajen ve elastin protein miktar analiz sonuçlarında karşılaşılan bu durum, Hussein ve arkadaşları tarafından 2015 yılında karaciğer deselülerizasyonu ile ilgili yapılan çalışmada deselülerize doku içerisindeki diğer proteinlerinin kaybının her iki dokunun eşit miktarına düşen birimdeki kolajen miktarını etkilediğini açıklamıştır ve Şekil 4.11’de gösterildiği gibi şematize edilmiştir [199]. Benzer şekilde, Wu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada %0,5 SDS, 72 saat uygulama yoluyla elde edilen deselülerize akciğer dokusundan hidrojel sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, kolajen miktarı doğal dokuya oranla daha yüksek bir değer göstermiştir bu durum

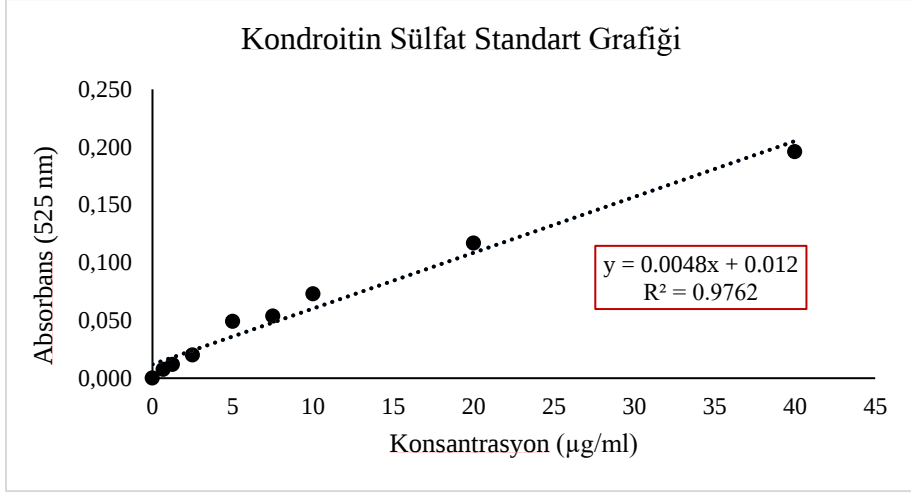
kolajenin, kolajen olmayan proteinlere kıyasla SDS'e daha dayanıklı olduğu ve diğer proteinlerin uzaklaşmasının ardından kolajen tutulumunun doğal dokuya göre daha yüksek bir değer olarak görünebileceği şeklinde yorumlanmıştır [200].



Şekil 4.11. Deselülerize dokuda GAG ve kolajen miktarının doğal dokuya göre yüksek çıkma nedeninin şematik gösterimi [199]

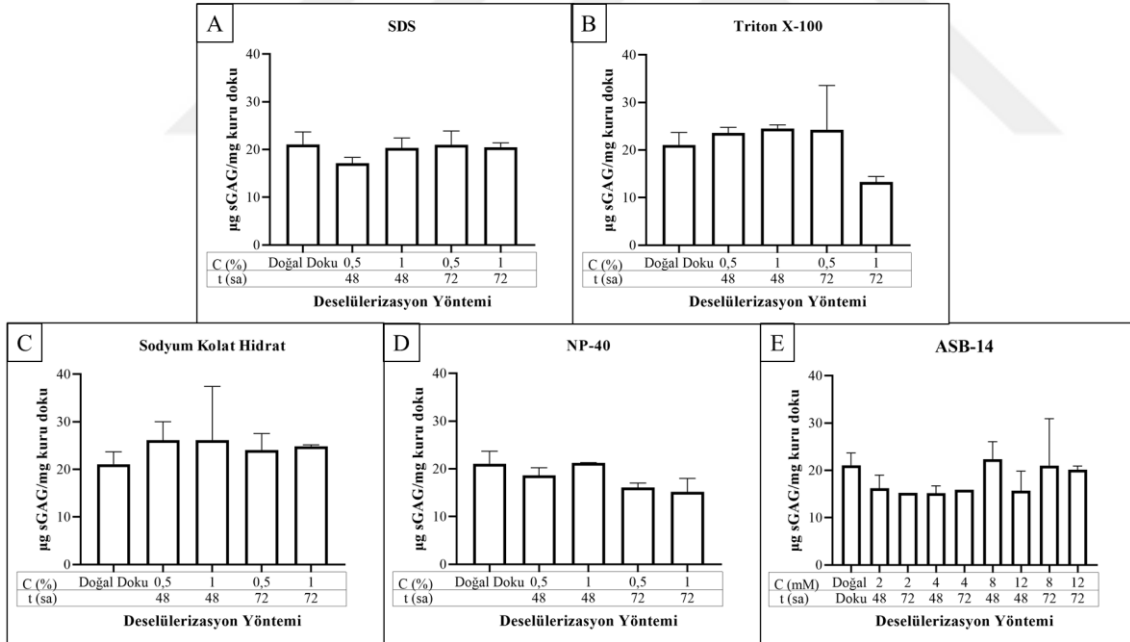
4.1.5. sGAG Analiz Sonuçları

Glikozaminoglikanlar hücre tutunması ve sinyal iletimi gibi çeşitli önemli rollere sahiptir. Bu nedenle, elde edilen deselülerize doku iskelelerinden DMMB analizi ile sGAG miktar tayini yapılmıştır. SDS, Triton X-100, Sodyum kolat hidrat, NP-40 ve ASB-14 deterjanlarıyla yapılan deselülerizasyon sonucunda sGAG miktarının korunduğu gözlemlenmiştir. Sadece %1 Triton X-100 deterjanının 72 saat uygulamasında %37'lik bir kayıp söz konusudur. DMMB analizi kullanılarak miktarı belirlenmiş olan sGAG tayini için standart olarak kondroitin sülfat kullanılmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Kondroitin sülfat standart grafiği

SDS, Triton X-100, Sodyum kolat hidrat, NP-40 ve ASB-14 deterjanlarıyla uygulanan koşullara ilişkin sGAG sonuçları Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Literatürde yer alan bilgilere göre SDS deterjanının GAG konsantrasyonunu düşürdüğü gösterilmiş olmasına rağmen çalışmamızda doğal dokuyla yaklaşık olarak aynı seviyede korunduğu bulunmuştur.



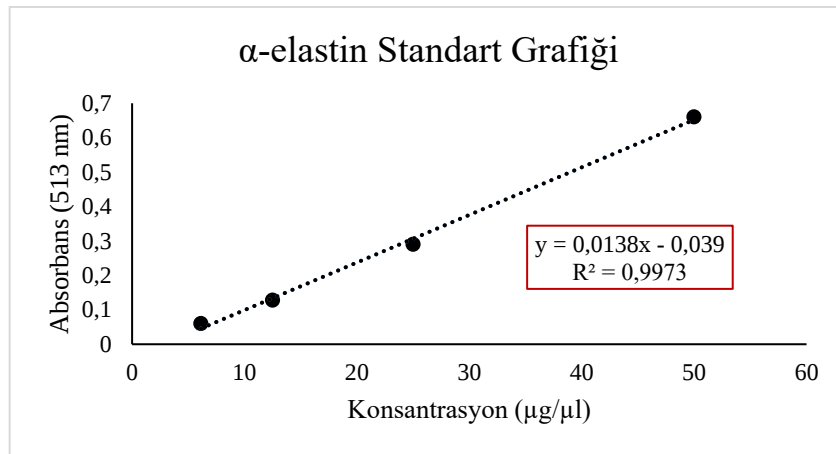
Şekil 4.13. DMMB analiz sonuçları (A) SDS, (B)Triton X-100, (C)Sodyum kolat hidrat (D)NP-40, (E)ASB-14, C=konsantrasyon, t=süre

Triton X-100 deterjanı, SDS'e göre daha az denatüre edici bir deterjan olarak bilinmesine ve protein-protein etkileşimine etki etmemesine rağmen GAG miktarının önemli olduğu durumlarda tercih edilmemektedir [106]. Literatürde, Triton X-100 deterjanıyla yapılan deselüerizasyon çalışmaları sGAG içeriği hakkında çelişkili sonuçlar içermektedir.

Triton X-100, etkili bir deselülerizasyon ajanı olarak düşünülse de etkinliği hücresizleştirilen dokuya ve belirli bir hücresizleştirme protokolünde birleştirildiği diğer yöntemlere bağlı olduğu belirtilmektedir [134, 201]. 2018 yılında Gaetani ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Triton X-100 (%1) ve SDS (%0,1, %0,5 ve %1) deterjanlarıyla gerçekleştirmiş oldukları pankreas dokusunun deselülerizasyonu yapılarak hidrojel üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, SDS ile yapılan koşullarda sGAG miktarı yüksek çıkmış ve bu durum deterjanın dokudaki analitik etkilerinden kaynaklanabileceği ve SDS'te bulunan sülfat gruplarının analizi etkileyebileceği ifade edilmiştir [202]. CHAPS deterjanına ait sGAG analizi yapılmamıştır. Ancak, literatürde yer alan bilgilere göre CHAPS hücresel materyalin uzaklaştırılması, kolajen ve elastin proteinlerinin korunmasında başarılı olmasına rağmen GAG miktarında düşüşe neden olduğu bilinmektedir [203].

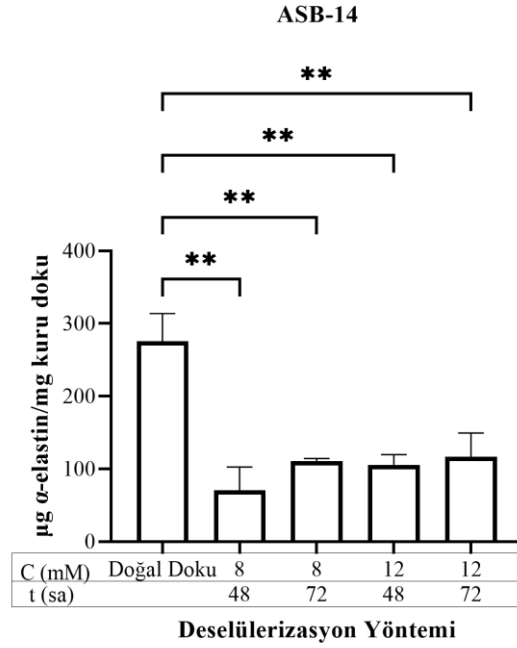
4.1.6. Elastin Sonuçları

Elastinler matriks esnekliği ve mekanik bütünlüğün sağlanmasında etkili olan bir diğer önemli ekstraselüler matriks proteinleridir. Mekanik destek sağlamanın yanında, hücre davranışlarında da etkili olan elastinin deselülerize doku iskelelerinde korunması önem taşımaktadır. DNA, H&E, kolajen ve sGAG sonuçlarından yola çıkarak ASB-14 deterjanının akciğer deselülerizasyonu üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. ASB-14 deterjanının 8 ve 12 mM konsantrasyonlarındaki dokuların elastin miktarı tayin edilmiştir. Deselülerize doku iskelelerinin elastin miktarı Fastin kiti ile ölçülmüştür. α -elastine ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. α -elastin standart grafiği

ASB-14 deterjanına ilişkin elastin sonuçları ise Şekil 4.15'te gösterilmiştir. ASB-14'ün 8 mM ve 12 mM'lık konsantrasyonlarının 48 saat süreyle uygulanması sonucu yaklaşık %60-75 arası bir kayıp yaşanırken, 72 saat süren uygulamalarda 48 saate nazaran daha az kayıp (%55-60) yaşanmıştır. Bu sonuçlar, koyun akciğerinde ASB-14 ile yapılan deselülerizasyon sonucunda literatüre benzer oranda elastin kaybı meydana geldiğini göstermektedir.



