T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYEL SELÜLOZ TEMELLİ DOKU YAMASINDA KÖK HÜCRE TUTUNMASININ GÖSTERİLMESİ

Ezgi AKYILDIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Ekim, 2021

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYEL SELÜLOZ TEMELLİ DOKU YAMASINDA KÖK HÜCRE TUTUNMASININ GÖSTERİLMESİ

Ezgi AKYILDIZ tarafından hazırlanan tez çalışması 01.10.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Kadriye KIZILBEY, Üye
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Bakteriyel Selüloz Temelli Doku Yamasında Kök Hücre Tutunmasının Gösterilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ezgi AKYILDIZ

İmza

Aileme

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU LAÇİN'e,

Hiçbir zaman yardımlarını ve tecrübelerini esirgemeyen, sorularımı cevapsız bırakmayan Meryem YILDIRIM, Hanife Sevgi VARLI MA, Fatma Ceren KIRMIZITAŞ, Seda GENÇ, Nevra Pelin CESUR, Sinan ÜNAL ve Beyza DÖNMÜŞ'e,

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, en stresli anlarımda beni anlayan ve bu zamanlarda beraber eğlenebildiğim Büşra ÖZKAN, Zeynep ÖZMAN ve Sera UYAN'a,

Hangi koşulda olursa olsun sevgisinin ve desteğinin hiç değişmeyeceğini bildiğim, beni ben yapan insanlardan Elif İlayda YAMAN'a,

Sonsuz bilgi ve merakıyla sadece kendisinin değil benim de gelişimime çok büyük katkı sağlayan, en çok anlaştığım ve en çok tartıştığım, her zaman yanımda olan canım ağabeyim Ozan AKYILDIZ'a,

Bugüne kadar beni her zaman destekleyen ve mesafelerimiz uzak olsa bile yanı sevgilerini yanı başımda hissettiğim canım aileme,

Ezgi AKYILDIZ

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ xi

TABLO LİSTESİ xii

ÖZET xiii

ABSTRACT xv

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 2

2 GENEL BİLGİLER 3

2.1 Biyomalzemeler 3
2.1.1 Biyomalzemelerin Özellikleri 4
2.1.2 Biyomalzemelerin Sınıflandırılması 7
2.2 Hidrojeller 13
2.2.1 Hidrojellerin Sınıflandırılması 14
2.2.2 Hidrojellerin Biyomalzeme Olarak Kullanım Alanları 18
2.3 Bakteriyel Selüloz 20
2.2.3 Bakteriyel Selülozun Biyomalzeme Olarak Kullanımı 21
2.3 Kök Hücreler ve Kök Hücrelerin Sınıflandırılması 23
2.3.1 Kök Hücrelerin Özellikleri 24
2.3.2 Kök Hücrelerin Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Sınıflandırılması 25

3 MATERYAL- METOT 28

3.1 Materyal 28
3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzemeler 28
3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar 29
3.2 Metot 32
3.2.1 Bakteriyel Selüloz Sentezlenmesi 32
3.2.2 Bakteriyel Selüloz Karakterizasyonu 32
3.2.3 Hücre Kütürü Çalışmaları 35

4 SONUÇ VE ÖNERİLER 38

4.1 Bakteriyel Selülozların Sentezlenmesi 38
4.2 Bakteriyel Selülozların Karakterizasyonu 38
4.2.1 Yüzey Morfoloji Analizi 38
4.2.2 Termogravimetrik Analiz 40
4.2.3 Bakteriyel Selülozun Kimyasal Karakterizasyonu 42
4.2.4 Bakteriyel Selülozların Su Tutma Kapasitesi 43
4.3 Hücre Kültürü Çalışmaları 44
4.3.1 Hücre Tutunma Çalışmaları 44
KAYNAKÇA 47
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 54

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
rpm	Dakikada dönme hızı
λ	Dalgaboyu
K_2HPO_4	Dipotasyum hidrojen fosfat
g	Gram
HCL	Hidroklorik asit
CO_2	Karbondioksit
L	Litre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
n	Mol
M	Molar
nm	Nanometre
cm	Santimetre
◦ C	Santigrat derece
W	Watt
KH_2PO_4	Potasyum dihidrojen fosfat

KISALTMA LİSTESİ

AAm	Akrilamid
ECM	Ekstra selüler matris
EKH	Embriyonik kök hücre
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi
HEMA	Hidroksietil metaktilat
IPN	Interpenatrating polimer network
MMA	Metil metakrilat
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Dipentiltetrazolyum Bromid
NaOH	Sodyum Hidroksit
PDMS	Polimetilsiklosan
PDS	Polidioksonan
PE	Polietilen
PEG	Polietilenglikol
PGA	Poliglikolik Asit
PHB	Polihidroksibütirat
PHBV	Polihidroksibütiravalerat
PHV	Polihidroksivalerat
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik Asit
PPF	Polipropilan fumarat
PTFE	Politetrafloroetilen
PU	Poliüretan
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

TG	Termogravimetrik
UPKH	Uyarılmış pluripotent kök hücre

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Biyomalzemelerin özellikleri 4
Şekil 2.2 Biyomalzemelerin sınıflandırılması 7
Şekil 2.3 Kobalt alaşımlı kalça protezi 8
Şekil 2.4 Seramik biyomalzemeden elde edilmiş diş protezleri 10
Şekil 2.5 Hidrojellerin sınıflandırılması 17
Şekil 2.6 Bakteriyel selülozun kimyasal yapısı 20
Şekil 2.7 Kök hücrelerin özellikleri 25
Şekil 2.8 UPKH eldesinde kullanılan faktörler ve yöntemler 27
Şekil 3.1 HEK293 hücre hattı 36
Şekil 4.1 Bakteriyel selülozun SEM analizi sonu elde edilen görüntüler 40
Şekil 4.2 Üretilen bakteriyel selülozun TG analizi 40
Şekil 4.3 Bakteriyel selüloz karakterizasyonu için yapılan FTIR spektrumu 42
Şekil 4.4 Bakteriyel selüloz üzerinde HEK293 hücre hattının tutunma oranı 44

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Metal, seramik ve polimer biyomalzemelerin avantajları ve dezavantajları 12

Tablo 4.1 Bakteriyel selülozlar numunelerinin su tutma yüzdeleri 43

ÖZET

Bakteriyel Selüloz Temelli Doku Yamasında Kök Hücre Tutunmasının Gösterilmesi

Ezgi AKYILDIZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU LAÇİN

Biyomalzemeler, hasarlı doku ve organların onarılması amacıyla kullanılan biyouyumlu malzemelerdir. Tarihin eski zamanlarından itibaren kullanım örnekleri olan biyomalzemelerin günümüzde de pek çok kullanım alanı vardır. Doğal ve sentetik kaynaklı biyomalzemelerin, yüksek biyouyumluluğa ve mekanik dayanıklılığa sahip olmaları gerekmektedir. Hedef dokuya uygun özelliklerde tasarlanan biyomalzemeler aynı zamanda doğal hücre dışı matrisi taklit ederek hücre tutunmasını ve çoğalmasını destekleyen özellikte olabilmektedir. Doğal kaynaklı biyomalzeme örneklerinden olan bakteriyel selüloz bir hücre dışı polisakkarittir. Bakteriyel selüloz biyouyumluluk, esneklik ve hidrofiliklik gibi özelliklerinin yüksek olması nedeniyle hedef dokular ile uyumluluk sağlayabilmekte ve biyomalzeme olarak tercih edilmektedir.

Sunulan tez çalışmasında uygun morfolojik özelliklere sahip bakteriyel selüloz elde edilmesi ve bakteriyel selüloz temelli doku yaması üzerinde kök hücre tutunmasına model olarak hücre tutunmasının gösterilmesi amaçlanmıştır.

Yapılan tez çalışmasında Acetobacter xylinum bakterisi kullanılarak bakteriyel selüloz sentezlenmesi sağlanmıştır. Üretilen bakteriyel selüloz temelli membranların karakterizasyonu yapılmıştır. Üretilen bakteriyel selülozların

morfolojik özelliklerini belirlemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM), termal ve kimyasal özelliklerini belirlemek için ise fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve termogravimetrik (TG) analiz kullanılmıştır. Hazırlanan bakteriyel selülozlar üzerinde hücre tutunmasının incelenmesi için HEK293 insan embriyonik böbrek hücre hattı kullanılmıştır. MTT analizi ile bakteriyel selüloz üzerinde HEK293 hücrelerinin tutunması gözlemlenmiş ve kontrol grubuna göre hücre tutunması değerlendirilmiştir. Kök hücre tutunmasına model olarak bakteriyel selüloz temelli doku yamasında HEK293 hücre tutunma kapasitesinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyomalzeme, biyouyumluluk, bakteriyel selüloz, kök hücre

ABSTRACT

Demonstration of Stem Cell Attachment on a Bacterial Cellulose-Based Tissue Patch

Ezgi AKYILDIZ

Department of Moleculer Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU LAÇİN

Biomaterials are biocompatible materials used to repair damaged tissues and organs. Biomaterials have been used since ancient times and their usage areas are quite wide today. Biomaterials of natural and synthetic origin are required to have high biocompatibility and mechanical strength. Biomaterials designed with properties suitable for the target tissue can also be capable of supporting cell attachment and proliferation by mimicking the natural extracellular matrix. Bacterial cellulose, which is one of the natural source biomaterial examples, is an extracellular polysaccharide. Bacterial cellulose can provide compatibility with target tissues and is preferred as a biomaterial due to its high properties such as biocompatibility, flexibility, and hydrophilicity.

In this thesis, it is aimed to obtain bacterial cellulose with appropriate morphological properties and to demonstrate cell attachment as a model for stem cell attachment on bacterial cellulose-based tissue patch.

In the thesis study, bacterial cellulose was synthesized by using Acetobacter xylinum bacteria. Characterization of the produced bacterial cellulose-based membranes was performed. Scanning electron microscopy (SEM) was used to determine the morphological properties of the produced bacterial celluloses, and fourier

transform infrared spectroscopy (FTIR) and thermogravimetric (TG) analysis were used to determine their thermal and chemical properties. HEK293 human embryonic kidney cell line was used to examine cell adhesion on prepared bacterial celluloses. Adhesion of HEK293 cells on bacterial cellulose was observed by MTT analysis and cell attachment was evaluated relative to the control group. As a model for stem cell adhesion, it was aimed to examine the cell adhesion capacity of HEK293 in bacterial cellulose-based tissue patch.