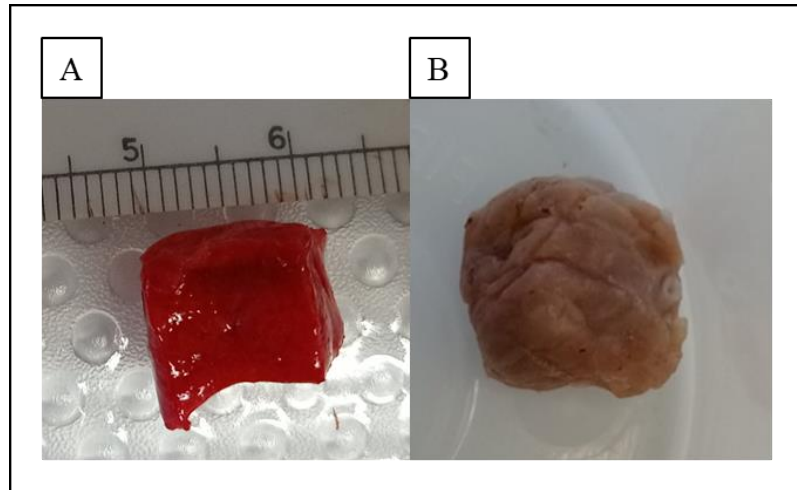
Şekil 4.15. Fastin kitiyle yapılan elastin miktar analizi sonuçları, C=konsantrasyon, t=süre, p: 0,1234 (ns), 0,0332 (*), 0,0021 (**), 0,0002 (***), <0,0001 (****)

2018 yılında Dalgliesh ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, sığır perikardiyum dokusunun amidosulfobetaine (ASB) deterjanlarıyla deselülerizasyonu sonucundaki etkileri değerlendirilmiştir. Doğal dokunun biyomekanik özelliklerini korurken, dokudaki ksejonik antijen kalıntılarının uzaklaştırılması arasındaki dengenin kurulması deselülerizasyon yöntemlerinde uzun süredir karşılan bir problemdir. Bu çalışmayla, ASB deterjanlarının hücrelerin yüksek oranda uzaklaştırılmasının yanı sıra, Van Gieson boyama yöntemiyle kolajen ve eleastin liflerinin yüksek oranda korunduğu gösterilmiştir [191]. 2013 yılında O'Neill ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada domuz akciğerinde 8 mM CHAPS ile yapılan deselülerizasyon sonucu elastin miktarında %63 kayıp yaşanırken; insan akciğerinde %73 oranında bir kayıp yaşanmıştır. Yine aynı çalışmada 1,8 mM SDS konsantrasyonu ile yapılan deselülerizasyon sonucunda domuz akciğerinde %82'lik bir kayıp meydana gelirken; insan akciğerinde %78 oranında bir

kayıp meydana gelmiştir. İnsan ve domuz akciğerinin her ikisi için de CHAPS deterjanının elastin miktarının korunmasında etkili olduğu söylenebilmektedir [157]. Domuz akciğeriyle yapılan başka bir çalışmada yine %40-64 oranında elastin kaybı söz konusudur [196]. Balestrini ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yapılan bir çalışmada, uygulanan deselülerizasyon protokolünün farklı türlere ait akciğer dokusundaki etkisinin farklılık gösterebileceğini vurgulanmıştır. İnsan, primat, domuz ve rat üzerinde yaptıkları çalışmada, rat ve domuzun doğal akciğer yapısının GAG miktarının insan ve primata göre daha yoğun olduğu, elastin miktarının ise daha az olduğunu göstermişlerdir. Deselülerizasyon işlemi sonucunda insan akciğerinin ESM yapısına en yakın yapıyı koruduğu bulunmuştur. Deselülerizasyon sonrası elastin içeriği insan, primat ve farelerde yüksek oranda artış gösterirken bu oran domuz akciğerinde düşük kalmıştır [161].

4.1.7. Fiziksel Deselülerizasyon (sCO₂) Sonuçları

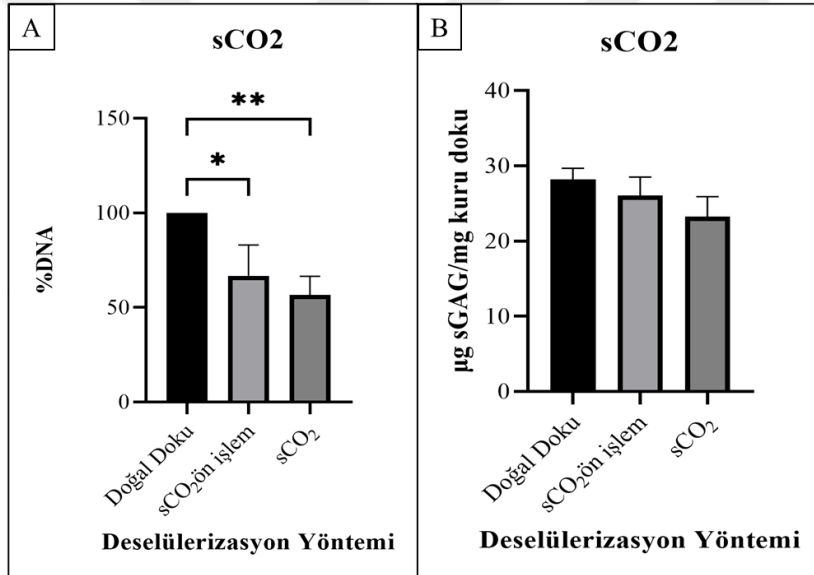
Kimyasal deselülerizasyona ek olarak akciğer dokuları için fiziksel deselülerizasyon işlemi de gerçekleştirilmiştir. Akciğer dokuları kimyasal deselülerizasyon işleminde olduğu gibi 1 cm³ boyutlarında kesit alınmıştır. sCO₂ cihazı içerisinde dokular üzerine 4500 psi basınçta bir saat süreyle deselülerizasyon işlemi uygulanmıştır. Uygulama sonucunda dokuların morfolojik görünümü Şekil 4.16'te verilmiştir.



Şekil 4.16. sCO₂ ile deselülerize edilen koyun akciğerinin görüntüsü (A) Deselülerizasyon öncesi (B) Deselülerizasyon sonrası

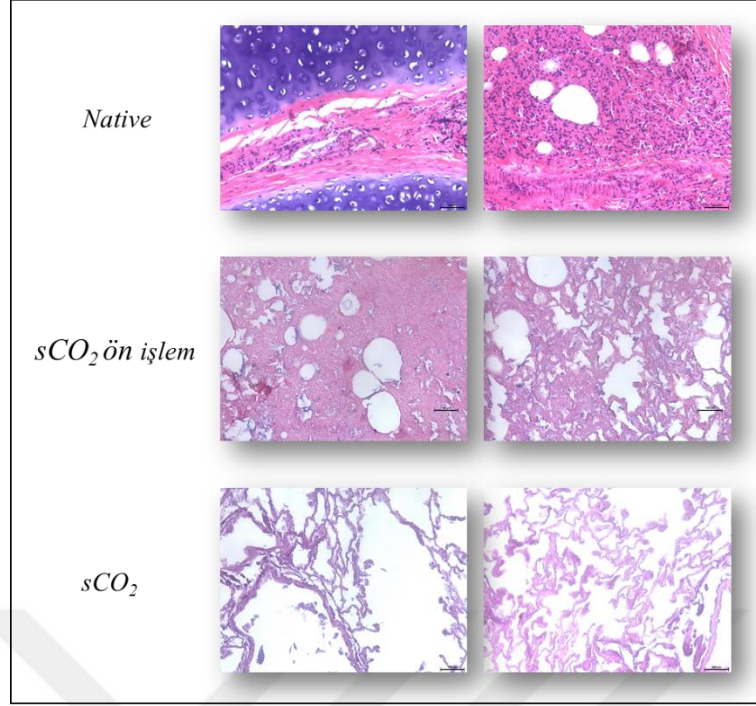
Deselülerizasyon işlemi sonrasında dokulardan DNA izolasyonu ve sGAG miktar tayini yapılmıştır. sCO₂ uygulamasından önce dokuların geçirgenliğini arttırmak için dokulara dondur/çöz ve hipotonik/hipertonik çözeltiyle karıştırma işlemleri uygulanmıştır. Bu ön çalışma koşullarına ilişkin koşullardan da örnek alınarak DNA ve sGAG değerleri

ölçülmüştür. Doğal doku, ön işlem ve sCO₂ uygulamasına ilişkin DNA ve sGAG sonuçları Şekil 4.17’de verilmiştir. Yapılan DNA analizi sonrasında doğal dokuya kıyasla %43’lük bir azalma meydana gelmiştir. sGAG’lar ise yaklaşık olarak %82 korunmuştur. DNA miktarı istenilen seviye uzaklaştırılmadığı için sCO₂’nin etkinliği tam olarak gösterilememiştir. Bu durumu etkileyen faktörlerden birinin kalınlık olduğu düşünülmektedir. Doku kalınlığının CO₂ penetrasyonunu düşürdüğü için hücrelerin dokudan tam olarak uzaklaştırılmadığı düşünülmüştür. Literatürde sCO₂ ile yapılan deselülerizasyon işleminde kullanılan basıncın ESM proteinlerine zarar verebileceği belirtilmiştir [135]. Yine de sCO₂’nin ESM’ye olan etkisi doku kaynağı ve uygulama prosedürüne göre değişmektedir. Topuz ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yayınlanan çalışmada, optik sinir, miyokard ve kornea üzerinde yapılan sCO₂ çalışmaları sonucunda farklı dokularda açığa çıkan etkiler gösterilmiştir [124].



Şekil 4.17. sCO₂ ile deselülerizasyon sonrası karakterizasyon sonuçları (A) DNA izolasyonu, (B) sGAG tayini, n=3, p: 0,1234 (ns), 0,0332 (*), 0,0021 (**), 0,0002 (***), <0,0001 (****)

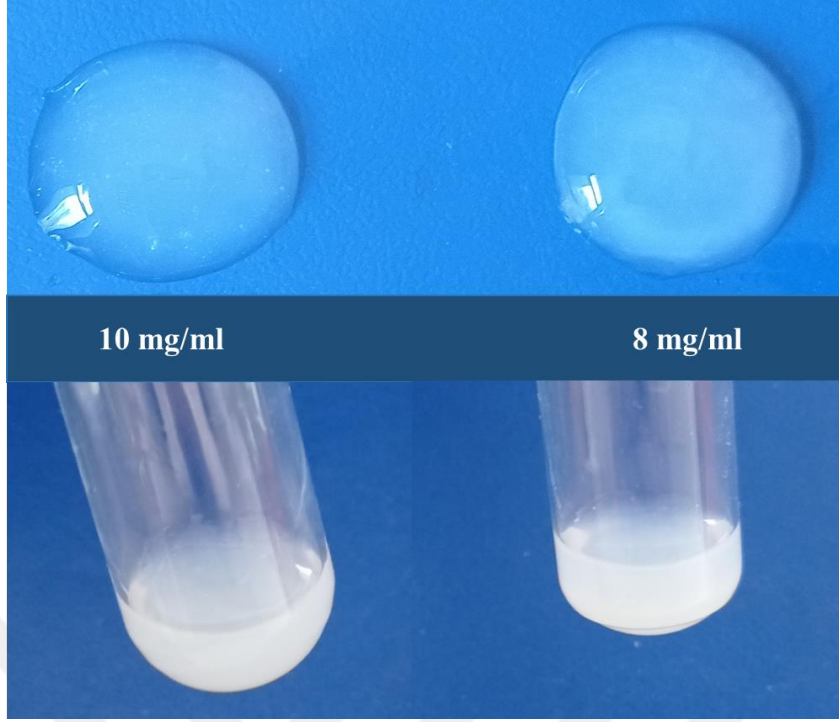
DNA analizinin ardında H&E boyaması yapılarak bu sonuçlar değerlendirilmiştir. H&E boyama sonucunda da hücrelerin dokudan etkili bir şekilde uzaklaştırılmadığı ve sCO₂ uygulanan dokunun yapısında değişiklik meydana geldiği görülmüştür. Doğal doku, ön işlem ve sCO₂ uygulamasına ilişkin H&E boyama sonuçları Şekil 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.18. sCO₂ ile deselülerizasyon sonrası H&E Boyama sonuçları

4.2. Deselülerize Dokudan Hidrojel Sentezi

Elde edilen deselülerize iskeleler, Freytes Metodu'na uygun olarak pepsin çözeltisi içerisinde hidroliz edilmiş ve nötralizasyon işlemi yapılmıştır [172]. İşlem sonucunda 8 ve 10 mg/ml konsantrasyona sahip jeller elde edilmiştir. Elde edilen pre-jeller 37°C'de bir saat bekletilerek jel haline getirilmiştir. 12 mM ASB-14, 72 saat deselülerizasyon koşuluna ait hidrojel görüntüleri Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.19. 12 mM ASB-14, 72sa deselülerizasyon koşuluna ait dokulardan elde edilen hidrojel görüntüleri

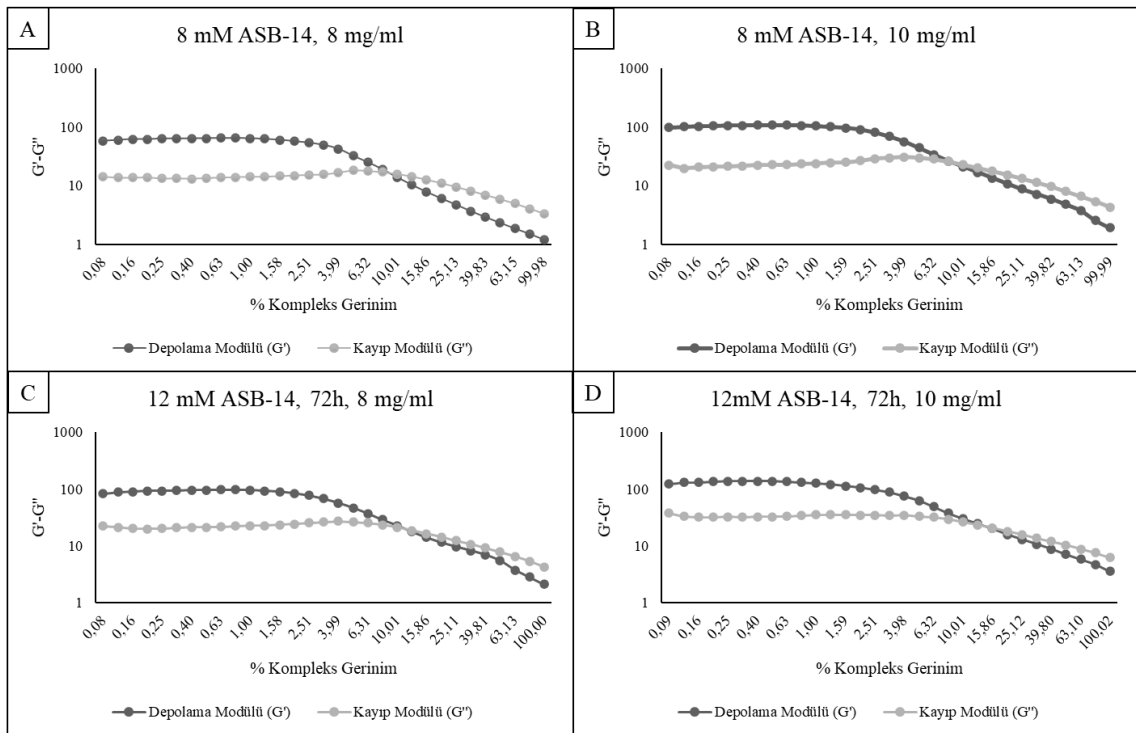
İnkübasyon sonrası elde edilen deselülerize hidrojin yarı-katı bir formda olduğu ve jelleşmenin etkili bir şekilde gerçekleştiği gözlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda, genel olarak hidrojel stok konsantrasyonu 10 mg/ml olarak kullanılmaktadır [165, 172]. Ancak 15 veya 20 mg/ml konsantrasyonlar ile yapılan çalışmalar da literatürde yer almaktadır. 2017 yılında Wu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada deselülerize akciğer dokusundan hidrojel sentezi yapılmıştır. Başlangıç konsantrasyonu 15 mg/ml olacak şekilde deselülerize akciğer pepsin çözeltisi içerisinde çözdürülerek, 2, 3, 4 ve 5 mg/ml konsantrasyonlara sahip olacak şekilde hidrojeller hazırlanmıştır. Massensini ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, idrar kesesi deselülerizasyonu sonrasında sentezlenen ESM hidrojel sentezinde 4 ve 8 mg/ml konsantrasyona sahip jellerin ideal özellikler gösterdiği görülmüştür. Yine aynı çalışmada, ekstraselüler hidrojellerde jelleşmesinin gerçekleşebilmesi için jel konsantrasyonunun 3 mg/ml'den büyük olması gerektiğini bildirilmiştir [204].

4.3. Hidrojel Karakterizasyonu

Elde edilen hidrojellerin karakterizasyonu için reolojik analiz, turbidimetrik ölçüm ve SEM görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. Reolojik Analiz

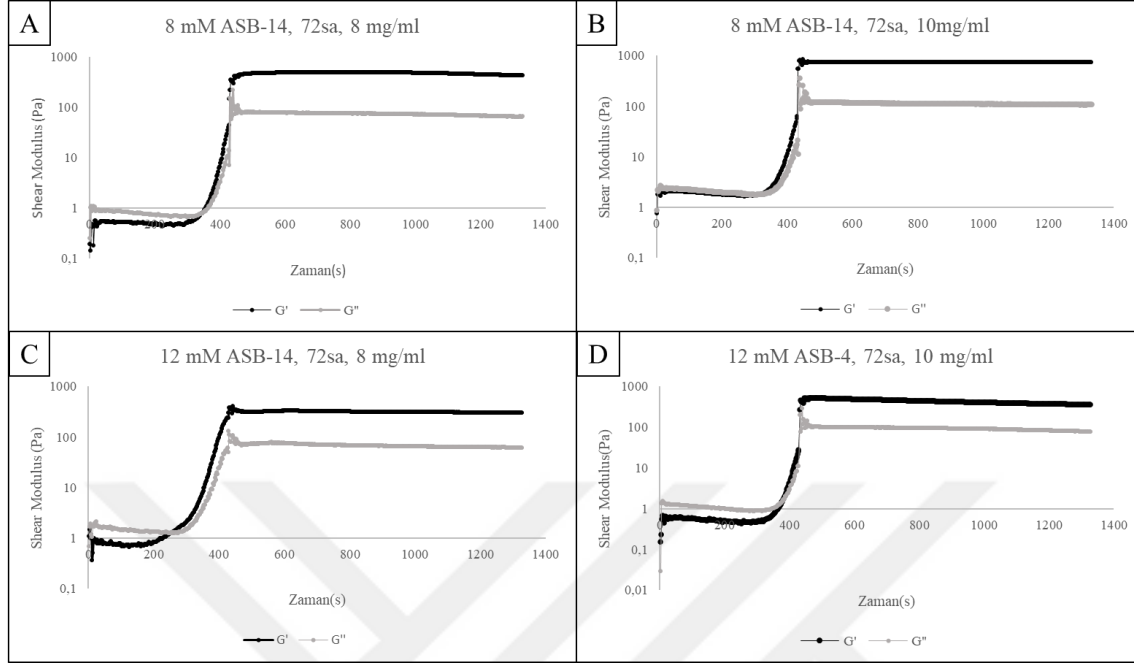
8 ve 12 mM ASB-14 deterjanının, 72 saat uygulanması sonucu elde edilen deselülerize akciğer dokularından elde edilen hidrojelilerin karakterizasyonu için reolojik ölçüm yöntemi uygulanmıştır. Hidrojellerin reolojik özelliklerinin belirlenmesi için her bir örnek üzerinde gerinim, sıcaklık ve salınım taraması yapılmıştır. Öncelikle gerinim taraması yapılarak optimum gerinim değeri belirlenmiştir. Gerinim taraması için reometre cihazının plakasına daha önceden jel haline getirilmiş malzemeler yerleştirilmiştir, sabit sıcaklık (37°C) ve frekansta (0,1592 Hz (1 rad/sn)) gerinim taraması yapılmıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Deselülerize akciğer hidrojellerine ait gerinim taraması sonuçları (A) 8 mM ASB-14, 72 sa, 8 mg/ml, (B) 8 mM ASB-14, 72 sa, 10 mg/ml, (C) 12 mM ASB-14, 72 sa, 8 mg/ml, (D) 12 mM ASB-14, 72 sa, 10 mg/ml

Yapılan gerinim taraması sonucunda, ölçümlerde %1 gerinim değerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu ölçümlerin ardından yapılan sıcaklık taramasında frekans ve gerinim değeri sabit tutularak hidrojelilerin depolama (G') ve kayıp (G'') modülündeki değişiklikler ölçülmüştür. İlk olarak sıcaklık 10°C'den 37°C'ye çıkarılırken G' ve G'' değerlerinin değişimi incelenmiştir, daha sonra sıcaklık sabit tutularak G' ve G'' değerlerinin zamana karşı değişimi incelenmiştir. Sıcaklık ve salınım taramasına ilişkin

depolama (G') ve kayıp modulus (G'') değerlerini gösteren grafikler Şekil 4.21'de gösterilmiştir.

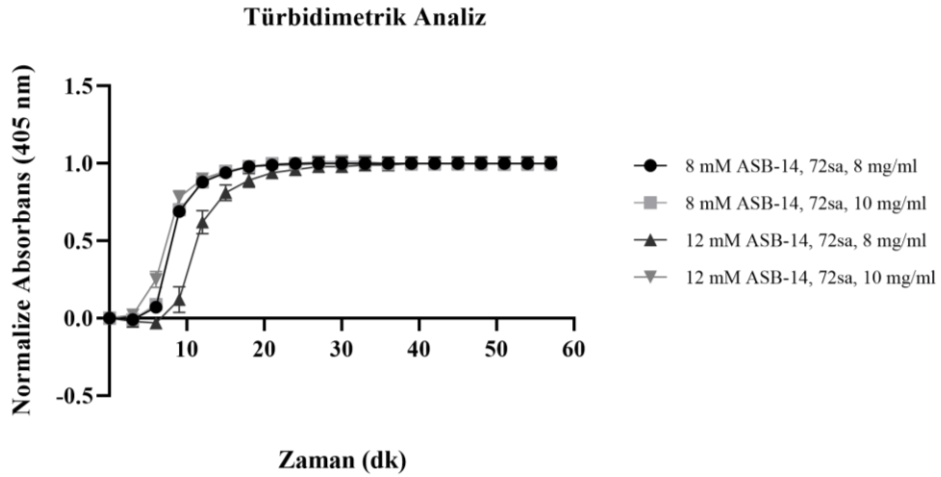


Şekil 4.21. Deselülerize hidrojellere ilişkin reometre sonuçları (A) 8 mM ASB-14, 72 sa, 8 mg/ml, (B) 8 mM ASB-14, 72 sa, 10 mg/ml, (C) 12 mM ASB-14, 72 sa, 8 mg/ml, (D) 12 mM ASB-14, 72 sa, 10 mg/ml

Sıcaklık 10°C'den 37°C'ye çıkarken G' ve G'' değerlerinin arttığı görülmüştür. Jelleşme gerçekleşikten sonra ise depolama modülünün kayıp modülünden daha yüksek bir değerde olduğu ve bu farkın korunduğu görülmektedir. Deselülerize koyun akciğerinden elde edilen hidrojellerin depolama modülü ve kayıp modülü arasında yaklaşık olarak dört kat bir fark bulunmaktadır. Bu değerler literatürde yapılan deselülerize hidrojeller ile uyumlu çıkmıştır. Pouliot ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yapılan bir çalışmada, deselülerize akciğerden elde edilen 8 ve 6 mg/ml konsantrasyonundaki hidrojellerin depolama ve kayıp modülleri arasında yaklaşık dört kat olduğu gösterilmiştir [164].

4.3.2. Türbidimetrik Analiz Sonuçları

Elde edilen jellerin jelleşme kinetiği türbidimetrik ölçüm ile değerlendirilmiştir. Ölçüm sonucunda elde edilen grafik Şekil 4.22'de gösterilmiştir. Tüm eğriler sigmodal bir dağılım göstermiştir.



Şekil 4.22. Hücreleştirilmiş ESM Hidrojellerine ilişkin türbidimetrik ölçüm sonuçları, ASB-4 deterjanına ilişkin türbidimetrik ölçüm değerleri Çizelge 4.2’de yer almaktadır.

Çizelge 4.2. Deselülerize akciğer hidrojelinin türbidimetrik ölçüm sonuçları

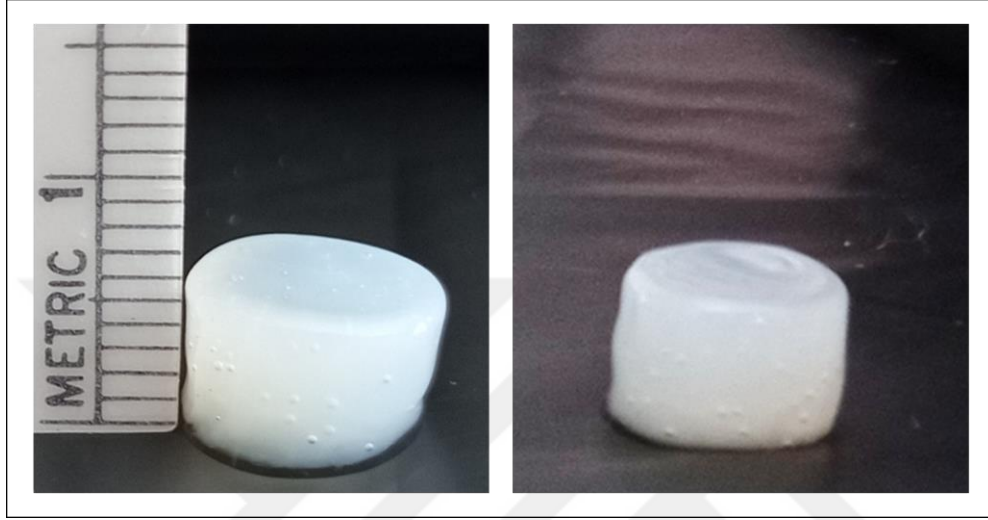
Örnek	t_{lag}	$t_{1/2}$	t_{95}	S
8 mM ASB-14, 72h, 8 mg/ml	6	8,08	15,75	0,1341
8 mM ASB-14, 72h, 10 mg/ml	6	8,01	15	0,1316
12 mM ASB-14, 72h, 8 mg/ml	8,64	11,28	21,75	0,1157
12 mM ASB-14, 72h, 10 mg/ml	3	7,41	15	0,1259

8 mM ASB-14, 72 koşuluna ait 8 ve 10 mg/ml hidrojellerinin t_{lag} , t_{50} , t_{95} ve S değerleri birbirlerine benzer çıkmıştır. 12 mM ASB-14, 72sa, 8 mg/ml konsantrasyona sahip örneğin t_{lag} , t_{50} ve t_{95} değerlerine ulaşması için gereken süre diğer örneklere göre daha uzundur. Örneklerin türbidimetrik ölçüm değerleri literatürde yapılan deselülerize akciğer örnekleriyle uyumludur. 2020 yılında Pouliot ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, deselülerize akciğerlerden elde edilen dokulardan hidrojel sentezlemek için uygulanan pepsin ile parçalama işlem süresinin hidrojel karakterizasyonu üzerine olan etkisi incelenmiştir. Yaklaşık 8 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan hidrojellerde daha kısa süreyle pepsinde tutulan hidrojellerin daha hızlı jelleşme gösterdiği gözlemlenmesine karşılık 48 saat uygulanan işlem sonucunda jelleşme hızı (S) yaklaşık olarak 0,12; $t_{1/2}$ değeri 12 dakika; t_{95} değeri 16 dakika ve t_{lag} değeri ise 8 dakika olarak belirtilmiştir [165]. Jelleşme kinetiğine ilişkin tez çalışmasında elde edilen sonuçların literatürde yer alan sonuçlar ile uyumlu çıktığı görülmüştür. Ayrıca deselülerizasyon

yöntemi, hidrojel sentez yöntemi ve pepsinle parçalama süresi gibi birçok etmen hidrojel mekaniği ve karakterizasyonu üzerinde etkili olmaktadır [165].