Key words: Biomaterial, biocompatibility, bacterial cellulose, stem cell

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Biyomalzemeler biyouyumluluk gösteren doğal veya sentetik kaynaklı malzemelerdir. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında vücutta hasarlı dokuların iyileştirilmesinde, fonksiyonlarının arttırılmasında veya iskele olarak kullanılan biyomalzemelerin, hedef dokuya fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak uyum sağlayacak şekilde sentezlenmeleri gerekmektedir. Geçtiğimiz 40 yılda biyouyumluluk ve mekanik dayanıklılık yönünden en uygun biyomalzemenin geliştirilmesi için pek çok çalışma yapılmıştır ve biyomalzemelerin zaman içinde bozunması ile oluşan toksik ve mutajenik etkilerin oluşması engellenmesi amaçlanmıştır. Bu konuda birçok çalışma yapılsa da insan vücudunda toksik etki oluşturmayacak ve yüzde yüz biyouyumluluk gösteren bir biyomalzemenin elde edilmesi oldukça zordur. Metal, seramik, kompozit ve polimer yapıda pek çok biyomalzeme çeşidi tasarlanmış ve uzun yıllardır bu malzemeler insan yaşantısının daha iyi hale getirilmesi için farklı şekillerde kullanılmaktadır [1]. Polimer yapıdaki biyomalzemeler en çok kullanılan biyomalzemelerdendir ve özellikle hidrojel yapıdaki polimerler su tutma kapasiteleri çok fazla olması nedeniyle yüksek biyouyumluluk göstermektedir. Bakteriyel selüloz fibrilli yapıya ve bu sayede yüksek su tutma kapasitesine sahip doğal bir polimerdir. Saf selüloz kaynağı olan bakteriyel selüloz diğer bileşenlerle kolay etkileşime girebilen bir biyomalzemedir. Esnek yapısı ve su tutma kapasitesi ile özellikle deri yaralanmaları gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan bakteriyel selülozun sentezlendiğinde uygun mekanik ve biyolojik özelliklere sahip olması gerekmektedir [2]. Doku yaması temeli olarak bakteriyel selülozun tek başına kullanıldığı ve HEK293 hücre hattının tutunmasının incelendiği bir çalışma literatür taramasında bulunamamıştır. Bakteriyel selüloz temelli doku yamasını üzerinde hücre tutunmasının incelenmesi doku ve hücre yenilenmesi gerektiren pek çok hastalıkta ve yaralanmada çözüm sunabilme potansiyeli yaratmaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Önerilen çalışmanın amacı uygun morfolojik özelliklere sahip bakteriyel selüloz temelli bir doku yaması üzerinde kök hücre tutunmasına model olarak hücre tutunmasının incelenmesidir.

Biyomalzemeler sentezlenirken en önemli amaç biyouyumluluğun yüksek seviyede olmasıdır. Sentezlenen biyomalzemelerin doku mühendisliği ve rejeneratif tıp gibi alanlarda kullanımı için hücre tutunmasına ve çoğalmasına uygun, doğal ekstraselüler matris benzeri bir yapı oluşturmaları gerekmektedir.

Çalışmanın genel amacı bakteriyel selülozun uygun özelliklerde sentezlenmesi ve doku yaması temeli olarak bu bakteriyel selüloz üzerinde hücre tutunmasının incelenmesidir. Çalışmanın amaçları maddeler halinde şu şekilde sıralanmaktadır:

1. Bakteriyel selüloz membranların hazırlanması,
2. Hazırlanan bakteriyel selülozların morfolojik, termal ve kimyasal özelliklerinin incelenmesi,
3. Hazırlanan memranların HEK293 hücre hattı kullanılarak hücre tutunma kapasitelerine bakılması.

1.3 Hipotez

Sunulan tez çalışması ile bakteriyel selüloz temelli doku yaması hazırlanacak ve hazırlanan bakteriyel selüloz membranların hücre tutunma kapasitesi incelenecektir. Bakteriyel selüloz üzerinde hücre tutunmasının incelenmesi ile daha ileride yapılacak olan bakteriyel selüloz temelli doku yaması kullanılarak hücre tutunmasının incelenmesi için yapılacak çalışmalara model olabileceği düşünülmektedir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Biyomalzemeler

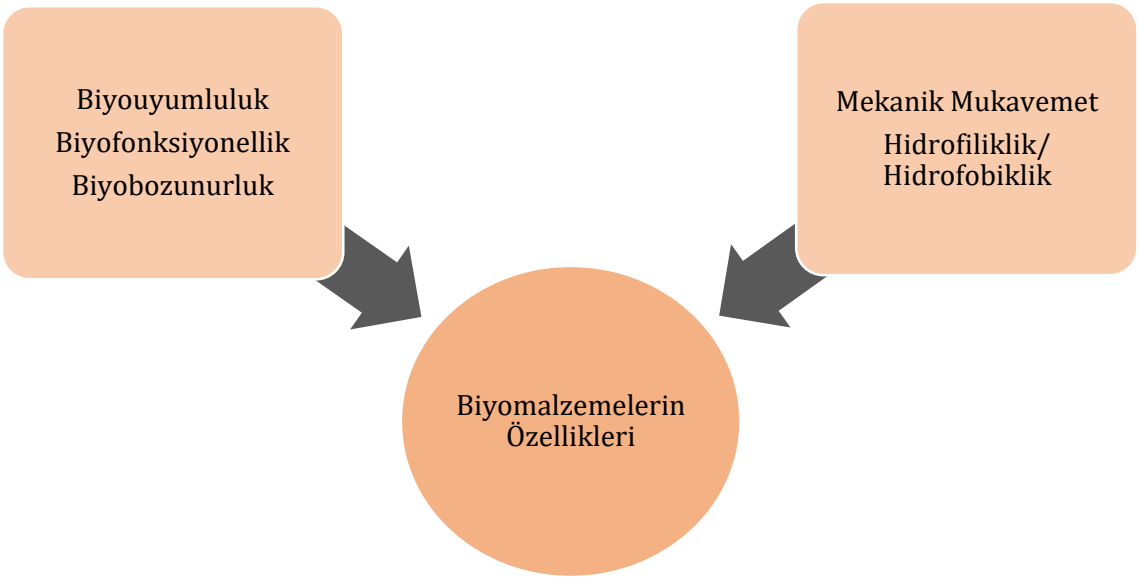
Biyomalzemeler, herhangi bir hasarlı doku veya organın işlevinin onarılması amacıyla uygun biyokimyasal ve biyofiziksel özelliklere sahip olarak üretilen ve belirli bir zaman boyunca kullanılan çeşitli doğal veya sentetik malzemelerdir [3,4,5]. Biyomalzemeler çok eski tarihlerden beri insanlar tarafından çeşitli protezler ve tedavi yöntemleri olarak kullanılmıştır. Mısır mumyalarında kullanılan yapay göz, burun ve parmak gibi uzuvların yerine yapılan ahşap protezler ve binlerce yıl öncesinde altın, bronz ve bakır gibi malzemelerin protez amaçlı kullanımı biyomalzemelerin çok uzun zamandır insan hayatını kolaylaştırmak amacıyla kullanıldığının örnekleridir. Son yüzyıla baktığımızda ise çeşitli metal ve seramiklerin protez amaçlı kullanıldığı görülmektedir. 1938 yılında ilk metal protez vitalyum kırık kemiklerin tedavisi amacıyla kullanılmıştır [5,6]. 1950'li yıllardan sonra paraflüt bezi damar protezlerinde kullanılmıştır. 1972 yılında seramik yapıda olan alümina ve zirkonya biyomalzeme olarak kullanılmaya başlanmıştır. Aynı yıllarda ilk sentetik bozunur ameliyat ipliği, biyoaktif seramikler üretilmiştir. Son 35-40 yılda da çeşitli formlarda birçok biyomalzeme üretilmiştir [7].

Vitalyumun zamanla bozunarak insan sağlığına zararlı hale gelmesinden, alümina ve zirkonyanın dokuya bağlanamamasından kaynaklı çeşitli dezavantajları vardır. Biyomalzemeler, insan vücudunun çok çeşitli doku ve organlarında farklı şekillerde kullanılmaktadırlar. Biyomalzemelerin kullanıldıkları dokunun yapısına ve işlevine uyum sağlaması, alerjenik ve enflamatuar yanıt oluşturmaması için belirli özelliklere sahip olmaları gerekmektedir [7,8].

2.1.1 Biyomalzemelerin Özellikleri

Biyomalzemeler doğal hücre dışı matrisi (ECM) taklit ederek hücrelerin özelliklerini korumalarını sağlayarak, hücrelerin tutunmalarını ve çoğalmalarını kolaylaştırarak doku mühendisliği alanında kullanılırlar [3]. Bu nedenle kullanılan biyomalzemenin bazı biyolojik, fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olması gerekmektedir (Şekil 2.1). Biyomalzemelerin bu özellikleri; hedef dokunun özellikleri, kullanım amacı vb. etkenlerle değişmektedir. Örneğin kemik doku gibi sert bir doku için kullanılması gereken biyomalzeme ile esnek bir doku için kullanılması gereken biyomalzeme birbirinden farklı mekanik ve yapısal özelliklere sahiptir. Ayrıca vücutta pH değerinin çok farklı olduğu vücut sıvıları vardır. Özellikle ilaç taşınmasında kullanılan bazı biyomalzemelerin ise vücutta belirli bir süre sonunda çözünmeleri beklenmektedir. Bu nedenlerden dolayı kullanılacak olan biyomalzemenin özellikleri çok büyük önem taşımaktadır. Biyomalzemelerin genel özelliklerine baktığımızda;

- Biyouyumluluk,
- Fiziksel ve kimyasal özellikler,
- Mekanik özellikler olarak inceleyebiliriz [9,10].



Şekil 2.1 Biyomalzemelerin özellikleri

2.1.1.1 Biyomalzemelerin Biyouyumluluğu

Biyouyumluluk, kullanılan materyalin hedef dokunun veya sistemin fizyolojik ortamı tarafından kabul edilmesi, dokuda iltihaplanma, pıhtı oluşumu gibi istenmeyen tepkiler oluşturmaması ve dokuların fiziksel, kimyasal, biyolojik özelliklerine ve mekanik davranışlarına uyum sağlaması olarak tanımlanabilir. Kısacası malzemenin canlı yapı ile uyumluluğunu ifade eder. Biyouyumluluğu olan bir malzeme biyomalzeme olarak tanımlanmaktadır.

Biyouyumluluk, günümüzde biyomalzemenin en önemli özelliği olarak değerlendirilmesine rağmen ilk kullanılan biyomalzemeler genellikle sabit ve stabildir. Bu nedenle biyouyumluluk maksimum düzeyde aranan bir özellik olmamıştır. Günümüzde biyomalzeme kavramı ve biyomalzeme olarak kullanılan materyallerin çeşitleri değiştikçe biyouyumluluk bir biyomalzemede en çok aranan özelliklerden biri olmuştur [5,11].

Biyouyumluluk, biyomalzemenin yalnızca kendisine bağlı bir özellik değildir. Bir dokuda belirli koşullar altında biyouyumluluk gösteren bir biyomalzeme başka bir dokuda veya aynı dokuda farklı koşullar altında toksik veya enflamatuar sonuçlar oluşturabilir. Örneğin kan ve kemik doklarında kullanılacak olan biyomalzemelerin biyouyumluluğu oldukça farklıdır [9,10].

Biyouyumluluk kavramı biyomalzemenin toksik olmaması, doku uyumlu olması gibi özelliklerinin yanı sıra biyofonksiyonellik özelliğini de kapsar. Biyomalzemenin istenilen sürede işlevlerini yerine getirebilmesi için biyofonksiyonellik gerekli bir özelliktir [8].

İlaç taşınması-hedeflenmesi gibi uygulamalarda kullanılmak üzere seçilen biyomalzemelerin genellikle biyobozunur olması tercih edilmektedir. Vücuttaki kalıcılığı uzun süreli olmayan bu biyobozunur biyomalzemelerin kendilerinin olduğu gibi bozunma sonucu oluşan ürünlerinin, yan ürünlerinin de biyouyumlu olması gerekmektedir [9,10].

Biyomalzemelerin tasarlandıktan sonra klinik kullanımlarına kadar belirli kurumların belirlediği gereksinimleri karşılamak için birçok aşamadan ve biyouyumluluk değerlendirmelerinden geçmesi gerekmektedir [11].