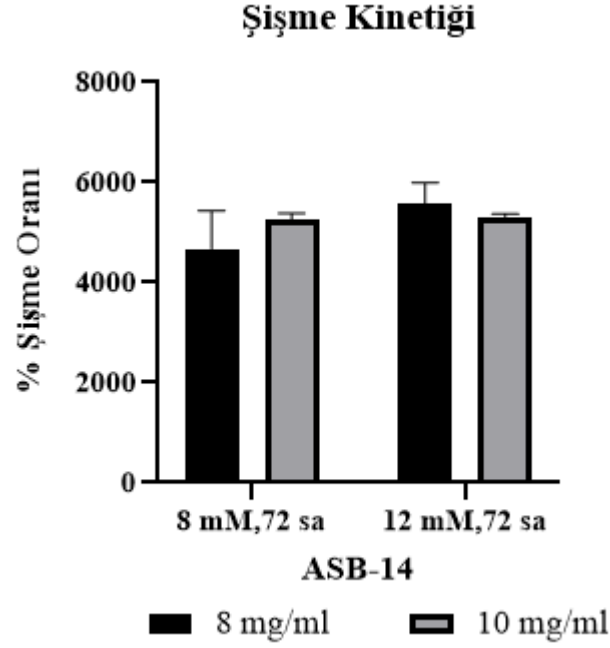
4.3.3. Hidrojellerin Şişme Kinetiği

Elde edilen hidrojellerin şişme kinetiği için öncelikle 48-kuyucuklu plaka içesine 500 µl konulan pre-jel çözeltisi 37°C’de inkübe edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Şişme kinetiği için 48-kuyucuklu plaka içerisinde hazırlanan deselülerize akciğer hidrojelleri

48-kuyucuklu plaka içerisinde hazırlanan hidrojeller dikkatli bir şekilde plakadan çıkarılarak 1X PBS içerisinde 24 saat inkübe edildikten sonra ağırlıkları ölçülmüştür. Ağırlıkları ölçülen hidrojeller kurutulmasının ardından kuru ağırlıkları ölçülmüş ve şişme kinetiğine ilişkin veriler hesaplanmıştır. 8 mM ASB-14, 72 saat, 8 ve 10 mg/ml ile 12 mM ASB-14, 72 saat, 8 ve 10 mg/ml konsantrasyonlarında hazırlanan hidrojellerin şişme oranları sırasıyla $4676,43 \pm 535,26$, $5272,29 \pm 79,43$, $5577,50 \pm 297,11$ ve $5316,70 \pm 35,68$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.24).

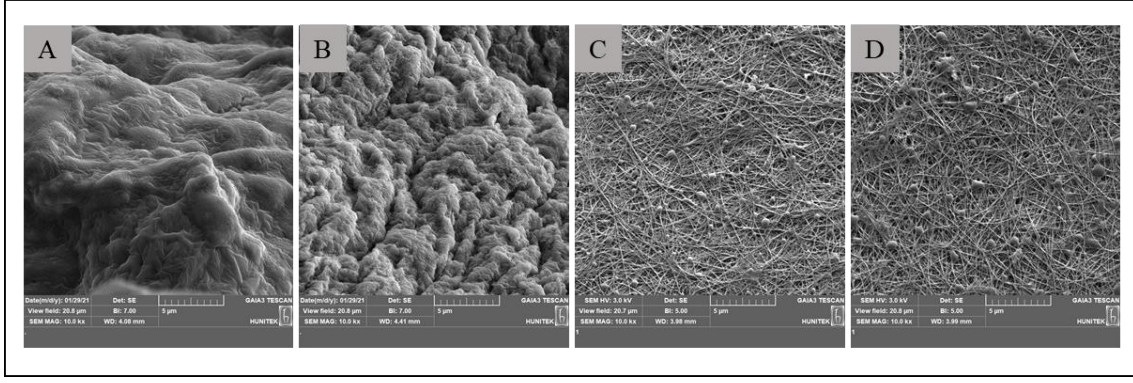


Şekil 4.24. Deselülerize akciğer hidrojellerinin şişme kinetiğine ait sonuçlar

Şişme analizi sonucunda tüm koşullarda hidrojel kütlesi kuru ağırlığına kıyasla 50 kattan fazla bir artış göstermiştir. Deselülerize akciğer dokusundan elde edilen hidrojellerin şişme kinetiğine ilişkin sonuçlarda deselülerizasyon koşulu ve hidrojel konsantrasyonuna bağlı anlamlı bir farklılık olmadığı, tüm koşullardaki şişme kinetiğinin birbirine yakın çıktığı görülmüştür. Ayrıca bu değerlerin literatürde yer alan diğer ESM hidrojel çalışmaları ile de uyumlu olduğu görülmüştür. Mulvany ve arkadaşları tarafından 2021 yılında yapılan çalışmada, deselülerize kalp dokularından elde edilen hidrojellerin şişme oranı yaklaşık %7000 olarak hesaplanmıştır [205].

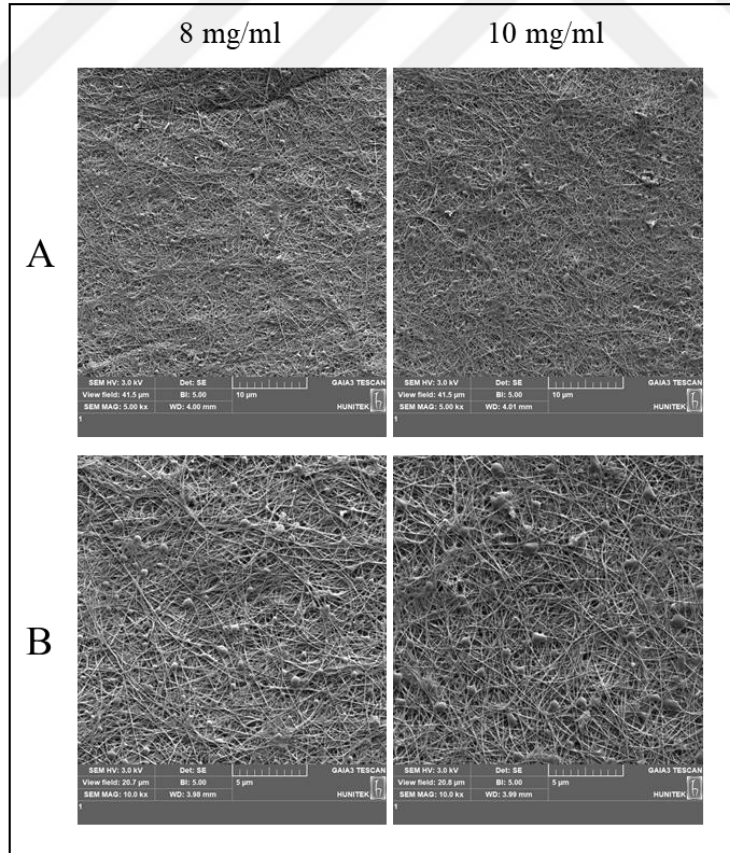
4.3.4. SEM Görüntüleme

Deselülerize edilen dokulardan sentezlenen hidrojellerin yüzey özellikleri SEM’de incelenmiştir. SEM analizi sonucunda doğal doku, hücresizleştirilmiş akciğer dokusu (12 mM ASB-14, 72sa) ve hücresizleştirilmiş akciğer dokusundan elde edilen hidrojellere ilişkin SEM görüntüleri Şekil 4.25’te gösterilmiştir.



Şekil 4.25. Koyun akciğeri SEM görüntüleri (A) Doğal doku, (B) Hücresizleştirilmiş doku iskelesi, (C) 8 mg/ml deselülerize hidrojel (D) 10 mg/ml deselülerize hidrojel, ölçek boyutu: 5 µm, yakınlaştırma: 10.000X.

Hücresizleştirilmiş akciğer hidrojellerinin ısıyla inkübasyonu sonucunda kolajenlerin çapraz bağlanma yaptığı görülmektedir. Elde edilen görüntüler literatürdeki akciğer ve diğer dokulardan elde edilen deselülerize hidrojel yapılarıyla karşılaştırılabilir formdadır [165, 172]. Hücresizleştirilmiş hidrojellerin yüzey özelliklerine ait 500X ve 10000X büyütme değerlerindeki SEM görüntüleri Şekil 4.26’da verilmiştir.

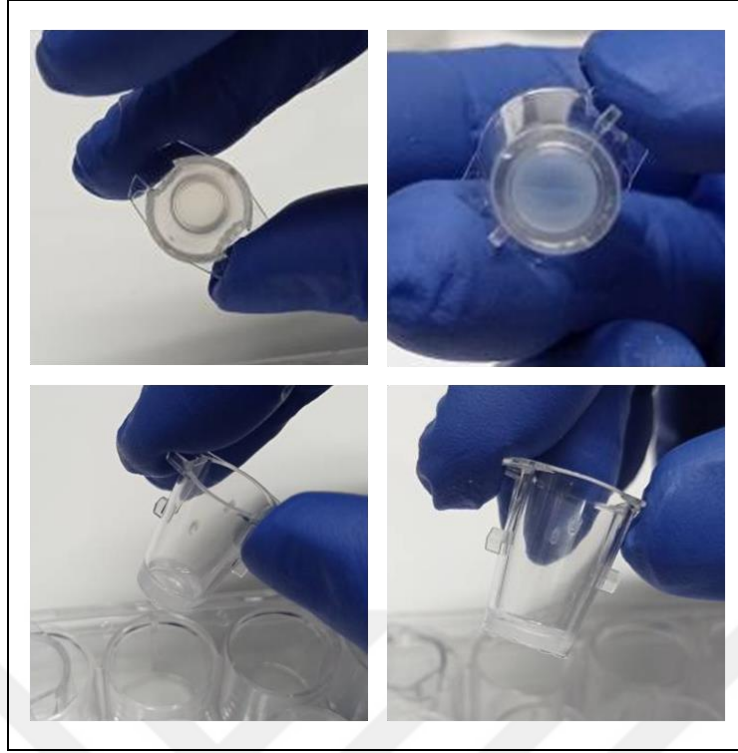


Şekil 4.26. 12 mM ASB-14, 72sa koşuluna ait hücresizleştirilmiş dokudan elde edilen 8 ve 10 mg/ml hidrojellerin SEM görüntüsü (A) 5000X, (B) 10000X

Örneklerin SEM için hazırlanması aşamasında kurutma işleminin elde edilen sonuçlar üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Hidrojellerin kurutulması için dondurarak kurutma, kritik nokta kurutucu ve HMDS uygulaması gibi çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Literatürde SEM görüntüleme için hazırlanan hidrojellerin kurutulmasında yaygın olarak Kritik Nokta Kurutucu cihazı kullanılmasına rağmen, HMDS'nin kritik nokta kurutucu cihazı için iyi bir alternatif olduğu belirtilmiştir [206]. Bu nedenle tez çalışmasında deselülerize hidrojellerin kurutulmasında HMDS kullanılmıştır.

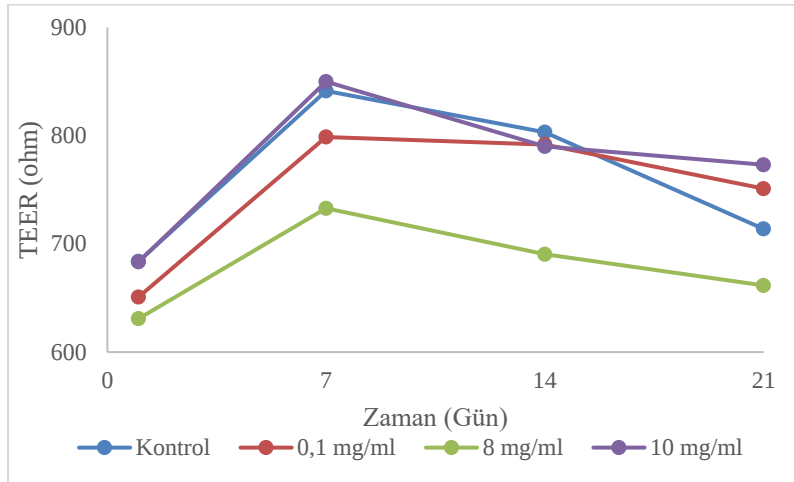
4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültür çalışmaları için öncelikli olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan jel çözeltileriyle iki farklı şekilde hücre kültür plakaları hazırlanmıştır. Bunun için öncelikli olarak transwell membranı ve 96-kuyucuklu plakalar için yüzey kaplaması işlemi gerçekleştirilmiştir. Transwell membran yüzeyinin kaplanması için literatürden yola çıkılarak 0,1 mg/ml konsantrasyonu seçilmiştir. Young ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan bir çalışmada, transwell insert membranı 0,1 mg/ml deselülerize akciğer hidrojel ile kaplanarak fare alveolar epitel hücresi ekilerek TEER ölçümü ve sıkı bağlantı proteinlerinin analizi yapılmıştır [166]. Ticari olarak satılan deselülerize hidrojel ürünlerinde de yüzey kaplaması için 0,1 mg/ml konsantrasyonu önerilmektedir [207]. Kuyucuk içerisine konulan jel çözeltisi miktarı 60 µl olarak optimize edilmiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda 0,33 cm² yüzey alanı için yaklaşık olarak 20-50 µl hacminde jel çözeltisi kullanılmaktadır [185, 207]. Yüzey kaplaması için 60 µl jel çözeltisi konulan plakalar protein absorpsiyonu için +4°C'de bekletilmiştir [166, 185]. Daha sonra transwell içerisindeki jel çözeltisi çekilerek 1X PBS ile yıkama yapılmış ve hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücre çalışmalarının ikinci kısmında transwell insert ve 96-kuyucuklu plaka yüzeyinde hazırlanan hidrojeller üzerine hücre ekimi işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için her bir kuyucuğa 60 µl jel çözeltisi eklenmiş ve jel oluşumu için plakalar 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hazırlanan hidrojeller üzerine hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası deselülerize hidrojeller ile hazırlanmış olan transwell insertler Şekil 4.27'de verilmiştir.