2.1.1.2 Biyomalzemelerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Biyomalzemeler pek çok farklı hücre ve moleküle birlikte çeşitli dokularda kullanılmaktadırlar. Biyomalzemelerle birlikte kullanılan hücrelerin adhezyonu ve proliferasyonu biyomalzemenin fiziksel ve kimyasal özelliklerinden etkilenmektedir.

Biyomalzemeler ile etkileşime giren hücrelerin beslenmesi ve büyüyebilmesi için biyomalzemenin gözenekli yapıda olması gerekmektedir. Biyomalzemenin gözenek boyutları hedef dokuya ve işleve göre tasarlanmalıdır. Biyomalzeme yüzeyinin pürüzlü ve gözenekli yapıda olması biyomalzemenin hücre ile olan etkileşimini etkilemektedir. Pürüzlü ve gözenekli yüzeyler, hücreler ve moleküler için daha fazla tutunma alanına sahiptir ve bu yüzeyler hücre proliferasyonunu da desteklemektedir.

Fiziksel ve kimyasal özellikler biyomalzemenin stabilitesini etkileyen özelliklerdir. Bir biyomalzemenin işlev gördüğü süre boyunca kimyasal stabilitesini koruması beklenmektedir. Kimyasal stabilitesini koruyamayan ve bozunmaya uğrayan biyomalzemlerin korozyon sonucu oluşan ürünleri implant bölgesindeki dokularda veya vücudun diğer bölgesindeki dokularda olumsuz sonuçları oluşabilmektedir. Bu da biyomalzemenin biyouyumluluğunu etkilemektedir [8].

2.1.1.3 Biyomalzemelerin Mekanik Özellikleri

Biyouyumluluk çok önemli bir özellik olmasına rağmen biyomalzemenin başarılı bir şekilde tasarlanmış olması için fiziksel, kimyasal ve mekanik özelliklerinin de gerekli şekilde düzenlenmiş olması gerekmektedir. Canlı doku ile temas eden biyomalzemeler dokunun özelliklerine göre dokularda tepki oluştururlar. Biyomalzemelerin mekanik özellikleri hedef doku ve iletilen hücrelerin özellikleri tarafından belirlenmiş olur. Biyomalzemelerin hedef dokuya benzer yapıda mekanik özelliklere sahip olarak tasarlanmaları gerekmektedir [8,10].

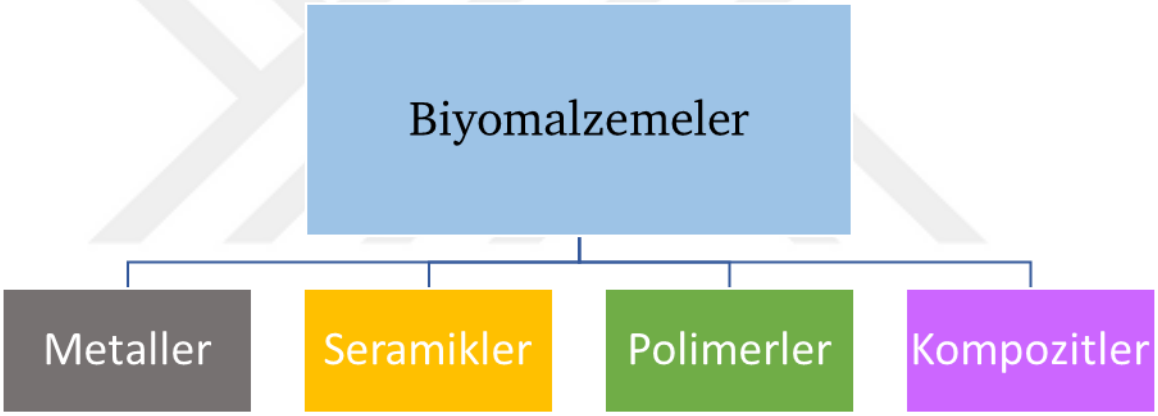
Vücuttaki çeşitli dokuların günlük ve biyolojik aktiviteler sırasında maruz kaldığı direnç birbirinden oldukça farklılık gösterir. Örneğin kemikler günlük aktivite sırasında 4 MPa'a kadar bir kuvvette maruz kalırken bu diğer tendonlarda 40-80 MPa'a kadar çıkmaktadır. Bu nedenle bir doku türü için kullanılacak olan

biyomalzemenin dokunun gerektirdiği mekanik yapıya ve dirence sahip olması gerekmektedir [5,7,10].

Biyomalzemelerin mekanik özelliklerini belirlemek için farklı her dokuda farklı olan Young modülü, gerilme ve sıkıştırma mukavemeti, düktilite gibi özellikler incelenmektedir [8].

2.1.2 Biyomalzemelerin Sınıflandırılması

Geçmişten günümüze teknolojinin ve biyomalzeme anlayışının da değişmesiyle farklı yapıda pek çok biyomalzeme türleri tanımlanmıştır. Birçok farklı alanda kullanılan doğal ve sentetik kaynaklı biyomalzemeler; metaller, seramikler, polimerler ve kompozitler olarak 4 ana gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Biyomalzemelerin sınıflandırılması

2.1.2.1 Metaller

Metaller yüksek yoğunluk, sertlik gibi mekanik özelliklere sahip olmaları ve kristal yapılarından dolayı tercih edilen sentetik biyomalzemelerdir. Metalik biyomalzemeler yapıları ve mekanik özellikleri nedeniyle özellikle ortopedi alanında kullanılacak olan implantlarda biyomalzeme olarak tercih edilmektedir. Metalik biyomalzemeler diş ve çene cerrahisinde, ortopedi alanında diz ve kalça eklemleri, kemik plakaları olarak; yapay kalp kapakçıkları ve vasküler stentler olarak da kardiyovasküler alanda kullanılmaktadır [5,11]. Günümüzde

biyomalzeme olarak yaygın şekilde kullanılan metaller çelik, altın, titanyum ve alaşımları, kobalt ve alaşımları, titanyum-nikel alaşımlarıdır [3,5,12].

Uzun yıllardır implant yapımında kullanılan çelikler, tedarik açısından kolay ulaşılabilir malzemelerdir ancak uzun zamanlı kullanımlarında korozyon problemi ile karşılaşıldığı için genellikle geçici implantların yapımında kullanılırlar [3,5].

Altın ise özellikle diş tedavilerinde kullanılan uzun ömürlü bir biyometaldir. Altın alaşımları saf altına göre daha iyi mekanik özelliklere sahiptir ve bu nedenle dolgu ve kaplama malzemesi olarak kullanılmaktadırlar [5].

Titanyum ve alaşımları, canlı doku tarafından kabul edilme derecesi yüksek olan, hafif ve korozyon direnci yüksek biyomalzemeler olmasının yanı sıra manyetik olmamaları da hasta görüntüleme sistemleri için avantaj sağlamaktadır. Damar stent ve bağlayıcılarında, kuron köprü, kemik içi implant yapımında sıklıkla kullanılmaktadırlar [5,13].

Kobalt ve alaşımları daha fazla yük altındaki diz ve kalça eklemi gibi bölgelerin protezlerinde ve diş uygulamalarında kullanılmaktadır (Şekil 2.3). Bu tür biyomalzemelerin en önemli özelliği yüksek korozyon ve aşınma dirençlerinin olmasıdır [5,11].



Şekil 2.3 Kobalt alaşımlı kalça protezi [10]

Metalik biyomalzemeler mekanik özellikleri sayesinde özellikle kas ve iskelet sistemimiz için uygun biyomalzemelerdir. Ancak metalik biyomalzemelerin

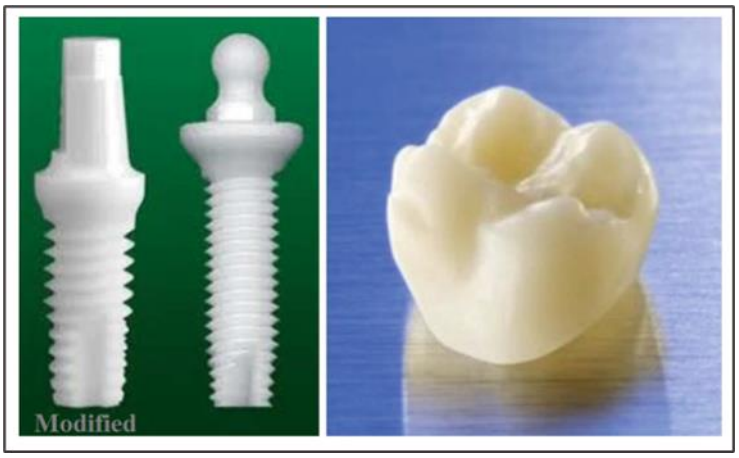
biyouyumluluğu korozyona dirençleriyle ilgilidir. Metallerin korozyona uğramaları sonucu oluşan toksik etki dezavantajlarıdır [11, 12].

2.1.2.2 Seramikler

Biyomalzeme tasarımı için kullanılan bir başka malzeme grubu da seramiklerdir. İnorganik malzemeler olan seramikler metalik değillerdir ve kristal yapıdadırlar [4,13]. Seramikler biyomalzeme olarak genellikle iskelet sisteminde sert ve yumuşak doku ile ilgili tedavilerde kullanılmaktadır (Şekil 2.4). Seramik biyomalzemeler biyoinert ve biyoaktif olmak üzere iki grupta incelenebilir [14].

Biyoinert seramikler, doku ile seramik malzeme arasında herhangi bir kimyasal bağ oluşumunun olmadığı ve vücutta minimum tepki üreten malzemelerdir. Bu malzemeler genellikle yüksek dirence sahiptirler. Alümina (Al_2O_3), zirkonya (ZrO_2), kalsiyum sülfat, pirolitik karbon biyoinert seramiklere örnektir [5, 11]. Alümina yüksek yoğunluğa ve kimyasal kararlılığa sahiptir. Kalça protezlerinde ve diş implantlarında kullanımı tercih edilen alümina korozyon direnci, dayanıklılığı ve toksik özellik göstermemesi ile avantaj sağlamaktadır. Zirkonya ise alüminaya göre daha yoğun ve dayanıklıdır. Aynı zamanda çatlama ve bükülme direnci de yüksek olan bu malzemenin içerisinde radyoaktif elementler bulundurması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Alümina ve zirkonya kullanımındaki en büyük sorun doku ile bağlanmalarının olmaması yani biyolojik olarak neredeyse etkisiz olmalarıdır [5,13,14,15].

Biyoaktif seramikler ise doku ile kimyasal olarak bağlanan malzemelerdir. Biyoaktif seramikler biyobozunur yapıda da bulunabilirler. Biyoaktif seramikler biyoinert seramiklere göre mekanik dayanıklılığı daha düşük olan biyomalzemelerdir [11,14]. Kalsiyum fosfatlar, camlar ve cam seramikler biyoaktif seramik biyomalzeme türleridir. Biyoseramik malzemeler arasında en önemli gruplardan biri olan kalsiyum fosfatlar genellikle kemikle kaynaşma gereken uygulamalarda kullanılırlar. En yaygın olarak kullanılan grubu hidroksiapatittir. Hidroksiapatit kemik ve dişlerin doğal inorganik bileşenlerine benzer yapıdadır [11,12,14].



Şekil 2.4 Seramik biyomalzemeden elde edilmiş diş protezleri [11]

Seramik biyomalzemeler gözenekli yapılara sahiptirler. Biyouyumluluğu yüksek olan bu malzemelerin gerilme özellikleri zayıftır ve kırılgandırlar. Bu nedenle metallere ve polimerlere göre daha az tercih edilmişlerdir [3,4].