Şekil 4.27. Deselülerize hidrojeller ile hazırlanmış olan transwell insertler

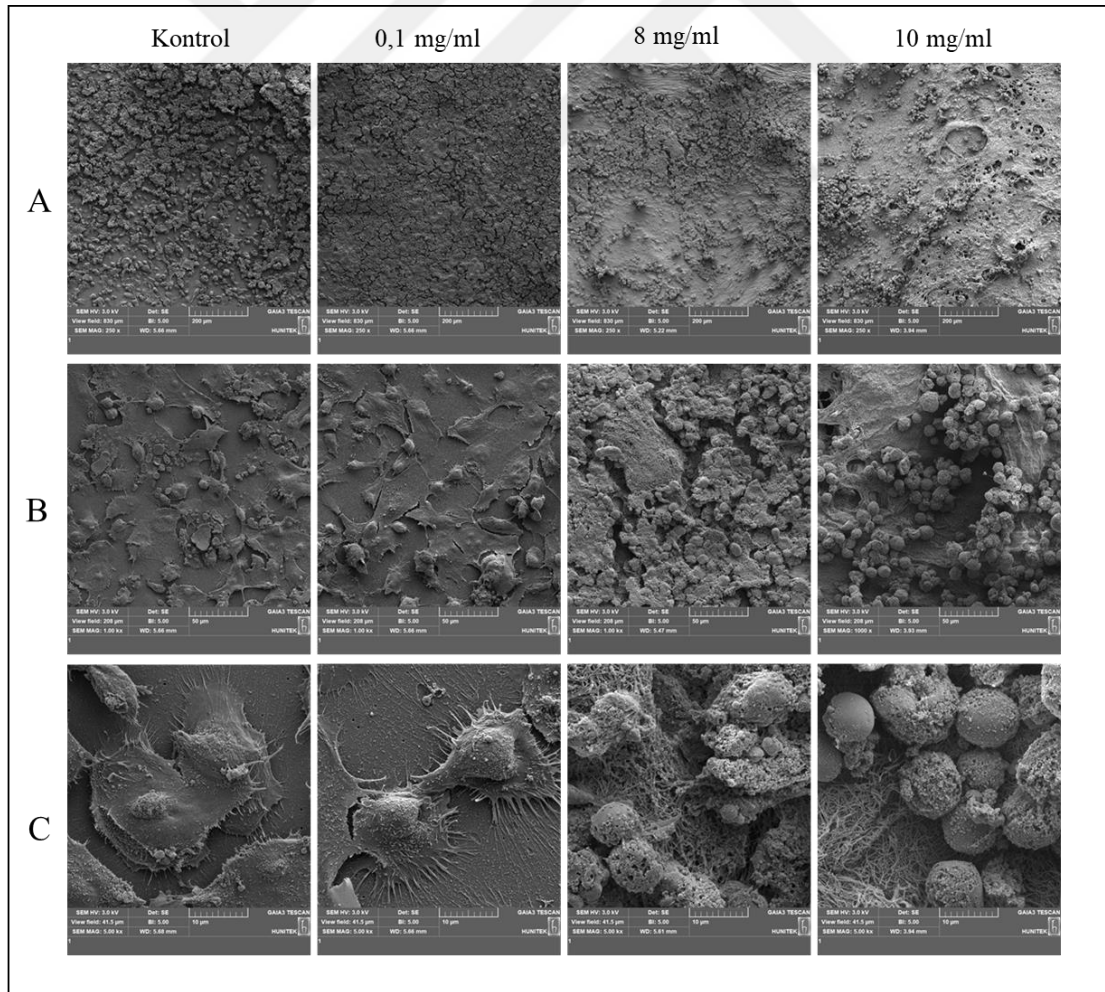
Transwell üzerine başlangıç konsantrasyonu $1,0 \times 10^5$ olacak şekilde BEAS-2B hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücreler membran yüzey alanını %100 kaplayacak seviyeye gelene kadar alttan ve üstten BEGM besiyeri ile beslenmiş, %100 kaplama gerçekleştikten sonra (4. gün) ise 21 günlük farklılaştırma işlemine alınmıştır. Farklılaştırma boyunca hücreler sadece alttan farklılaştırma besiyeri ile beslenmiş ve 1., 7., 14. ve 21. günlerde TEER ölçümü yapılmıştır. TEER ölçümüne ait sonuçlar Şekil 4.28’de verilmiştir.



Şekil 4.28. Deselülerize hidrojel üzerinde farklılaştırmaya alınan BEAS-2B hücrelerine ait TEER sonuçları, n=3

TEER değerleri ilk yedi gün boyunca tüm koşullarda artarken on dördüncü günden itibaren azalış göstermiştir. Kontrol, 0,1 mg/ml ve 10 mg/ml jel koşulları on dördüncü günde yakın TEER değerlerine sahip olmasına rağmen, on dördüncü günden itibaren 0,1 mg/ml ve 10 mg/ml koşullarına ait kuyucuklardaki TEER değerlerinin kontrole göre daha yüksek çıktığı gözlenmiştir. 2021 yılında Dabaghi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada deselülerize hidrojeller (1, 2 ve 4 mg/ml) ile kaplanan transweller üzerine ekilen primer insan bronşiyal epitel hücrelerinde (HBEC), deselülerize ESM'nin hücre bariyer direndicini kontrole göre iyileştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca 1 mg/ml konsantrasyonla kaplanan transwellerde TEER değerlerinin 10. güne kadar artış gösterdiği ve 10. günden itibaren ise azaldığı bildirilmiştir [208].

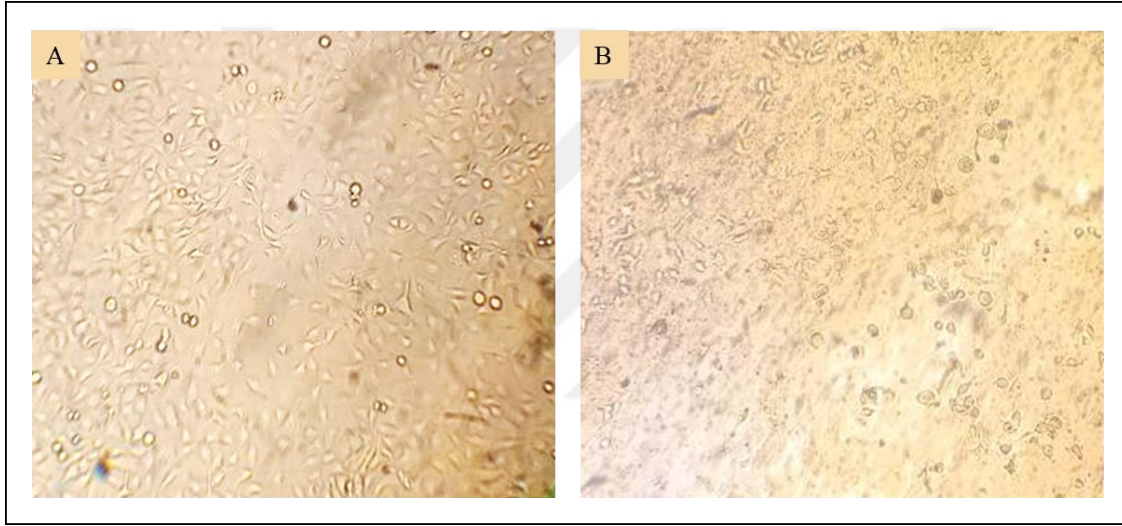
Tranwell insert üzerinde farklılaştırılan hücreler fiks edilerek SEM görüntüleme yapılmıştır. 12 mM ASB-14, 72 saatlik uygulama sonucunda elde edilen deselülerize dokudan elde edilen hidrojel ve normal transwell membranı üzerinde çoğaltılan ve farklılaştırılan BEAS-2B hücrelerine ilişkin görseller Şekil 4.29'da verilmiştir.



Şekil 4.29. BEAS-2B hücrelerine ait SEM görüntüleri (A) 250X, (B)1000X, (C) 5000X

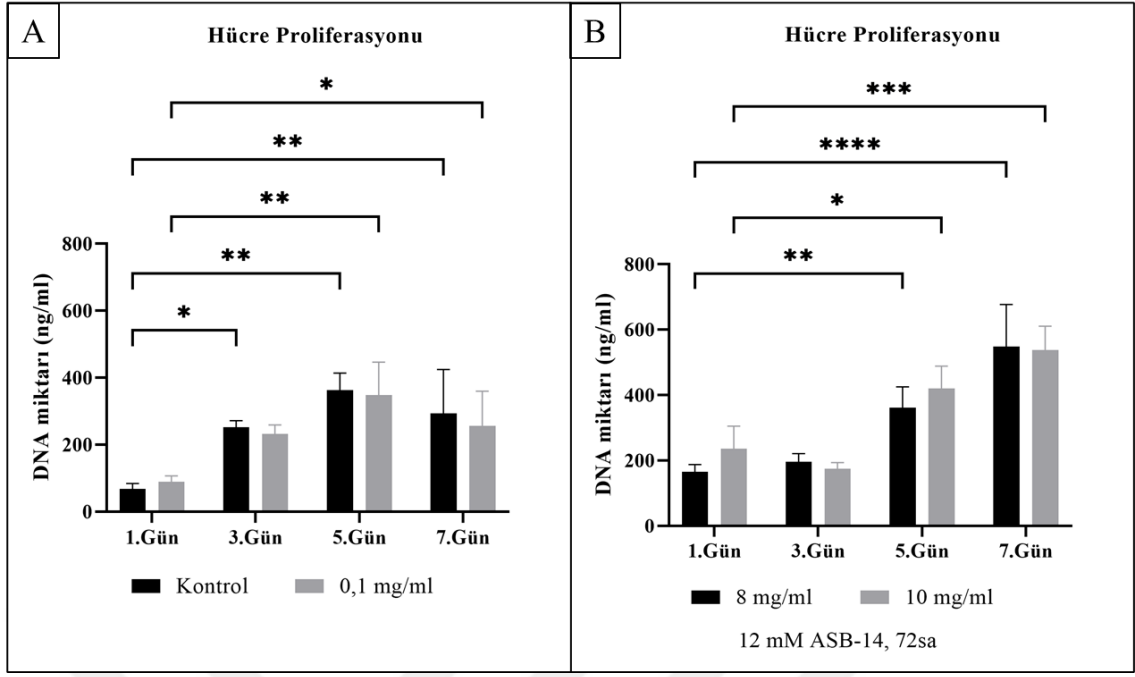
Kontrol ve 0,1 mg/ml koşullarında hücrelerin membran yüzeyini yüksek oranda kapladığı ve hücre hücre bağlantılarının olduğu gözlemlenmiştir. 8 ve 10 mg/ml hidrojel yüzeyinde ise hücrelerin yüksek oranda tutunduğu görülmektedir. Elde edilen hidrojellerin hücre tutunması için elverişli bir yüzey oluşturduğu düşünülmektedir.

BEAS-2B hücrelerinin deselülerize hidrojeller üzerindeki proliferasyonunu göstermek için 96-kuyucuklu plakalarda hazırlanan jeller üzerine başlangıç konsantrasyonu $1,0 \times 10^4$ olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve ESM hidrojeller üzerinde çoğalan BEAS-2B hücrelerine ait görseller Şekil 4.30'da verilmiştir. BEAS-2B hücrelerinin tutunma ve çoğalmasının hücrelerin karakteristik özelliklerine uygun olarak gerçekleştiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.30. BEAS-2B hücreleri (A) Kontrol, (B) 8 mg/ml hidrojel

Hidrojeller üzerinde çoğaltılan hücrelerin 1, 3, 5 ve 7. günlerdeki DNA miktarı ölçülmüştür. 96-kuyucuklu plakalar üzerinde çoğaltılan BEAS-2B hücrelerine ilişkin proliferasyon sonuçları Şekil 4.31'de gösterilmiştir.



Şekil 4.31. BEAS-2B hücrelerinin proliferasyonu (A) Kontrol ve 0,1 mg/ml jel konsantrasyonu ile yüzeyi kaplanan plakalar üzerine ekilen hücrelere ilişkin proliferasyon sonucu, (B) 8 ve 10 mg/ml konsantrasyonuna sahip hidrojel üzerine ekilen hücrelere ilişkin proliferasyon sonucu, n=3, p:0,1234 (ns), 0,0332 (*), 0,0021 (**), 0,0002 (***), <0,0001 (****)

Kontrol ve 0,1 mg/ml jel konsantrasyonu ile yüzeyi kaplanan plakalarda 5. güne kadar hücre sayısında linear bir artış olduğu; 7. günde ise hücre sayısında yaklaşık %22'lik azalma olduğu görülmüştür. Hidrojel üzerine ekilen BEAS-2B hücrelerinin proliferasyonu 7. güne kadar linear bir artış göstererek devam etmiştir. Bu durum sentezlenen deselülerize hidrojellerin hücrelerin tutunması ve çoğalması için elverişli bir yüzey alanı olduğunu göstermektedir.

5. YORUM

Tez çalışması kapsamında kimyasal deselülerizasyonda sıklıkla kullanılan SDS, Triton X-100, CHAPS gibi yaygın kullanılan deterjanların yanı sıra Sodyum kolat hidrat, NP-40 ve ASB-14 gibi akciğer deselülerizasyonunda kullanılmayan deterjanların farklı konsantrasyonları kullanılarak koyun akciğerinden doku kesitleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Deterjanlar belirlenen konsantrasyonlarda 48 ve 72 saat süreyle akciğer dokusu üzerine uygulanmıştır. Ayrıca koyun akciğer doku kesitleri sCO₂ ile deselülerize edilerek kimyasal yöntemle elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Elde edilen iskelelerin karakterizasyonu DNA miktar analizi, histolojik boyamalar, ESM proteinleri miktar tayini (kolajen, sGAG ve elastin) uygulamalarıyla yapılmıştır. Elde edilen doku iskelelerinden ESM hidrojel sentezi gerçekleştirilmiş ve bu hidrojellerin etkinliği hücre kültürü çalışmalarıyla değerlendirilmiştir. Hidrojeller transwell insert yüzeyine konularak üzerine sağlıklı bronş epitel hücresi olan BEAS-2B hücreleri ekilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir:

- Kimyasal deselülerizasyon işlemi sonunda CHAPS dışında bütün deterjan koşullarında DNA miktarında %80'in üzerinde bir düşüş yaşanmıştır. 0,5 SDS ve Triton X-100 deterjanlarının 72 saat uygulamasının literatürle uyumlu olarak deselülerizasyon işleminde etkili olduğu görülmüştür. Akciğer deselülerizasyonunda kullanılmamış iyonik bir deterjan olan Sodyum kolat hidrat ve zwitteriyonik bir deterjan olan ASB-14'ün DNA'yı %90'ın üzerinde uzaklaştırdığı görülmüştür.
- Fiziksel yöntemle yapılan deselülerizasyon sonucunda DNA'nın %43'e yakın bir oranı uzaklaştırılmıştır. Bu oran kimyasal yöntemle elde edilen sonuçlara göre daha düşüktür. Bu nedenle, bu çalışma dahilinde kimyasal yöntemin fiziksel yöntemle göre daha başarılı olduğu kabul edilmiştir. Deselülerizasyon işlemi sırasında hücresel materyalin dokudan uzaklaştırılması öncelikli bir parametre olduğu için fiziksel işlem uygulanan dokularda diğer karakterizasyonlara devam edilmemiştir.

- H&E boyama sonucunda ASB-14 deterjanının çekirdekleri hem parankim hem de bronşiyal kısımdan diğer deterjanlara göre daha etkili bir şekilde uzaklaştırdığı görülmüştür.
- DNA miktarının %90'ın üzerinde azaltılmış olduğu koşullara ait dokularda yapılan hidrokspirolin miktarı doğal dokuya kıyasla daha yüksek çıkmıştır.
- sGAG analizi CHAPS deterjanı dışında tüm deterjanlarda yapılmış olup, doğal dokuya kıyasla tüm dokularda yüksek oranda korunduğu görülmüş ve anlamlı bir fark bulunamamıştır.
- ASB-14 deterjanının DNA ve H&E boyama sonuçlarında diğer deterjanlara göre daha etkili bir sonuca sahip olması nedeniyle, diğer karakterizasyon yöntemlerinde ilk olarak ASB-14 deterjanın etkisi incelenmiştir.
- Direkt deselülerize doku üzerinde gerçekleştirilen hücre çalışmalarından anlamlı sonuç elde edilememiştir. Bu durumun dokunun transwell üzerine uygun bir şekilde yerleştirilememesi ve her kuyucukta eşit bir standart yakalanamaması sebebiyle olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle hücre çalışmalarına bu deselülerize dokulardan elde edilen hidrojel ile devam edilmesine karar verilmiştir.
- 12 mM ASB-14, 72 saat koşuluna uygun olarak gerçekleştirilen deselülerizasyon sonucu elde edilen dokulardan hidrojel sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu hidrojin bir kısmı transwell insertler üzerine kaplanarak bir kısmı ise transwell membranı üzerinde jelleştirilerek üzerine BEAS-2B hücreleri ekilmiştir. Farklılaşmanın 14. gününde hücreler fikse edilerek SEM görüntüleme yapılmıştır. SEM sonucunda hücrelerin hidrojel üzerine tutunduğu gösterilmiştir. Ayrıca transwell üzerine ekilen hücrelerden TEER ölçümü yapılmıştır, ilk yedi gün boyunca TEER değerinde artış gözlemlenmiştir.
- Hücre kültürü çalışmaları boyunca hücre proliferasyonunu gösterilmesi için 1., 3., 5. ve 7. günlerdeki DNA miktarı ölçülmüştür. Bu ölçüm sonunda BEAS-2B hücrelerinin hidrojel üzerinde tutunduğu ve çoğalmaya devam ettiği gösterilmiştir.
- Çalışmada elde edilen sonuçlara göre koyun akciğeri deselülerizasyonunda kullanılan deterjanlar içerisinde ASB-14'ün etkili olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] H.H. Aung, A. Sivakumar, S.K. Gholami, S.P. Venkateswaran, B. Gorain, Shadab, An Overview of the Anatomy and Physiology of the Lung, Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer**2019**, pp. 1-20.
- [2] W.H. Finlay, Introduction to the respiratory tract, The Mechanics of Inhaled Pharmaceutical Aerosols**2019**, pp. 103-116.
- [3] M.H. Ross, W. Pawlina, Histology: A Text and Atlas, With Correlated Cell and Molecular Biology, Lippincott Williams & Wilkins**2016**, pp. 662-697.
- [4] R.L. Kradin, Anatomy of the Lung, Understanding Pulmonary Pathology**2017**, pp. 5-19.
- [5] B.H. Derrickson, G.J. Tortora, Respiratory System, Principles of Anatomy and Physiology, Wiley**2017**, pp. 850-898.
- [6] C. Naeem, M. Mozafari, F. Sefat, Scaffolds for lung tissue engineering, Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume Two**2019**, pp. 427-448.
- [7] Lungs, <https://www.therespiratorysystem.com/lungs/>, (Erişim Tarihi: 3 Nisan 2020)
- [8] K. Ahookhosh, O. Pourmehran, H. Aminfar, M. Mohammadpourfard, M.M. Sarafraz, H. Hamishehkar, Eur J Pharm Sci, 145 (**2020**) 105233.
- [9] C.A. D'Angelis, J.J. Coalson, R.M. Ryan, Structure of the Respiratory System, Pediatric Critical Care**2011**, pp. 490-498.
- [10] S. Hafeji, M. Mozafari, F. Sefat, Scaffolds for tissue engineering of the bronchi, Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume Two**2019**, pp. 393-410.
- [11] K. Berube, Z. Prytherch, C. Job, T. Hughes, Toxicology, 278 (**2010**) 311-318.
- [12] B.M. Koeppen, B.A. Stanton, Berne and levy physiology e-book, Elsevier Health Sciences **2017**.
- [13] B.M. Carlson, The Respiratory System, The Human Body**2019**, pp. 303-319.
- [14] J. Krzanowski, Structure and Function of the Lungs and the Airways☆, Reference Module in Biomedical Sciences**2014**.
- [15] K.O. Leslie, M.R. Wick, Lung Anatomy, Practical Pulmonary Pathology: A Diagnostic Approach**2018**, pp. 1-14.e12.

- [16] J.P. Ward, J. Ward, R.M. Leach, The respiratory system at a glance, John Wiley & Sons **2010**.
- [17] J.M. Thompson, **(1997)**.
- [18] C. Frantz, K.M. Stewart, V.M. Weaver, Journal of cell science, 123 **(2010)** 4195-4200.
- [19] Y. Zhou, J.C. Horowitz, A. Naba, N. Ambalavanan, K. Atabai, J. Balestrini, P.B. Bitterman, R.A. Corley, B.-S. Ding, A.J. Engler, Matrix Biology, 73 **(2018)** 77-104.
- [20] P. Pelosi, P.R. Rocco, D. Negrini, A. Passi, An Acad Bras Cienc, 79 **(2007)** 285-297.
- [21] T. Rozario, D.W. DeSimone, Dev Biol, 341 **(2010)** 126-140.
- [22] B. Yue, J Glaucoma, 23 **(2014)** S20-23.
- [23] İ. Üçgül, S. Aras, U. Elibüyük, Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering, 23 **(2018)** 295-310.
- [24] M. Derya, I. Yılmaz, M. Aytekin, Biol Med, 6 **(2014)** 2.
- [25] S. Yi, F. Ding, L. Gong, X. Gu, Current stem cell research & therapy, 12 **(2017)** 233-246.
- [26] B.H. Gu, M.C. Madison, D. Corry, F. Kheradmand, Matrix Biol, 73 **(2018)** 52-63.
- [27] M. Godfrey, Extracellular Matrix, in: P.J. Barnes, J.M. Drazen, S.I. Rennard, N.C. Thomson (Eds.) Asthma and COPD: Basic Mechanisms and Clinical Management **2009**, pp. 265-273.
- [28] R.P. Mecham, Matrix Biol, 73 **(2018)** 6-20.
- [29] J.T. Ito, J.D. Lourenco, R.F. Righetti, I. Tiberio, C.M. Prado, F. Lopes, Cells, 8 **(2019)**.
- [30] S.A. Matthes, R. Hadley, J. Roman, E.S. White, Comparative Biology of the Normal Lung Extracellular Matrix, Comparative Biology of the Normal Lung **2015**, pp. 387-402.
- [31] B. Suki, S. Ito, D. Stamenovic, K.R. Lutchen, E.P. Ingenito, J Appl Physiol (1985), 98 **(2005)** 1892-1899.
- [32] E. Papakonstantinou, G. Karakiulakis, Br J Pharmacol, 157 **(2009)** 1111-1127.
- [33] T. Hussell, S. Lui, C. Jagger, D. Morgan, O. Brand, Eur Respir Rev, 27 **(2018)**.

- [34] W.H. Watson, J.D. Ritzenthaler, J. Roman, *Redox Biol*, 8 **(2016)** 305-315.
- [35] J.L. Balestrini, L.E. Niklason, *Ann Biomed Eng*, 43 **(2015)** 568-576.
- [36] O. Rosmark, E. Åhrman, C. Müller, L.E. Rendin, L. Eriksson, A. Malmström, O. Hallgren, A.-K. Larsson-Callerfelt, G. Westergren-Thorsson, J. Malmström, *Scientific reports*, 8 **(2018)** 1-13.
- [37] A.P. Nesterova, E.A. Klimov, M. Zharkova, S. Sozin, V. Sobolev, N.V. Ivanikova, M. Shkrob, A. Yuryev, *Diseases of the respiratory system, Disease Pathways***2020**, pp. 391-442.
- [38] Fact Sheet – World Lung Day 2019,
https://www.firsnet.org/images/WLD/World_Lung_Day_2019_Fact_Sheet.pdf,
(Erişim Tarihi: April 2 2020)
- [39] D. Singh, A. Agusti, A. Anzueto, P.J. Barnes, J. Bourbeau, B.R. Celli, G.J. Criner, P. Frith, D.M.G. Halpin, M. Han, M.V. Lopez Varela, F. Martinez, M. Montes de Oca, A. Papi, I.D. Pavord, N. Roche, D.D. Sin, R. Stockley, J. Vestbo, J.A. Wedzicha, C. Vogelmeier, *Eur Respir J*, 53 **(2019)**.
- [40] P.J. Barnes, J.M. Drazen, S.I. Rennard, N.C. Thomson, *Asthma and COPD: basic mechanisms and clinical management*, Elsevier **2009**.
- [41] J.K. Burgess, T. Mauad, G. Tjin, J.C. Karlsson, G. Westergren-Thorsson, *J Pathol*, 240 **(2016)** 397-409.
- [42] G. Burgstaller, B. Oehrle, M. Gerckens, E.S. White, H.B. Schiller, O. Eickelberg, *European Respiratory Journal*, 50 **(2017)** 1601805.
- [43] N.W. Todd, I.G. Luzina, S.P. Atamas, *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5 **(2012)** 11.
- [44] National Organization for Rare Disorders Database (NORD),
<https://rarediseases.org>, (Erişim Tarihi: 24 April 2020)
- [45] N.L. Turcios, *Respir Care*, 65 **(2020)** 233-251.
- [46] C. Johnson, C. Haworth, *Medicine*, **(2020)**.
- [47] B. Gooptu, U.I. Ekeowa, D.A. Lomas, *Eur Respir J*, 34 **(2009)** 475-488.
- [48] Y.S. Prakash, D.J. Tschumperlin, K.R. Stenmark, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 309 **(2015)** L625-638.
- [49] GINA, **(2019)**.
- [50] S.E. Gilpin, D.E. Wagner, *Eur Respir Rev*, 27 **(2018)**.