2.1.2.3 Polimerler

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında kullanılmak üzere çok sayıda biyomalzeme tasarlanmıştır. Günümüzde birçok polimer çeşidi biyomalzeme olarak kullanılmaktadır ve oldukça yaygındır [3,16]. Polimerler yapılarında karbon bulunan uzun organik molekül zincirlerden meydana gelmişlerdir. Polimer yapılı biyomateryaller, uygulandıkları bölgede veya sistemde zararlı etkiler oluşturmadan uzun sürelerde kullanılabilmektedirler. Polimerik biyomalzemeler kıkırdak, cilt, damar, lens gibi çeşitli doku türlerinde protez olarak kullanılmaktadır. Lif, jel, film ve nanopartikül gibi çeşitli şekillerde hazırlanabilen polimerler sentetik veya doğal kaynaklı olabilirler [5,17].

Sentetik biyomalzemeler doğal polimerlerle karşılaştırıldığında pek çok avantaja sahiptirler. Mekanik ve morfolojik özellikleri işlenebilir, çok sayıda ve tekrar üretilebilir, bozunma oranları kontrol edilebilir ve genelikle bağışıklık sistemi tarafından reddedilmezler. Sentetik biyopolimerlerin çoğu hidrofobik yapıda bulunur [16,17]. Sıkça kullanılan sentetik biyopolimerlere poli(laktik asit) (PLA), poli (glikolik asit) (PGA), poli (laktit-ko-glikolik asit) (PLGA), polihidroksibutirat (PHB), poli (hidroksivalerat) (PHV), poli (hidroksibütiratevalerat) (PHBV), poli (dioksanon) (PDS), polikaprolakton (PCL), polidimetilsiloksan (PDMS),

poliüretanlar (PU'lar), polifosfazenler, polianhidritler, poliasetaller, poli (propilen fumarat) (PPF), poli (etilen) glikol) (PEG), Polietilen (PE), politetrafloroetilen (PTFE), poliasetal (PA), polimetilmetakrilat (PMMA) VE polietilenteraftalat (PET) örnek verilebilir. PLA ve PLGA biyouyumluluk, biyobozunurluk ve düşük toksisite oluşturma özellikleri ile diş hekimliği ve plastik cerrahi alanlarında sıklıkla tercih edilirler [3,5,16].

Doğal biyopolimerler sentetik polimerlerle karşılaştırıldığında birtakım dezavantajlara sahiptir. Elde edilen ürünlerin özellikleri arasında farklılıklar olabilir ve doğal polimerlerin özellikleri işlenerek kolaylıkla değiştirilememektedir. Ancak doğal biyopolimerlerin sağladığı en önemli avantaj hücre yapışmasına, proliferasyonuna ve farklılaşmasına izin vermeleridir. Bu sayede üç boyutlu yapılarla hasarlı doku veya organın işlevinin geri getirilmesi amacıyla kullanılabilme imkanı sağlamaktadır [16,17]. Doğal biyomalzemeler protein ve polisakkarit temelli olabilmektedir. Protein temelli biyopolimerlere ipek, kolajen, fibrin, elastin, keratin, jelatin, laminin ve fibronektin örnek olarak verilebilir. Kolajen bütün bağ dokuda bulunur ve ekstraselüler matrisin yapısındaki bileşenlerdendir. Bu nedenle immün tepkilere neden olmaz. Genellikle cilt hasarlarının tedavisinde kullanılan kolajen temelli biyomateryaller kas, kardiyovasküler, kıkırdak ve tendon gibi dokular için de kullanılmaktadır [3,4,17]. Polisakkarid temelli biyopolimerler ise selüloz, hyalüronik asit, agaroz, kitosan ve alginattır. Kitosan işlenmesi kolay ve yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip bir malzemedir ve bu nedenle yara örtüsü uygulamalarında sıklıkla kullanılır. ExcelArrest® XT ve HemCon VR gibi çeşitli kitosan bazlı bandajlar piyasaya sunulmuştur [4,17].

Tablo 2.1 Metal, seramik ve polimer biyomalzemelerin avantajları ve dezavantajları [3,4,5,11,17]

Biyomalzeme türü	AVANTAJLAR	DEZAVANTAJLAR
Metaller	• Yoğunluk, sertlik ve yüksek mekanik dayanıklılık • Kolay sterilizasyon • Kolay üretim	• Korozyon/ bozunma sonucu vücutta toksik etki oluşturma
Seramikler	• Yüksek biyouyumluluk • Korozyona karşı dayanıklılık	• Kırılgan yapı • Şekillendirilme zorluğu
Polimerler	• Yüksek biyouyumluluk ve biyoçözünürlük • Şekillendirilmesi kolay • Mekanik dayanıklılık	• Sterilizasyonu zor

2.1.2.4 Kompozitler

Biyomalzeme tasarımında en önemli özellik biyomalzemenin doku ile biyolojik ve mekanik olarak uyumudur. Uyumu en yüksek biyomalzemenin tasarlanması için çok çeşitli malzemeler kullanılmıştır. Kompozit biyomalzemeler de birden fazla sayıda farklı malzemenin birleşiminden oluşan biyomalzemelerdir. Kompozit biyomalzemeler hem kendisini oluşturan malzemelerin özelliklerini hem de bu farklı malzemelerin birleşimiyle oluşan özellikleri içermektedir. Çok fazlı yapıda olan bu biyomalzemelerle tek bir bileşenden elde edilemeyecek özelliklerin elde edilmesi amaçlanmıştır [5,11]. Kompozitlerin fiziksel ve mekanik özellikleri, bileşiminde kullanılan malzemelere bağlıdır. İki bileşenli bir kompozit ele alındığında sürekli faz, dağınık faz ve arayüz olarak üç bölümden oluştuğu görülmektedir. Sürekli faz matris olarak adlandırılır. Matristen daha sert olan dağınık faz, kompozite mekanik özellikler sağlamaktadır. Kompozitin çevresel stabilitesi ve mekanik peformansı arayüze bağlıdır. Polimer-seramik kompozitinde, polimer matris görevi görürken seramik takviye görevi görmektedir [11,18].

Kompozit biyomalzemeler biyouyumluluğu, mekanik özellikleri ve biyobozunurlukları yüksek olarak istenilen özelliklerde tasarlanabilmeleri sayesinde çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Dental doku malzemesi olarak diş sağlığı alanında, polimer-seramik kompozitleri olarak ortopedik alanlarda kullanılmaktadır. Ayrıca gözenekli implantlar şeklinde tasarlanarak kemik ve yumuşak doku büyümesini sağlamak amacıyla kullanılmıştır [5,11,19].

2.2 Hidrojeller

Hasarlı doku ve organların tedavi edilmesi için uzun yıllardır çok fazla biyomalzemenin tasarımı yapılmıştır. Biyomalzemelerin biyouyumluluğu ve mekanik direnci gibi gerekli özelliklerinin en yüksek seviyede olması amaçlanmaktadır. Polimerler biyomalzeme çeşitlerinin büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır ve bir önceki bölümdeki gibi doğal ve sentetik olarak sınıflandırılabilecekleri gibi fonksiyonel veya yapısal olarak da hidrojeller, yüzeyi modifiye edilmiş, enjekte edilebilir şeklinde de sınıflandırılabilirler [10,20].

Hidrojeller sentetik veya doğal polimerlerden elde edilebilen, çapraz bağlı, üç boyutlu hidrofilik polimer ağları olarak tanımlanmaktadır. Hidrojellerin sahip olduğu en önemli avantaj su emme kapasitelerinin çok yüksek olmasıdır. Ağırlıklarının yaklaşık 10 ile 20 katı kadar suyu emerek şişebilmektedirler ve suyu emdikten sonra yapısal bütünlükleri bozulmamaktadır. Hidrojellerin su tutma kabiliyeti, polimer ağında bulunan hidroksilik (–OH), karboksilik (–COOH), amidik (CONH–), birincil amidik (–$CONH_2$) ve sülfonik (–SO_3H) grupları gibi fonksiyonel gruplardan kaynaklanmaktadır [21]. Barındırdıkları çapraz ve kimyasal bağlar sayesinde bütünlüklerini koruyan hidrojeller su içermeleri, yumuşak ve esnek yapıları gibi özellikleri ile canlı dokular ile benzerlik göstermektedirler. Su içeriklerinin fazla olmasıyla biyouyumluluğu yüksek olan hidrojeller aynı zamanda biyolojik reaksiyonlarda inert olmaları, vücut tarafından emilime uğramamaları, küçük moleküllere geçirgenlik sağlamaları, moleküllerin salınımına izin vermeleri ve ısı ile sterilize edilebilmeleri gibi avantajlara sahiptirler [20,22,23].

Katı gibi yapısal bütünlükleri ve sıvı gibi difüzyonel taşınım özelliği bulunan hirojeller sentetik olarak ilk defa 1954 yılında Wichterle ve Lim tarafından

tasarlanmıştır. Biyomedikal amaçlı olarak ilk kullanımı da Wichterle ve Lim'in geliştirdiği oksijen geçirgenliği yüksek ve uygun kırılım indisine sahip polhidroksietil metakrilatin (PHEMA)'in yumuşak kontakt lens olarak kullanılması ile başlamıştır [23]

2.2.1 Hidrojellerin Sınıflandırılması

Canlı dokularla biyouyumluluğu ve benzerliği çok yüksek olan hidrojelleri sınıflandırmanın pek çok yolu bulunmaktadır. Temel olarak kaynaklarına, polimerik bilşenlerine, yan gruplarının yüküne, fiziksel yapılarına ve çapraz bağlanma gruplarının şekillerine göre sınıflandırılabilirler (Şekil 2.5).

2.2.1.1 Kaynaklarına Göre Sınıflandırma

Hidrojeller kaynaklarına göre doğal, sentetik ve hibrit olmak üzere üç şekilde sınıflanrırılmaktadırlar. Kitosan, aljinat, selüloz gibi doğal polimerlerden elde edilen hidrojeller doğal kaynaklıdır. Bunların biyouyumluluklarının yüksek olması en önemli avantajlarından biridir. Sentetik kaynaklı hidrojeller ise insan kaynaklı monomerlerin polimerizasyonu yolu ile elde edilirler ve bunlara çeşitli biyolojik fonksiyonlar kazandırılabilmektedir. Akrilamid (AAm), hidroksietil metakrilat (HEMA) ve metil merakrilat (MMA) gibi çeşitli örnekleri bulunmaktadır. Hibrit hirdojeller ise doğal ve sentetik polimerlerin bir arada kullanılasıyla elde edilen hidrojellerdir [23,24].

2.2.1.2 Polimerik Bileşimlerine göre sınıflandırma

Hidrojeller polimerik bileşenlerine göre veya hazırlanma yöntemlerine göre dört gruba ayrılırlar. Bunlar homopolimerik, kopolimerik, multipolimerik ve iç içe geçmiş ağ yapılı (interpenetrating polimer network, IPN) olarak adlandırılmaktadır. Homopolimerik hidrojeller tek bir monomer türünden elde edilen polimer ağından oluşan polimerlerdir. Yapısal özellikleri monomerin özelliklerine ve polimerizasyon tekniğine bağlı olarak değişmektedir. Kopolimerik hidrojeller ise en az farklı monomer türünden oluşan hidrojellerdir. Monomerler birbirine çapraz bağlanarak kimyasal olarak sentezlenirken hidrojen bağları ve iyonik etkileşimler gibi farlklı kuvvetlerle fiziksel olarak da çapraz bağlanma gerçekleştirebilirler. Kopolimerik hidrojeli oluşturan monomerlerden biri hidrofilik olmak zorundadır ve hidrofilin su emme özelliğini oluşturmaktadır. Multipolimer hidrojeller ise üç veya daha fazla

monomerin çapraz bağlanması ve polimerizasyonu ile elde edilmektedir. IPN hidrojeller, birbiriyle kimyasal olarak bağlanmadan kenetlenmiş halde bulunan iki veya daha fazla hidrofilik polimerik ağdan oluşmaktadır. Yarı IPN hidrojellerde ise bir polimer çapraz bağa sahipken, diğerinde çapraz bağ görülmez [21,23,24,25,26,27].