- [51] M.M. De Santis, D.A. Bolukbas, S. Lindstedt, D.E. Wagner, Eur Respir J, 52 **(2018)**.
- [52] E.F. Wouters, B.B. Wouters, I.M. Augustin, F.M. Franssen, Curr Opin Pulm Med, 23 **(2017)** 241-246.
- [53] GOLD, **(2020)**.
- [54] T.T. Derneği, Turk Thorac J, 12 **(2011)** 1-140.
- [55] TTD, Türk Toraks Derneği, İdiyopatik Pulmoner Fibrozis Tanı ve Tedavi Uzlaşı Raporu, **2018**.
- [56] C. Bolte, T.V. Kalin, V.V. Kalinichenko, Semin Cell Dev Biol, 100 **(2020)** 101-108.
- [57] F. Heineken, R. Skalak, **(1991)**.
- [58] M.S. Chapekar, Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 53 **(2000)** 617-620.
- [59] R. Langer, J. Vacanti, Science, 260 **(1993)** 920-926.
- [60] L.D.K. Buttery, A.E. Bishop, Introduction to tissue engineering, Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering**2005**, pp. 193-200.
- [61] Y. Ikada, J R Soc Interface, 3 **(2006)** 589-601.
- [62] E. ErgİN, Y. EkİCİ, F.B. AtaÇ, Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 38 **(2018)** 70-78.
- [63] Y. Fang, R.M. Eglen, SLAS Discov, 22 **(2017)** 456-472.
- [64] P.S. Wolfe, S.A. Sell, G.L. Bowlin, Natural and synthetic scaffolds, Tissue engineering, Springer**2011**, pp. 41-67.
- [65] M. Reddy, D. Ponnammam, R. Choudhary, K.K. Sadasivuni, Polymers, 13 **(2021)** 1105.
- [66] E.M. Srokowski, K.A. Woodhouse, 2.20 Decellularized Scaffolds, Comprehensive Biomaterials II**2017**, pp. 452-470.
- [67] B. Subia, J. Kundu, S. Kundu, Tissue engineering, 141 **(2010)**.
- [68] M.E. Furth, A. Atala, Tissue Engineering: Future Perspectives, Principles of Tissue Engineering, Elsevier**2014**, pp. 83-123.

- [69] A. Eltom, G. Zhong, A. Muhammad, *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019 **(2019)**.
- [70] A.J. Miller, J.R. Spence, *Physiology*, 32 **(2017)** 246-260.
- [71] H. Tebyanian, A. Karami, M.R. Nourani, E. Motavallian, A. Barkhordari, M. Yazdani, A. Seifalian, *J Cell Physiol*, 234 **(2019)** 19256-19270.
- [72] M.S.B. Raredon, Y. Yuan, L.E. Niklason, *Lung tissue engineering, Principles of Tissue Engineering* **2020**, pp. 1273-1285.
- [73] H. Kubo, *Respirology*, 17 **(2012)** 445-454.
- [74] G. Matute-Bello, C.W. Frevert, T.R. Martin, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 295 **(2008)** L379-L399.
- [75] T.L. Bonfield, *Lung diseases-selected state of the art Reviews, InTech*, **(2012)** 407-428.
- [76] 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, E. Herzog, L.E. Niklason, *Science*, 329 **(2010)** 538-541.
- [77] M.V. Aun, R. Bonamichi-Santos, F.M. Arantes-Costa, J. Kalil, P. Giavina-Bianchi, *Journal of asthma and allergy*, 10 **(2017)** 293.
- [78] L.B. Ware, *Modeling human lung disease in animals, American Physiological Society*, **2008**.
- [79] P. Flecknell, *Altex*, 19 **(2002)** 73-78.
- [80] S. Sanyal, *Corning*, **(2014)** 1-18.
- [81] P.S. Hiemstra, G. Grootaers, A.M. van der Does, C.A.M. Krul, I.M. Kooter, *Toxicol In Vitro*, 47 **(2018)** 137-146.
- [82] S. Upadhyay, L. Palmberg, *Toxicol Sci*, 164 **(2018)** 21-30.
- [83] PneumaCult™ Serum- and Bovine Pituitary Extract (BPE)-Free Media for Airway Epithelial Cells, <https://www.stemcell.com/products/brands/pneumacult.html>, (Erişim Tarihi: 26 Nisan 2021)
- [84] C.E. Barkauskas, M.I. Chung, B. Fioret, X. Gao, H. Katsura, B.L. Hogan, *Development*, 144 **(2017)** 986-997.
- [85] A. Doryab, G. Amoabediny, A. Salehi-Najafabadi, *Biotechnol Adv*, 34 **(2016)** 588-596.

- [86] O.T. Guenat, F. Berthiaume, *Biomicrofluidics*, 12 **(2018)** 042207.
- [87] I. Matai, G. Kaur, A. Seyedsalehi, A. McClinton, C.T. Laurencin, *Biomaterials*, 226 **(2020)** 119536.
- [88] L. Horvath, Y. Umehara, C. Jud, F. Blank, A. Petri-Fink, B. Rothen-Rutishauser, *Sci Rep*, 5 **(2015)** 7974.
- [89] J.H. Park, J.M. Hong, Y.M. Ju, J.W. Jung, H.-W. Kang, S.J. Lee, J.J. Yoo, S.W. Kim, S.H. Kim, D.-W. Cho, *Biomaterials*, 62 **(2015)** 106-115.
- [90] B. Grigoryan, S.J. Paulsen, D.C. Corbett, D.W. Sazer, C.L. Fortin, A.J. Zaita, P.T. Greenfield, N.J. Calafat, J.P. Gounley, A.H. Ta, F. Johansson, A. Randles, J.E. Rosenkrantz, J.D. Louis-Rosenberg, P.A. Galie, K.R. Stevens, J.S. Miller, *Science*, 364 **(2019)** 458-464.
- [91] G.S. Hussey, J.L. Dziki, S.F. Badylak, *Nature Reviews Materials*, 3 **(2018)** 159-173.
- [92] L.T. Saldin, M.C. Cramer, S.S. Velankar, L.J. White, S.F. Badylak, *Acta biomaterialia*, 49 **(2017)** 1-15.
- [93] F. Akter, L. Berhan-Tewolde, A. De Mel, *Lung Tissue Engineering, Tissue Engineering Made Easy* **2016**, pp. 67-75.
- [94] E.A. Calle, M. Ghaedi, S. Sundaram, A. Sivarapatna, M.K. Tseng, L.E. Niklason, *IEEE Trans Biomed Eng*, 61 **(2014)** 1482-1496.
- [95] A.H. Bahmanpour, T. Navaei, F. Ahadi, Chapter 28 - Pulmonary system responses to biomaterials, in: M. Mozafari (Ed.) *Handbook of Biomaterials Biocompatibility*, Woodhead Publishing **2020**, pp. 653-665.
- [96] J.T. Hjelle, E.C. Carlson, K. Brendel, E. Meezan, *Kidney international*, 15 **(1979)** 20-32.
- [97] M. Rojkind, Z. Gatmaitan, S. Mackensen, M.-A. Giambrone, P. Ponce, L.M. Reid, *The Journal of cell biology*, 87 **(1980)** 255-263.
- [98] S.F. Badylak, R. Tullius, K. Kokini, K.D. Shelbourne, T. Klootwyk, S.L. Voytik, M.R. Kraine, C. Simmons, *Journal of biomedical materials research*, 29 **(1995)** 977-985.
- [99] T.K. Rajab, T.J. O'Malley, V. Tchanchaleishvili, *Artificial Organs*, **(2020)**.
- [100] R.-N. Chen, H.-O. Ho, Y.-T. Tsai, M.-T. Sheu, *Biomaterials*, 25 **(2004)** 2679-2686.
- [101] C.E. Schmidt, J.M. Baier, *Biomaterials*, 21 **(2000)** 2215-2231.

- [102] R.C. Elkins, P.E. Dawson, S. Goldstein, S.P. Walsh, K.S. Black, The Annals of thoracic surgery, 71 **(2001)** S428-S432.
- [103] H.C. Ott, T.S. Matthiesen, S.-K. Goh, L.D. Black, S.M. Kren, T.I. Netoff, D.A. Taylor, Nature medicine, 14 **(2008)** 213-221.
- [104] E. Garreta, R. Oria, C. Tarantino, M. Pla-Roca, P. Prado, F. Fernandez-Aviles, J.M. Campistol, J. Samitier, N. Montserrat, Materials Today, 20 **(2017)** 166-178.
- [105] A. Gilpin, Y. Yang, BioMed research international, 2017 **(2017)**.
- [106] U. Mendibil, R. Ruiz-Hernandez, S. Retegi-Carrion, N. Garcia-Urquia, B. Olalde-Graells, A. Abarrategi, International Journal of Molecular Sciences, 21 **(2020)** 5447.
- [107] P.N. Nonaka, N. Campillo, J.J. Uriarte, E. Garreta, E. Melo, L.V. de Oliveira, D. Navajas, R. Farré, 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, 102 **(2014)** 413-419.
- [108] W.F. Wolkers, A. Hilfiker, Freeze-drying of decellularized heart valve tissues, Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Springer**2015**, pp. 499-506.
- [109] J. Burk, I. Erbe, D. Berner, J. Kacza, C. Kasper, B. Pfeiffer, K. Winter, W. Brehm, Tissue Engineering Part C: Methods, 20 **(2014)** 276-284.
- [110] S.P. Roth, S.M. Glauche, A. Plenge, I. Erbe, S. Heller, J. Burk, BMC biotechnology, 17 **(2017)** 1-10.
- [111] K.H. Hussein, K.M. Park, K.S. Kang, H.M. Woo, Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 67 **(2016)** 766-778.
- [112] N. Nakamura, T. Kimura, A. Kishida, ACS Biomaterials Science & Engineering, 3 **(2017)** 1236-1244.
- [113] D. Zemmyo, M. Yamamoto, S. Miyata, Micromachines, 11 **(2020)** 1008.
- [114] S. Funamoto, K. Nam, T. Kimura, A. Murakoshi, Y. Hashimoto, K. Niwaya, S. Kitamura, T. Fujisato, A. Kishida, Biomaterials, 31 **(2010)** 3590-3595.
- [115] Y. Hashimoto, S. Funamoto, S. Sasaki, T. Honda, S. Hattori, K. Nam, T. Kimura, M. Mochizuki, T. Fujisato, H. Kobayashi, Biomaterials, 31 **(2010)** 3941-3948.
- [116] E.G. Santoso, K. Yoshida, Y. Hirota, M. Aizawa, O. Yoshino, A. Kishida, Y. Osuga, S. Saito, T. Ushida, K.S. Furukawa, PloS one, 9 **(2014)** e103201.
- [117] T.M. Manalastas, N. Dugos, G. Ramos, J.M. Mondragon, Applied Biochemistry and Biotechnology, **(2020)**.

- [118] S.-H. Hung, C.-H. Su, F.-P. Lee, H. Tseng, *Journal of Voice*, 27 **(2013)** 289-294.
- [119] N. Syazwani, A. Azhim, Y. Morimoto, K. Furukawa, T. Ushida, *Journal of Medical and Biological Engineering*, 35 **(2015)** 258-269.
- [120] L. Laboureur, M. Ollero, D. Touboul, *International journal of molecular sciences*, 16 **(2015)** 13868-13884.
- [121] M. Perrut, V. Perrut, *Supercritical Fluid Applications in the Food Industry, Gases in Agro-Food Processes*, Elsevier**2019**, pp. 483-509.
- [122] R. Vardanega, G. Náthia-Neves, P.C. Veggi, M.A.A. Meireles, *Supercritical fluid processing and extraction of food, Green Food Processing Techniques*, Elsevier**2019**, pp. 57-86.
- [123] T. Khezeli, M. Ghaedi, S. Bahrani, A. Daneshfar, *Supercritical fluid extraction in separation and preconcentration of organic and inorganic species, New Generation Green Solvents for Separation and Preconcentration of Organic and Inorganic Species*, Elsevier**2020**, pp. 425-451.
- [124] B. Topuz, G. Günal, S. Guler, H.M. Aydin, *Use of supercritical CO₂ in soft tissue decellularization, Methods in Cell Biology*, Elsevier**2020**, pp. 49-79.
- [125] J.L. Balestrini, A. Liu, A.L. Gard, J. Huie, K.M. Blatt, J. Schwan, L. Zhao, T.J. Broekelmann, R.P. Mecham, E.C. Wilcox, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 22 **(2016)** 260-269.
- [126] K. Sawada, D. Terada, T. Yamaoka, S. Kitamura, T. Fujisato, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 83 **(2008)** 943-949.
- [127] S. Guler, B. Aslan, P. Hosseinian, H.M. Aydin, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 23 **(2017)** 540-547.
- [128] A. Gil-Ramírez, O. Rosmark, P. Spégel, K. Swärd, G. Westergren-Thorsson, A.-K. Larsson-Callerfelt, I. Rodríguez-Meizoso, *Scientific reports*, 10 **(2020)** 1-12.
- [129] K.H. Hussein, K.-M. Park, K.-S. Kang, H.-M. Woo, *Materials Science and Engineering: C*, 67 **(2016)** 766-778.
- [130] H. Hrebikova, D. Diaz, J. Mokry, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 159 **(2015)** 12-17.
- [131] O. Syed, N.J. Walters, R.M. Day, H.-W. Kim, J.C. Knowles, *Acta biomaterialia*, 10 **(2014)** 5043-5054.
- [132] T.W. Gilbert, S. Wognum, E.M. Joyce, D.O. Freytes, M.S. Sacks, S.F. Badylak, *Biomaterials*, 29 **(2008)** 4775-4782.