2.2.1.3 Konfigürasyonlarına göre sınıflandırma

Hidrojeller konfigürasyonlarına göre üç farklı yapıda bulunabilmektedirler: Amorf (kristal olmayan), yarı kristal ve kristal [26].

2.2.1.4 İyon yüklerine göre sınıflandırma

Hidrojeller çapraz bağlı yapılarında bulunan iyonik yüklerine göre nötral, anyonik, katyonik ve amfoterik olarak sınıflandırılmaktadır. Nötral hidrojeller yapılarında yüklü grup bulundurmayan homopolimerik veya kopolimerik hidrojellerdir. Su emme miktarları ortam sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir [23]. İyonik yük taşıyan hidrojeller, anyonik veya katyonik yapıdadır. Anyonik hidrojeller yüksek pH'ta, katyonik hidrojeller düşük pH'ta su tutarak şişme eğiliminde olmaktadırlar [24]. Amfoterik hidrojeller ise izoelektrik noktada dengelenmiş hem anyonik hem de katyonik yük taşıyan hidrojellerdir [21,24].

2.2.1.5 Çapraz bağlanma türlerine göre sınıflandırma

Hidrojellerde bulunan çapraz bağlanma türleri fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki farklı şekildedir. Fiziksel çapraz bağlanma iyonik ve hidrofobik etkileşimler, Van der Wall etkileşimleri, hidrojen bağları gibi zayıf etkileşimlerle oluşmaktadır. Fiziksel çapraz bağlanmaya sahip hidrojellerin üretimi daha kolay olduğundan bu konuda avantaj sağlamaktadır. Kimyasal olarak oluşan çapraz bağlanmalar kovalent bağların oluşturduğu daha kalıcı bağlardır [23,26].

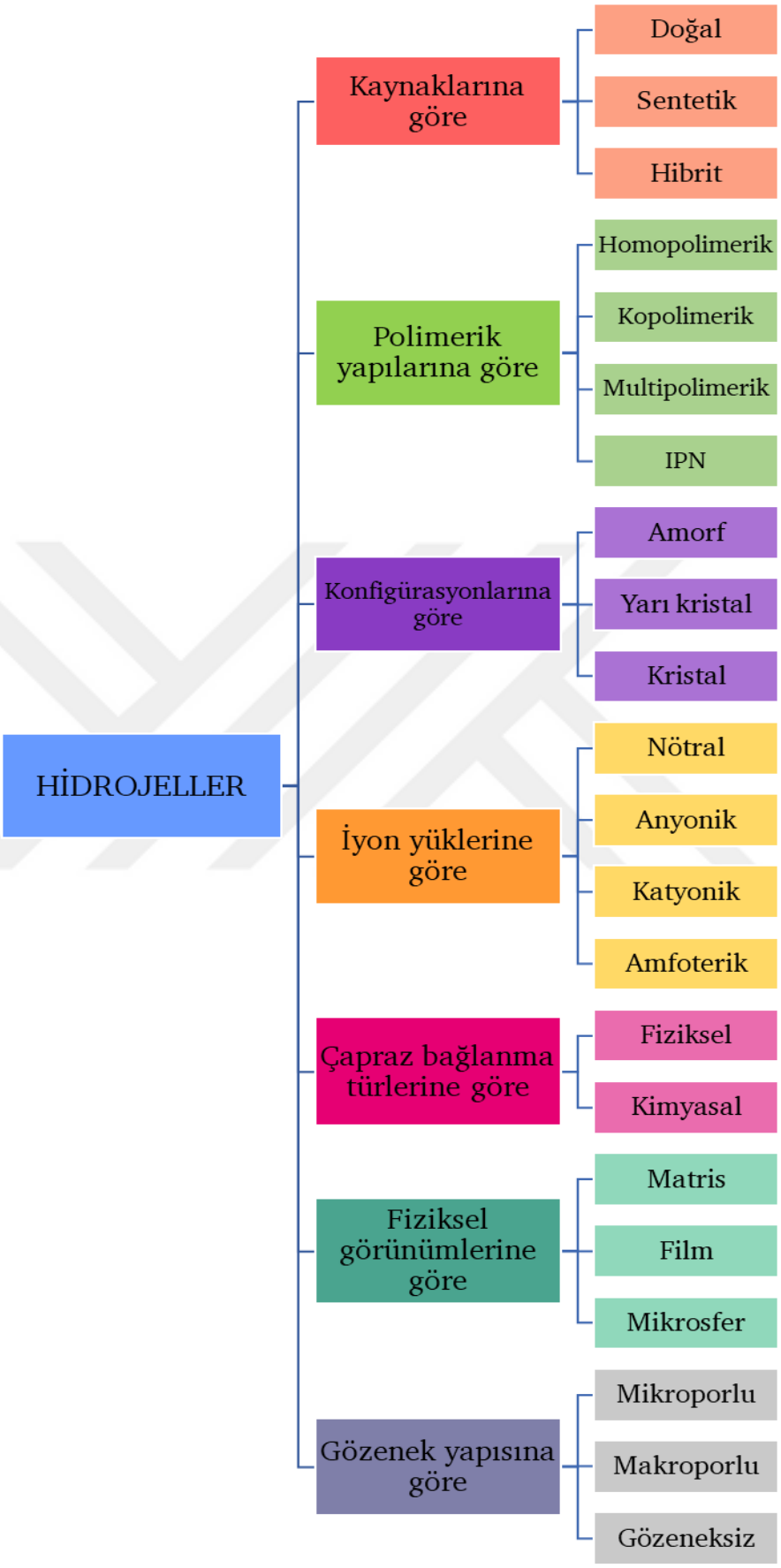
2.2.1.6 Fiziksel görünümlerine göre sınıflandırma

Hidrojeller farklı polimerizasyon yöntemleri kullanıarak matris, film ve mikrosfer şeklinde üretilebilmektedir [26].

2.2.1.7 Gözenek yapısına göre sınıflandırma

Hidrojellerin gözeneklerinin olup olmamasına göre gözenekli olmayan, mikroporlu ve makroporlu olarak sınıflandırılmaktadır [24].

Hidrojellerin ayrıca sıcaklık, pH, glikoz, antijen ve uyaran duyarlılığıyla karakterize olan türleri de bulunmaktadır [20]. Farklı özelliklere sahip çok sayıda hidrojel, biyomateryal olarak çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır.



Şekil 2.5 Hidrojellerin sınıflandırılması [21,23,24,25,26]

2.2.2 Hidrojellerin Biyomalzeme Olarak Kullanım Alanları

Hidrojeller yüksek su tutma kapasiteleri ve esnek yapıları ile birçok canlı dokuya benzerlik gösterirler. Bu nedenle çok çeşitli alanlarda ve araştırmalarda biyomalzeme olarak kullanılma imkanları bulunmaktadır.

2.2.2.1 İlaç Dağıtım Sistemleri

İlaç dağıtım sistemleri belirlenen zamanlarda istenilen bölgeye terapötik maddenin salınımını kontrol edebilen sistemler olmalıdır. İlaç dağıtım sistemlerinde polimerik malzemelerin kullanımı da yaygındır. Polimerik ilaç dağıtım sistemleri ilacın kararlığını korumaya yardımcı olurken vücudu da ilacın yan etkilerinden korumaktadırlar. Hirojeller gözenekli yapılara sahip olmasından dolayı ilaçların yüklenmesi ve salınması daha kolay olmaktadır. Uygulanan aktif farmasötik bileşenin uygulama alanında kalma süresini arttırabilmektedirler. Hidrojellerin hidrofobik malzemelere göre terapötik maddelerle güçlü etkileşimi daha azdır. Bu da aktif terapötik maddenin daha büyük bir kısmının salınmasını sağlamaktadır. Hidrojellere yüklenen ilaçların salınımı difüzyon, şişme ve kimyasal kontrollü olabileceği gibi çevreye duyarlı salım ile de gerçekleşebilmektedir. İlaç salımının fizyolojik koşullara göre değişmesi ilaç taşıma sistemini daha etkin yapacaktır. Hidrojeller pH, sıcaklık, enzimler gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal uyaranlara tepki olarak geçirgenliklerinde ve mekanik özelliklerinde değişikliler oluşturabilmektedir. Bu da hidrojelleri ilaç taşıma sistemlerinde kullanmanın avantajlarından biridir. Ayrıca ısıya ve pH'a duyarlı biyomalzemelerde ilaç dağıtım sistemlerinde kullanılmaktadır. Farklı pH derecelerine sahip vücudun spesifik bölgelerinin özellikle gastroentastinal sistemin hedeflenmesi için çeşitli bazik ve asidik polimerlere sahip hidrojeller kullanılmıştır. Hidrojel kaynaklı ilaç dağıtım sistemleri oral, rektal, oküler, epidermal ve deri altı gibi çeşitli uygulamalarda kullanılabilmektedir. Gelecekte de hidrojellerin bu özelliklerinden yararlanılarak daha spesifik salınım hızına sahip ve başarılı ilaç dağıtım sistemleri elde edilebilir [20,23,27].

2.2.2.2 Doku mühendisliği alanında scaffold(iskele) olarak kullanımları

Çeşitli kazalar ve hastalıklar sebebiyle oluşan doku hasarlarının tedavisi donör sayısının yetersizliği ve doku uyuşmazlığının yaşanması nedeniyle doku transplantasyonu ile tedaviyi her zaman mümkün kılmamaktadır. Doku

mühendisliğinin çeşitli uygulamalarında hidrojeller üç boyutlu iskeleler olarak kullanılmaktadır. Sentetik hidrojeller yapılarının kontrollerinin kolay olması ve doğal hidrojeller de in vivo etkileşimlerinin kolay olması nedeniyle doku mühendisliğinde iskele olarak tercih edilebilmektedir. Sentetik hidrojellerden poliüretanlar (PU), poli (etilen oksit) (PEO), poli (Nisopropilakrilamid) (PNIPAAm), poli (vinil alkol) (PVA), poli (akrilik asit) (PAA) , doğal hidrojelleren ise agaroz, aljinat, kitosan, kolajen, fibrin, selüloz ve hiyaluronik asit iskele olarak kullanılmaktadır. Hidrojeller yüksek biyouyumlulukları, su emme kapasiteleri ve esneklikleriyle birçok avantaja sahiplerdir. Doku mühendisliği iskelesi olarak tercih edilmelerinin en önemli nedeni birçok dokunun doğal ekstraselüler matrisine (ECM) benzer yapıda olmasından kaynaklanmaktadır. İskele olarak kullanılan hidrojeller gözenekli yapıları sayesinde canlı hücrelerin tutunacağı ve çoğalabileceği yüzeyler oluşturabilmektedirler. Hidrojel yüzeyindeki hücrelerin yapışması, çoğalması ve farklılaşması için ECM görevi görerek gözeneklerinden büyüme faktörlerini, çeşitli kimyasal ve fiziksel sinyalleri serbest bırakabilmektedirler. Hidrojellerin bir hastanın kendi hücreleri ile yüklenerek ECM görevi görmesi ile in vivo doku rejenerasyonu amaçlanmaktadır. Bu şekilde hasarlı doku yapısının yenilenmesi amaçlanmaktadır. Hidrojel iskeleler kıkırdak, kas, tendon, kalp kapakçıkları ve damarları, karaciğer, yağ, kemik ve nöron gibi çeşitli doku gruplarını oluşturmak için kullanılmıştır. Kullanılan hidrojel çeşidi hedef dokunun özelliklerine göre farklılık göstermektedir. Örneğin kıkırdak doku için aljinat, damarlarının tedavisinde kolajen kullanılmıştır. Hidrojellerin çok önemli avantajlarının yanında mekanik dayanıklılıklarının düşük olması gibi dezavantajları bulunmaktadır [20,27,28,29].

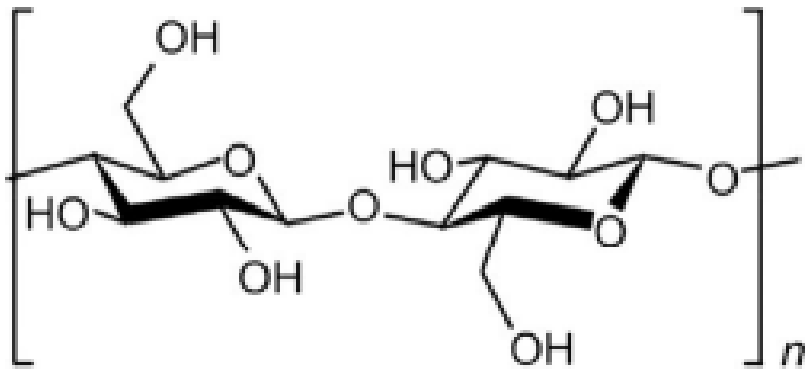
2.2.2.3 Yara Örtü Malzemeleri

Yara, cilt dokusunda çeşitli koşullar ve travmalar sebebiyle oluşan kusurlar veya bozulmalardır. Özellikle kronik yaraların pansumanı ve tedavisi daha zor olmaktadır. Maksimum iyileşmenin sağlanması için bir yara örtüsünün sahip olması gereken özellikler vardır. Yara örtüsü yara kaynaklı sızıntıları ve toksinleri emebilmeli ve enfeksiyonlardan yarayı korumalıdır. Ayrıca aşırı ısıyı önlemeli, gaz geçirgenliği yüksek, çıkarılması kolay ve sterile olmalıdır [27]. Hidrojeller sahip oldukları özelliklerle yara örtü malzemesi olarak kullanılabilmektedir. Hidrojeller istenilen boyutta tasarlanabildikleri için yaranın üstünün tamamen kapanmasını

sağlamaktadırlar. Sıkı ağ yapısında olmaları yarayı enfekte edebilecek mikroorganizmalardan ve etkenlerden korur. Aynı zamanda antibiyotiklerin, farmasötiklerin ve büyüme faktörleri gibi farklı moleküllerin taşınması için de uygun yapı sağlamaktadırlar. Bir yara örtüsünün temel özelliği olan yara sızıntılarını emmek, hidrojellerin hidrofilik yapıları ile sağlanmaktadır. Ayrıca oksijen difüzyonunun gerçekleşmesini ve su tutma kapasiteleri ile yara bölgesinin nemli kalmasını ve gerekli esnek yapıyı sağlarlar. Örneğin poliüretan membran destekli hidrojeller oksijen ve su bazlı ilaç geçişine izin verdiklerinden yanıklar için yara örtüsü olarak kullanılmaktadır. Hidrojeller sahip oldukları fiziksel ve kimyasal özelliklerle yara örtüsü malzemesi olmak için önemli adaylardır. Hidrojel yapıda bulunan bakteriyel selüloz da yara örtü malzemesi olarak sıklıkla kullanılan bir biyomalzemedir [22,30,31].

2.3 Bakteriyel Selüloz

İlk olarak 1838 yılında Payen tarafından keşfedilen selüloz yeryüzünde en fazla bulunan polisakkaritlerden biridir [32,33]. Selüloz poli B-1,4 bağlantılı D-glikozlardan oluşur ve moleküller arasında ve içinde bulundurduğu H bağları nedeniyle hidrofilik özelliktedir [33,34]. Suda ve çoğu organik çözücüde çözünmesi mümkün olmayan selülozun beta asetil bağlarını parçalayacak olan enzimler bulunmadığı için fizyolojik ortamda da çözünememektedir. Biyouyumluluğa sahip olan selülozun inflamatuar yanıt oluşturmadığı gösterilmiştir [32,34]. Bitkilerin birincil hücre duvarının temel bileşeni olan selüloz aynı zamanda alg, mantar ve bakterilerde de bulunabilmektedir.



Şekil 2.6 Bakteriyel selülozun kimyasal yapısı [34]

Mikrobiyal selüloz olarak da bilinen bakteriyel selüloz ilk olarak 1886 yılında Brown tarafından izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Bakteriyel selüloz biyolojik olarak parçalanabilen doğal bir selülozdur ve genellikle en gelişmiş mor bakteri türlerinden gram-negatif bir bakteri olan Acetobacterler tarafından hücre dışı polisakkarit olarak üretilirler [34,35]. *Asetobacterium, Alcaligenes, Agrobacterium* gibi bazı gram-pozitif bakteri türlerinin de selüloz sentezleyebildiği gösterilmiştir. Ancak farklı bakteriler tarafından sentezlenen selülozlar farklı yapıya ve özelliklere sahip olmaktadır. Bakteriyel selüloz üretimi için en etkili bakteri türü *Acetobacter xylinum* (*Gluconacerobacter xylium*)'dur [32,35]. Bu bakteriler diğer mikroorganizmalar gibi çevredeki stres faktörelerine yanıt olarak koruma amaçlı olarak bu hücre dışı polisakkariti sentezlemektedirler [33].

Bakteriyel selülozu sentezleyen glikozlar nükleotid ile aktive olurlar. D-glikoz birimleri 1,4-glikosidik bağlanarak fibril halindeki bakteriyel selülozu oluştururlar (Şekil 2.6) . 20-100 nm çapındaki bu fibriller doğrusaldırlar ve hücre zarından dışarıya doğru uzanırlar. Daha sonra bu doğrusal fibriller zincir içinde ve zincirler arasında hidrojen bağları oluşturarak nanofibrilleri oluştururlar. Bu nanofibrillerin bir araya gelerek şerit şekilli fibrilleri oluştururlar. Bu yapı bakteriyel selüloza hidrofiliklik, kristallik ve kalıplanabilirlik özelliklerini sağlar. Bakteriyel selülozlar ayrıca yüksek mekanik mukavemete, gaz geçirgenliğine ve su tutma özelliklerine sahiptir. [34,36]. Biyolojik olarak biyouyumlu olan bakteriyel selülozun bitkisel kaynaklı selüloza göre en önemli avantajı lignin, hemiselüloz ve pektin gibi yan ürünler içermeyerek saf selüloz kaynağı olmasıdır. Bu nedenle izolasyonu da nispeten daha basittir [35,37]. Ayrıca bitkisel kaynaklı selüloza göre kat kat daha incedir ve yüzey alanı hacim oranın fazla olması ile diğer bileşenlerle daha kolay etkileşime girmektedir. Bakteriyel selüloz yapısındaki aktif fonksiyonel hidroksil grupları sayesinde de bu etkileşimleri sağlamaktadır. Bu da farklı yapılara kombinasyonunu kolaylaştırır ve istenilen özelliklere sahip malzemelerin sentezini mümkün kılmaktadır [33,38].

2.2.3 Bakteriyel Selülozun Biyomalzeme Olarak Kullanımı

Biyomalzemelerin biyomedikal ve tıp alanındaki uygulamalarda kullanılabilmesi için biyouyumluluk, gözeneklilik, biyolojik olarak parçalanabilirlik veya emilebilirlik özelliklerine sahip olması gerekmektedir. Mekanik özelliklerinin de

dokuyla uyumlu olması gereken biyomalzemeler ayrıca hücre ve doku gelişimini teşvik etmelidir [38]. Bakteriyel selülozun bu özelliklere sahip olması rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanlarında pek çok uygulama alanı bulmaktadır.

2.2.3.1 Kemik ve Kıkırdak Doku Rejenerasyonu

Kemik dokusu hidroksiapatit ile güçlendirilmiş osteobastları içeren kolojen yapılı bir matristen oluşmaktadır. Kıkırdak ise kondrositleri içeren kolojen ve proteoglikan temelli bir matristen oluşmaktadır. Hasarlı kemik dokuların tedavisi zordur ve kıkırdakların da kendini onarma süreci uzun zaman almaktadır. Kemik transplantasyonu yüksek enfeksiyon riski ve doku reddi olasılığı taşımaktadır. Bu nedenle genellikle biyouyumlu doku yamalarına ihtiyaç duyulmaktadır [39,40]. Bakteriyel selüloz matrisin pek çok hücrenin büyümesini desteklediği ve dokular için uygun iskele malzemesi olabileceği çalışmalarla gösterilmiştir [39,41]. Bakteriyel selüloz biyouyumluluk, kristal yapı, kalıplanabilirlik ve yüksek gerilme mukavemeti özellikleri sayesinde kemik ve kıkırdak dokularının rejenerasyonu için yapılan uygulamalarda iskele ve greft olarak kullanılmıştır [39,40].

2.2.3.2 Yapay Kan Damarları

Bakteriyel selüloz vasküler hastalıklarla ilgili uygulamalar için de alternatif oluşturmaktadır. Kardiyovasküler sistemdeki sertleşen arterler sonucu damar tıkanıklığı oluşması hayati risk taşıyan baypas operasyonu ile tedaviyi gerektirmektedir. Bakteriyel selülozun diğer sentetik malzemelerle kıyaslandığında daha yavaş trombin oluşumu sergilediği ve pıhtılaşmayı daha az indüklediği gösterilmiştir [35,39,40]. Yapay kan damarları sentetik malzemelerden tüp şeklinde üretilerek yapılmaktadır [39]. Bakteriyel selüloz sentezlenirken kalıplanabilirlik özelliğinden faydalanılarak tüp şeklinde sentezlenmiştir ve bu tüpler “BASYC” adı altında patentlidir. Yapay kan damarı implantı olarak kullanılacak olan ürünün cerrahi işlem sırasında mekanik zorlanmalara ve vücut kan basıncına dayanıklı olması gerekmektedir. Bakteriyel selülozun şeklini koruma yeteneği ve yırtılma direnci birçok malzemeden daha üstündür. Bakteriyel selülozun kan uyumluluğu da oldukça yüksektir ve kan damarlarına yerine kullanılabilirler. Ayrıca bakteriyel selüloz yüzeyinde kan damarı oluşturabilecek

hücrelerin büyümesine izin vererek canlı bir kan damarı oluşumunu destekleyebilmektedir [35,38,39].