- [133] K. Burugapalli, A. Thapasimuttu, J.C. Chan, L. Yao, S. Brody, J.L. Kelly, A. Pandit, *Biomacromolecules*, 8 (2007) 928-936.
- [134] T.W. Gilbert, T.L. Sellaro, S.F. Badylak, *Biomaterials*, 27 (2006) 3675-3683.
- [135] P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak, *Biomaterials*, 32 (2011) 3233-3243.
- [136] A.H.A. Zahmati, R. Alipoor, A.R. Shahmirzadi, V. Khor, M.M. Abolhasani, *Internal Medicine and Medical Investigation Journal*, 2 (2017) 76-83.
- [137] C. Deeken, A. White, S. Bachman, B. Ramshaw, D. Cleveland, T. Loy, S. Grant, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 96 (2011) 199-206.
- [138] J. Zhou, O. Fritze, M. Schleicher, H.-P. Wendel, K. Schenke-Layland, C. Harasztosi, S. Hu, U.A. Stock, *Biomaterials*, 31 (2010) 2549-2554.
- [139] L. Flynn, *Biomaterials*, 31 (2010) 4715-4724.
- [140] B. Cox, A. Emili, *Nature protocols*, 1 (2006) 1872-1878.
- [141] S.M. Bhairi, C. Mohan, S. Ibryamova, T. LaFavor.
- [142] Detergents for Cell Lysis and Protein Extraction
<https://www.thermofisher.com/de/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/detergents-cell-lysis-protein-extraction.html>, (Erişim Tarihi: 24.04.2021)
- [143] M. Johnson, *Mater Methods*, 3 (2013) 163.
- [144] Pubchem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, (Erişim Tarihi: 29 Mayıs 2021)
- [145] Sodium cholate hydrate,
<https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/c9282?context=product>, (Erişim Tarihi: 09 Haziran 2021)
- [146] ASB-14,
https://www.serva.de/enDE/ProductDetails/4772_20757_ASB_14_research_grade_0_0.html, (Erişim Tarihi: 09 Haziran 2021)
- [147] T.J. Keane, I.T. Swinehart, S.F. Badylak, *Methods*, 84 (2015) 25-34.
- [148] I. Prasertsung, S. Kanokpanont, T. Bunaprasert, V. Thanakit, S. Damrongsakkul, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: 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) 210-219.

- [149] S.R. Meyer, B. Chiu, T.A. Churchill, L. Zhu, J.R. Lakey, D.B. Ross, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 79 **(2006)** 254-262.
- [150] G. Chen, N. Kawazoe, H. Lu, *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, **(2006)** 1-13.
- [151] H. Tebyanian, A. Karami, E. Motavallian, J. Aslani, A. Samadikuchaksaraei, B. Arjmand, M.R. Nourani, *Open access Macedonian journal of medical sciences*, 5 **(2017)** 859.
- [152] R. Kuttan, R. Spall, R. Duhamel, I. Sipes, E. Meezan, K. Brendel, *Lung*, 159 **(1981)** 333-345.
- [153] J.S. Lwebuga-Mukasa, D.H. Ingbar, J.A. Madri, *Experimental cell research*, 162 **(1986)** 423-435.
- [154] 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, *Science*, 329 **(2010)** 538-541.
- [155] H.C. Ott, B. Clippinger, C. Conrad, C. Schuetz, I. Pomerantseva, L. Ikonomidou, D. Kotton, J.P. Vacanti, *Nature medicine*, 16 **(2010)** 927-933.
- [156] J.M. Wallis, Z.D. Borg, A.B. Daly, B. Deng, B.A. Ballif, G.B. Allen, D.M. Jaworski, D.J. Weiss, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 18 **(2012)** 420-432.
- [157] J.D. O'Neill, R. Anfang, A. Anandappa, J. Costa, J. Javidfar, H.M. Wobma, G. Singh, D.O. Freytes, M.D. Bacchetta, J.R. Sonett, *The Annals of thoracic surgery*, 96 **(2013)** 1046-1056.
- [158] S.E. Gilpin, X. Ren, T. Okamoto, J.P. Guyette, H. Mou, J. Rajagopal, D.J. Mathisen, J.P. Vacanti, H.C. Ott, *The Annals of thoracic surgery*, 98 **(2014)** 1721-1729.
- [159] Y.D. Tchoukalova, J.M. Hintze, R.E. Hayden, D.G. Lott, *The International journal of artificial organs*, 41 **(2018)** 100-107.
- [160] H. Sengyoku, T. Tsuchiya, T. Obata, R. Doi, Y. Hashimoto, M. Ishii, H. Sakai, N. Matsuo, D. Taniguchi, T. Suematsu, *Organogenesis*, 14 **(2018)** 94-106.
- [161] J.L. Balestrini, A.L. Gard, K.A. Gerhold, E.C. Wilcox, A. Liu, J. Schwan, A.V. Le, P. Baeovova, S. Dimitrievska, L. Zhao, *Biomaterials*, 102 **(2016)** 220-230.
- [162] D.E. Wagner, N.R. Bonenfant, D. Sokocevic, M.J. DeSarno, Z.D. Borg, C.S. Parsons, E.M. Brooks, J.J. Platz, Z.I. Khalpey, D.M. Hoganson, *Biomaterials*, 35 **(2014)** 2664-2679.
- [163] U. Hedström, O. Hallgren, L. Öberg, A. DeMicco, O. Vaarala, G. Westergren-Thorsson, X. Zhou, *Scientific reports*, 8 **(2018)** 1-13.

- [164] R.A. Pouliot, P.A. Link, N.S. Mikhael, M.B. Schneck, M.S. Valentine, F.J. Kamga Gninzeko, J.A. Herbert, M. Sakagami, R.L. Heise, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104 **(2016)** 1922-1935.
- [165] R.A. Pouliot, B.M. Young, P.A. Link, H.E. Park, A.R. Kahn, K. Shankar, M.B. Schneck, D.J. Weiss, R.L. Heise, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 26 **(2020)** 332-346.
- [166] B.M. Young, K. Shankar, C.K. Tho, A.R. Pellegrino, R.L. Heise, *Acta biomaterialia*, 100 **(2019)** 223-234.
- [167] J. Liao, B. Xu, R. Zhang, Y. Fan, H. Xie, X. Li, *Journal of Materials Chemistry B*, **(2020)**.
- [168] M. Bahram, N. Mohseni, M. Moghtader, An introduction to hydrogels and some recent applications, *Emerging concepts in analysis and applications of hydrogels*, IntechOpen **2016**.
- [169] O. Wichterle, D. Lim, *Nature*, 185 **(1960)** 117-118.
- [170] W. Zhang, A. Du, S. Liu, M. Lv, S. Chen, *Regenerative Therapy*, 18 **(2021)** 88-96.
- [171] S.R. Caliri, J.A. Burdick, *Nature methods*, 13 **(2016)** 405-414.
- [172] D.O. Freytes, J. Martin, S.S. Velankar, A.S. Lee, S.F. Badylak, *Biomaterials*, 29 **(2008)** 1630-1637.
- [173] J. Fernández-Pérez, M. Ahearne, *Scientific reports*, 9 **(2019)** 1-12.
- [174] S.B. Seif-Naraghi, M.A. Salvatore, P.J. Schup-Magoffin, D.P. Hu, K.L. Christman, *Tissue Engineering Part A*, 16 **(2010)** 2017-2027.
- [175] S.D. Sackett, D.M. Tremmel, F. Ma, A.K. Feeney, R.M. Maguire, M.E. Brown, Y. Zhou, X. Li, C. O'Brien, L. Li, *Scientific reports*, 8 **(2018)** 1-16.
- [176] S. Sasikumar, S. Chameettachal, B. Cromer, F. Pati, P. Kingshott, *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 10 **(2019)** 123-133.
- [177] G. Rolls, An Introduction to Specimen Processing, <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/an-introduction-to-specimen-processing/>, (Erişim Tarihi: 15 Mayıs 2021)
- [178] A.T. Feldman, D. Wolfe, *Tissue processing and hematoxylin and eosin staining*, *Histopathology*, Springer, **(2014)**, pp. 31-43.
- [179] H.A. Alturkistani, F.M. Tashkandi, Z.M. Mohammedsaleh, *Global journal of health science*, 8 **(2016)** 72.
- [180] C. Zheng, M. Levenston, *European cells & materials*, 29 **(2015)** 224.

- [181] V.J. Coulson-Thomas, T.F. Gesteira, Bio-protocol, 4 **(2014)** e1236.
- [182] N. Re, The Journal of Biological Chemistry, 184 **(1950)** 299-306.
- [183] C.R. Kliment, J.M. Englert, L.P. Crum, T.D. Oury, International journal of clinical and experimental pathology, 4 **(2011)** 349.
- [184] I. Stoilov, B.C. Starcher, R.P. Mecham, T.J. Broekelmann, Methods in cell biology, 143 **(2018)** 133-146.
- [185] P.A. Link, R.A. Pouliot, N.S. Mikhael, B.M. Young, R.L. Heise, Journal of visualized experiments: JoVE, **(2017)**.
- [186] T.D. Johnson, S.Y. Lin, K.L. Christman, Nanotechnology, 22 **(2011)** 494015.
- [187] X. Han, T. Na, T. Wu, B.-Z. Yuan, Plos one, 15 **(2020)** e0227174.
- [188] J.J. Uriarte, F.E. Uhl, S.E.R. Enes, R.A. Pouliot, D.J. Weiss, Current opinion in organ transplantation, 23 **(2018)** 673-678.
- [189] M. Jalali, F.Y.L. Saldanha, M. Jalali, Basic science methods for clinical researchers, Academic Press **2017**.
- [190] T. Rabilloud, E. Gianazza, N. Cattò, P.G. Righetti, Analytical biochemistry, 185 **(1990)** 94-102.
- [191] A.J. Dalgliesh, M. Parvizi, M. Lopera-Higuaita, J. Shklover, L.G. Griffiths, Acta biomaterialia, 79 **(2018)** 253-264.
- [192] H. Tebyanian, A. Karami, E. Motavallian, A. Samadikuchaksaraei, B. Arjmand, M. Nourani, Biotechnic & Histochemistry, 94 **(2019)** 214-222.
- [193] P.N. Nonaka, J.J. Uriarte, N. Campillo, E. Melo, D. Navajas, R. Farré, L.V. Oliveira, Respiratory physiology & neurobiology, 200 **(2014)** 1-5.
- [194] T. Tsuchiya, J.L. Balestrini, J. Mendez, E.A. Calle, L. Zhao, L.E. Niklason, Tissue Engineering Part C: Methods, 20 **(2014)** 1028-1036.
- [195] Z.Z. Liu, M.L. Wong, L.G. Griffiths, Scientific reports, 6 **(2016)** 1-12.
- [196] S.E. Gilpin, J.P. Guyette, G. Gonzalez, X. Ren, J.M. Asara, D.J. Mathisen, J.P. Vacanti, H.C. Ott, The Journal of Heart and Lung Transplantation, 33 **(2014)** 298-308.
- [197] D.M. Casali, R.M. Handleton, T. Shazly, M.A. Matthews, The Journal of Supercritical Fluids, 131 **(2018)** 72-81.
- [198] R. Henningsen, B.L. Gale, K.M. Straub, D.C. DeNagel, Proteomics, 2 **(2002)** 1479-1488.

- [199] K.H. Hussein, K.M. Park, J.H. Ghim, S.R. Yang, H.M. Woo, Journal of biomedical materials research part B: applied biomaterials, 104 **(2016)** 263-273.
- [200] J. Wu, P. Ravikumar, K.T. Nguyen, C.C. Hsia, Y. Hong, PloS one, 12 **(2017)** e0171165.
- [201] T. Woods, P.F. Gratzner, Biomaterials, 26 **(2005)** 7339-7349.
- [202] R. Gaetani, S. Aude, L.L. DeMaddalena, H. Strassle, M. Dzieciatkowska, M. Wortham, R.H.F. Bender, K.-V. Nguyen-Ngoc, G.W. Schmid-Schönenbein, S.C. George, Tissue Engineering Part C: Methods, 24 **(2018)** 697-708.
- [203] Y. Li, Q. Wu, L. Li, F. Chen, J. Bao, W. Li, Journal of Biomedical Materials Research Part A, **(2021)**.
- [204] A.R. Massensini, H. Ghuman, L.T. Saldin, C.J. Medberry, T.J. Keane, F.J. Nicholls, S.S. Velankar, S.F. Badylak, M. Modo, Acta biomaterialia, 27 **(2015)** 116-130.
- [205] E. Mulvany, S. McMahan, J. Xu, N. Yazdani, R. Willits, J. Liao, G. Zhang, Y. Hong, Journal of Biomedical Materials Research Part A, **(2021)**.
- [206] H.I. Muri, L. Hoang, D.R. Hjelm, Applied Sciences, 8 **(2018)** 2446.
- [207] Lung ECM cell culture substrates, <https://shop.xylyxbio.com/products/lung>, (Erişim Tarihi: 11 Eylül 2021)
- [208] M. Dabaghi, N. Saraei, M.B. Carpio, V. Nanduri, J. Ungureanu, M. Babi, A. Chandiramohan, A. Noble, S.D. Reville, B. Zhang, Cells, 10 **(2021)** 1538.

EKLER

EK 1 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

- S. Subasi, S. Tuncer, G. Günel Karataş, H.M. Aydın, E. Çelebioğlu, Ç. Karaaslan, Deselülerize Akciğer Doku İskelesi Üretiminde Farklı Surfaktanların Etkisi, Türk Toraks Derneği 23. Yıllık Kongresi. Ekim 2019, Türkiye (Poster).
- S Subasi, S Tuncer, GG Karatas, HM Aydın, E Celebioglu, C Karaaslan, Production of decellularized lung tissue scaffold by chemical method, EAACI 2020, 589-590, Haziran 2020, (Çevrimiçi Katılım), (Poster)