2.2.3.3 Yara Örtüsü ve Cilt tedavisi

Bakteriyel selüloz cilt dokusunun tedavisi için yaygın bir uygulama alanına sahiptir. Saflık derecesinin yüksek olması, toksik özellik göstermemesi ve gözenekli yapısı yara iyileşmesi için bakteriyel selülozu uygun bir materyal yapmaktadır. Ayrıca yapısının hedef dokuya ilaç verilmesini desteklemesi, su tutma kapasitesi ve oksijen geçirgenliği de özellikle yara ve yanık tedavisi için kullanımlarının önünü açmaktadır. Bakteriyel selüloz yaralanmış bölgeye uygulandıktan sonra uzun sürelere kadar vücutla uyumlu bir şekilde durabilir ve iyileşme sonrasında da yaralanan bölgede yeni bir travmaya sebep olmadan kolay bir şekilde çıkartılabilmektedir [33,34]. Bakteriyel selülozun başka malzemelerle etkileşiminin kolay olması sonucu istenilen özelliklerde yara örtü malzemeleri tasarlanmıştır. Örneğin bakteriyel selüloz ile kolojenden oluşan kompozit yapı biyouyumluluğu ve gerilme mukavemeti oldukça yüksek bir yara örtüsü oluşturmaktadır. Ayrıca yapıya antibakteriyel etkiler sağlayacak nanopartiküller de eklenebilmektedir [34]. Bakteriyel selülozun yara tedavi ürünü olarak kullanımı 1980 yılına dayanmaktadır. Daha sonra Biolfill® gibi şirketler araştırmalara devam ederek bakteriyel selülozun yara bakım ürünleri olarak pazarlanmasını başlatmıştır. Biolfill® yanık, ülser gibi çeşitli yaraların tedavisi için başarılı ürünler pazarlamaktadır. Gengiflex® de geniş uygulamaları olan bakteriyel selüloz ürünlerini pazara süren firmalardandır [35].

2.3 Kök Hücreler ve Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler, vücuttaki bütün hücre türlerinin köken aldığı, özelleşmemiş hücrelerdir. Kök hücreler uygun sinyalleri aldıklarında özelleşmiş hücre tiplerine dönüşebilmektedirler. Kök hücreler özelleşmiş hücre türlerine dönüşebildikleri gibi kendini yenileme (self-renewal) özellikleri de bulunmaktadır [42,43]. Bölünerek kendini yenileme özelliği kök hücrelerin sayılarını korumalarını sağlamaktadır. Kök hücre çalışmaları 1960'lı yıllarda hematopoietik kök hücrelerin keşfi ile başlamıştır. Daha sonra stromal kök hücreler ve 1990'lı yıllarda sinir kök hücreleri keşfedilmiştir [42].

2.3.1 Kök Hücrelerin Özellikleri

2.3.1.1 Kendini Yenileyebilme

Kök hücrelerin en önemli özelliklerinden biri kendilerini yenileyebilmeleridir (Şekil 2.7). Bölünme yeteneklerini çok uzun süre kullanabilen kök hücreler iki çeşit bölünme gerçekleştirirler. Simetrik bölünme ile özelleşmiş hücreye dönüşecek olan iki aynı hücreye bölünürler. Asimetrik bölünme ise kök hücrenin kendini yenileyebilmesini ve sayılarının sabit kalmasını sağlamaktadır. Asimetrik bölünme sonucu özelleşmiş hücreyi oluşturacak hücrenin yanında kendi yedeklerini de oluşturmaktadırlar [43,45].

2.3.1.2 Farklılaşma

Kök hücreler in vivo veya in vitro ortamda uygun koşulları aldıklarında çok farklı hücre türlerine farklılaşabilmektedirler. Kök hücrelerin farklı dokulara özgü hücrelere dönüşebilme yetenekleri plastisite olarak adlandırılır. Kök hücrelerin farklılaşma kapasitesi ise potensi olarak tanımlanmaktadır ve bu kapasitelerine göre 3 germ tabakasındaki farklı hücre türlerine farklılaşabilirler [44]. Kök hücre türlerinin hepsi aynı sayıda hücre türüne farklılaşmazlar. Farklılaşma kapasitelerine göre kök hücreler totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere beşe ayrılmaktadırlar [45].

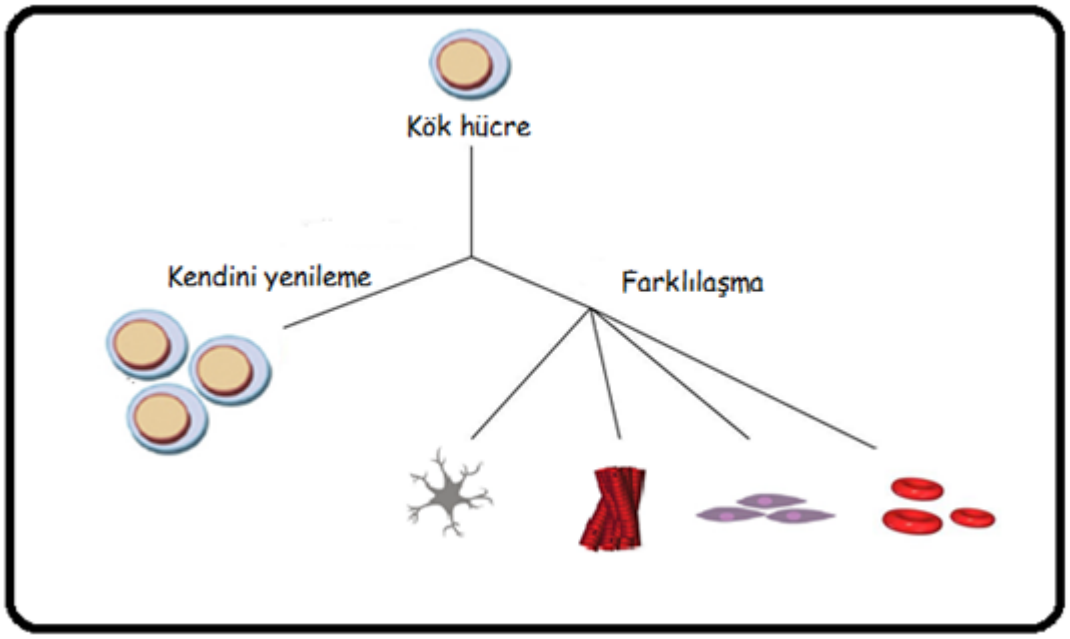
Totipotent kök hücreler; erken embriyodaki blastomerler totipotent özelliktedir ve bir organizmayı tamamen oluşturabilecek farklılaşma kapasiteleri bulunmaktadır. Totipotent kök hücrelerin farklılaşma kapasitesi sınırsızdır ve herhangi bir özelleşmiş hücreye farklılaşabilmektedirler [42,46].

Pluripotent kök hücreler; embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen kök hücrelerdir. totipotent kök hücrelerden farklı olarak plasental yapıları oluşturamamaktadırlar. Embriyonik kök hücreler pluripotent özelliğe sahiptir [42,47].

Multipotent kök hücreler; tek bir germ tabakasına ait ve birbirine benzer hücre gruplarına farklılaşabilen hücrelerdir. Farklılaşma potansiyelleri ve farklılaştıkları hücre sayısı daha sınırlıdır [47,47].

Oligopotent kök hücreler; progenitör hücrenin sadece birkaç hücre tipine farklılaşabilen kök hücrelerdir [46].

Unipotent kök hücreler; tek bir hücre tipine farklılaşabilen ve öncü hücre olarak da adlandırılan hücrelerdir [46].



Şekil 2.7 Kök hücrelerin özellikleri

2.3.2 Kök Hücrelerin Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Sınıflandırılması

Kök hücreleri sınıflandırmanın bir başka yöntemi de elde edildikleri kaynakları ele almaktır. Elde edildikleri kaynaklara göre kök hücreler üçe ayrılır: Embriyonik kök hücreler, erişkin kök hücreler ve uyarılmış pluripotent kök hücreler.

2.3.2.1 Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler (EKH) gelişimin erken evresinde iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent kök hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler ilk defa fare embriyolarından elde edilmiştir. İnsana ait embriyonik kök hücre ise ilk defa 1998 yılında elde edilmiştir [42,47]. İnsan EKH'leri CD9, CD24, Oct-4, Nanog, LIN28, Thy-1, SSEA-3, SSEA-4 VE alkalen fosfataz belirteçlerini bulundururlar [46]. Embriyonik kök hücreler plasenta hariç tüm hücre ve dokulara farklılaşabilme kapasitesine sahip olmaları nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisi için araştırmalara konu olmaktadır. Ancak EKH'larla yapılan çalışmalar insan embriyosuna gereksinim duyduğu için çeşitli etik problemleri de beraberinde getirmektedir [48,49].

2.3.2.2 Yetişkin Kök Hücreler

Yetişkin kök hücreler, organizmanın yaşamı boyunca özelliklerini koruyan ve bulundukları mikroçevrenin şartlarına göre farklılaşmaktadırlar. Yetişkin kök hücreler bütün organ ve dokulara yayılmışlardır. Deri, kalp, beyin, kan damarları, karaciğer, böbrek, kemik iliği gibi doku, organ ve vücut sıvılarından elde edilebilmektedirler [50,51]. Yetişkin kendilerini yenileme özellikleri ve sayıları sınırlıdır. Doku ve organlardaki hasarlı hücrelerin yerini alacak hücreleri oluştururlar. Embriyonik kök hücrelere göre daha az farklıllaşma potansiyelleri vardır. Daha çok dokuya özel hücre tiplerine farklılaşırlar. Yetişkin kök hücreler hastadan toplanabildikleri için embriyonik kök hücre kullanımının neden olduğu etik problemlere yol açmamaktadırlar [50].

2.3.2.3 Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

Uyarılmış pluripotent kök hücreler (UPKH) ilk olarak 2006 yılında Yamanaka ve Takahashi tarafından üretilmiştir [52]. UPKH, özelleşmiş bir hücrenin yeniden programlanarak pluripotent özellik kazanması sonucu oluşmaktadır. UPKH eldesi için ilk yeniden programlama faktörleri olarak bilinen Oct-4, Sox2, Klf-4 ve c-Myc transkripsiyon faktörleri kullanılmıştır. Daha sonra Ling28 ve Nanog gibi daha farklı transkripsiyon faktörlerinin de kullanılabileceği gösterilmiştir [53].

Oct-4; oktomer bağlanma transkripsiyon faktörüdür. Oct-4 embriyonik hücrelerde düşük seviyede ifade edildiğinde hücreler plurpotent özelliklerini korumaktadır.

Sox2; EKH'lerin kendini yenilemesi için gerekli olan bir transkripsiyon faktörüdür. Ayrıca Oct-4 transkripsiyon faktörü ile birbirlerinin ifadesini kontrol etmektedirler.

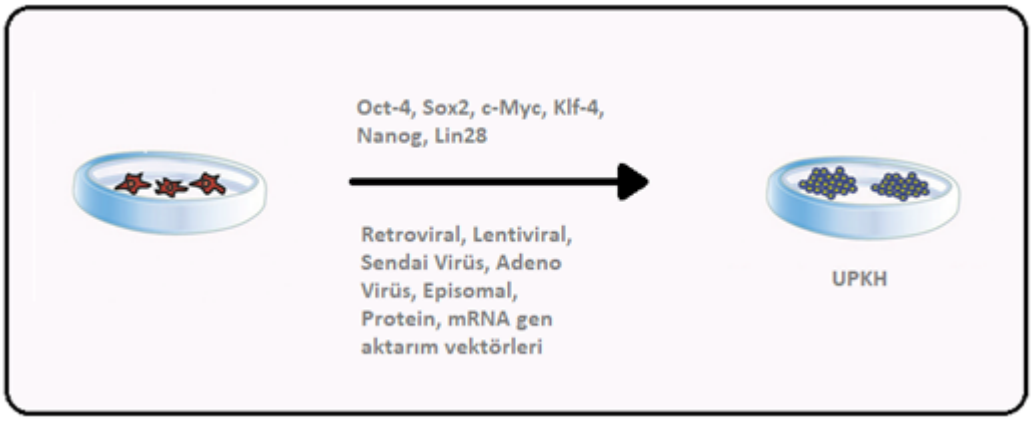
Klf4; hücrelerin kendini yenileyebilme özelliği için gerekli bir faktördür. Klf4 transkripsiyon faktörleri deri, böbrek ve bağırsak gibi pek çok dokuda bulunabilmektedirler.

c-Myc; EKH'lerin kendini yenileme ve pluripotent özelliklerini koruması için gereklidir. Ancak tümörlerde yüksek aktivasyona sahip bir onkogen olduğu için c-Myc içermeyen yeniden programlama yöntemleri araştırılmıştır.

Nanog; hücrelerde kendini yenileme ve pluripotensi özelliklerini korumak için gereklidir.

Lin28; EKH işaretleyicisi olarak kullanılmaktadır ve erken embriyonik dönemde ifade edilir [54].

Bu faktörlerin hücredeki ekspresyonlarının hücrenin pluripotent özelliğini etkilemektedir ve bunların hücrelere aktarımı için genoma entegre olan ve genoma entegere olmayan yöntemler kullanılmaktadır (Şekil 2.8). Retroviral ve lentiviral vektörleri içeren genoma entegre olan yöntemler viral genomun hücre genomuna entegrasyonunu içermesi nedeniyle yüksek verimlilikle UPKH eldesi mümkündür. Ancak viral genomun entegrasyonu bu UPKH'ların tedavi amaçlı kullanımıı kısıtlamaktadır. Genoma entegre olamayan yöntemler ise viral ve viral olamayan çeşitli yöntemleri içermektedir. Viral yöntemler adeno ve sendei virüsleri, iral olmayan yöntemler arasında ise epizomal vektörler, protein, piggyBac transposon sistemleri ve RNA ile yeniden programlama yöntemlerini barındırmaktadır [48,54,55].



Şekil 2.8 UPKH eldesinde kullanılan faktörler ve yöntemler

Uyarılmış pluripotent kök hücreler kişiye özel tedavi yöntemlerinin önünü açmaktadır. Kişinin kendisinden alınan somatik hücrelerin yeniden programlanmasıyla kişiye özel hastalık modelleme ve rejeneratif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için birçok çalışma yapılmıştır. Uyarılmış pluripotent kök hücrelerin tedavi amaçlı kullanımı EKH'lerin neden olduğu etik problemleri ortadan kaldırırken herhangi bir immün yanıt oluşturma riskinin olmaması da en önemli avantajlarından birini oluşturmaktadır [53,54].

3
MATERYAL- METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzemeler

- HEK293 hücre hattı
- *Acetobacter xylinum*
- Pepton
- Glikoz
- Maya özütü
- KH_2PO_4- Potasyum dihidrojen fosfat
- K_2HPO_4- Dipotasyum hidrojen fosfat
- NaOH
- Distile su
- DMEM-High glucose besi yeri
- Fetal bovine serum (FBS)
- L-glutamin
- Streptomisin
- Ethanol
- Tripsin EDTA
- Tripsin Blue
- Paşabahçe
- 75 cm^2 flask
- 25 cm^2 flask
- Falkon tüp
- Fosfat Buffered Saline (PBS) Tablet
- Dimetil sülfoksit (DMSO)
- Steril pipetler tek kullanımlık – 2ml
- Steril pipetler tek kullanımlık- 5 ml

- Steril pipetler tek kullanımlık- 10 ml
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)
- Nitril eldiven
- Kim mendili

3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Taramalı elektron mikroskobu (Zeiss, EVO® LS 10)



- FTIR Spektrofotometresi (Perkin Elmer Spectrum 100)



- TG/DTA (SII Nanotechnology, SII6000 Exstar TG/DTA 6300)



- İnverted mikroskop (Zeiss, Zen Blue2)



- CO2 inkübatörü (Esco, CelCulture CO2 INCUBATOR)



- Flow kabin (Esco, Sentinel PLATINUM, Class II)



- Santrifüj (Hermle, Z 206 A)



- Çalkalamalı inkübatör
- Ph metre
- Hassas terazi
- Manyetik karıştırıcı
- Otoklav

3.2 Metot

Sunulan tez çalışmasının metod kısmı bakteriyel selüloz sentezini, sentezlenen bakteriyel selülozların karakterizasyon çalışmalarını ve hücre kültürü çalışmalarını kapsamaktadır.

3.2.1 Bakteriyel Selüloz Sentezlenmesi

Bakteriyel selüloz sentezlenmesi için *A. xylinum* bakterisi kullanılmıştır ve sentez iki aşamadan oluşmaktadır.

3.2.1.1 İnokulum oluşumu için besiyeri hazırlanması ve inokulum oluşumu

İnokulum oluşumunu sağlamak için 25 g/L glikoz, 3 g/L pepton ve 5 g/L maya özütü içeren besi yeri hazırlanacak ve hazırlanan besi yeri pH derecesi 5'e eşitlenecektir. Ardından 120°C 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilecektir. Sterilize edilen inokulum besiyerine *A. xylinum* bakterisi eklenecek ve inokulum oluşumu için 48-72 saat arasında 30°C sıcaklıkta 150 rpm'de inkübasyona bırakılacaktır.

3.2.1.2 Selüloz Üretimi için besi yeri hazırlanması ve bakteriyel selüloz sentezi

İnokulumların bakteriyel selüloz üretmesi için besi yeri hazırlanacaktır. Hazırlanacak besi yeri 20 g/L glikoz, 10 g/L pepton, 10 g/L maya özütü, 8 mM KH_2PO_4, 12 mM K_2HPO_4 içerecek ve pH 5 dereceye eşitlenecektir. 120°C'de 20 dakika otoklavlanarak terilize edilen besiyeri cam kaplara bölünecek ve Besiyerinin üzerinde 1/10 oranında inokulum eklenecektir. İnokulumların bakteriyel selüloz sentezlemesi için 30°C'de 7 gün inkübasyona bırakılacaktır. Sentezlenen bakteriyel selülozlar 1 M NaOH içeren 80°C sıcaklıkta distile su içerisinde bekletilerek yıkanacaktır [56].

3.2.2 Bakteriyel Selüloz Karakterizasyonu

3.2.2.1 Yüzey Morfoloji Analizi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), morfoloji karakterizasyonlarının analizi için elektron ışınlarından yararlanılan bir araçtır. SEM, elektron ışınları ile numune yüzeyini tarayarak sinyaller oluşturur. Bu sinyaller daha sonra katot ışın tüpünde görüntülenen sinyale dönüştürülmektedir. Numune yüzeyinin birincil elektronlarla etkileşimiyle numunenin iyonizasyonu sağlanmaktadır. Numune atomlarının

iyonlaşması ile numunedeki sıkı bağlı olmayan elektronlar yayılabilir. Bunlar ikincil elektronlar olarak adlandırılmaktadır. İkincil elektronlar topografik bilgi sağlayarak numunenin görüntülenmesini sağlamaktadır. Daha sonra bir sinilatör elektron enerjisini görünür sinyallere dönüştürür. İkincil elektronlar SEM'de topografik bilginin elde edilmesi için kullanılmaktadır [57].

Bakteriyel selülozların yüzey morfoloji analizi SEM (Zeiss, EVO® LS 10) ile yapılmıştır. Bakteriyel selülozların yüzeyi 75 saniye boyunca 10 mA akım altında 1kV potansiyel uygulanıp 'Spotter coater' cihazı kullanılarak altın kaplanmaları gerçekleştirilmiştir. İkincil elektron kaynağı olarak LaB6 flaman kullanılmış ve ikincil elektronların dedektör ile saptanması ile yüzey analizi yapılmıştır. SEM analizi ile bakteriyel selülozun morfolojik yapısı incelenmiştir [56]

3.2.2.2 Termogravimetrik Analiz

Termogravimetrik (TG) analiz, bir polimerin kütlesinin kontrollü bir atmosferde sıcaklığın ve zamanın fonksiyonu olarak ölçülmesine dayanan bir yöntemdir. Bir maddenin bozunma sıcaklığını tespit etmek için bu yöntem kullanılabilmektedir. TG ölçümde kullanılan atmosfer azot ve helyum gibi inert, oksijen gibi oksitleyici veya indirgeyici özellikte olabilmektedir. TG analizlerde sıcaklık aralığı 1000 ve üzerinde derecelerde olabilmektedir [58,59]. TG ölçümlerinin sonucu genellikle TGA eğrisi olarak gösterilmektedir. TGA eğrisi yüzde kütlenin sıcaklık ve/veya zamana karşı değişimini göstermektedir.

TG/DTA cihazları termogravimetrik analizle birlikte diferansiyel termal analiz (DTA) ölçümünü de yapmaktadır. DTA, kütlede herhangi bir değişim oluşturmayan termal etkileri de gösterebilmektedir [58].

Üretilen bakteriyel selülozların TG/DTA analizi ile termal özellikleri ölçülmüştür. Numuneler alüminyum penlere yerleştirilmiştir. Daha sonra numuneleri kütle kaybı dinamik bir hava ve azot atmosferinde dakikada 10°C ısıtma hızı ile takip edilmiştir. Ölçüm 90 dakikada tamamlanmış ve 25°C-1000°C aralığında gerçekleştirilmiş.

3.2.2.3 Bakteriyel Selülozun Kimyasal Karakterizasyonu

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, Fourier dönüşümü ile ıığın infrared yoğunluğa karşı dalga sayısını ölçen organik, inorganik ve polimerik malzemelerin tanımlanmasında kullanılan kimyasal analitik bit yöntemdir [60,61,

62]. Kızıl ötesi bölgesi (14000 cm^{-1} ve 10 cm^{-1}) yakın, orta ve uzak dalga boylu olmak üzere üç ana bölgeye ayrılmaktadır. Orta boylu kızıl ötesi (MIR) bölgesi ışık dizisinde 4000-400 cm^{-1} aralığındadır. MIR bölgesi organik bir maddenin 'fonksiyonel gruplar' olarak adlandırılan 3600-1200 cm^{-1} bölgesini ve parmak izi bölgesi olarak tanımlanan 1200-700 cm^{-1} aralığını içermektedir. Organik moleküllerin parmak izlerinin farklı olması nedeniyle bu bölgeden alınan absorpsiyon pikleri maddelerin tanımlanmasına, moleküldeki yapısal ve bileşim değişikliklerinin incelenmesinde kullanılmaktadır [62].

FTIR spektrometresi kızıl ötesi ışık kaynağı, numune hücresi, ışın ayırıcı, dedektör, hareketli/sabit aynalardan ve dönüşümünün yapıldığı bir bilgisayardan oluşmaktadır. Kızılötesi ışık kaynağından gelen ışınlar ışın ayırıcıdan yansıyarak veya ışın ayırıcıdan geçerek aynalara ulaşıp ışın ayırıcıya geri yansıtılırlar. Işın ayırıcıdan geçerek numuneye ve daha sonra detektöre ulaşmaktadır. Detektöre ulaşan sinyal dijital bir sinyale dönüştürülür ve Fourier dönüşümünün gerçekleştirildiği bilgisayara aktarılmaktadır [61]. Elde edilen sonuç moleküllerdeki farklı bağlardan kaynaklanan farklı titreşim frekanslarını ve numunelerin parmak izlerini temsil eden 4000 ila 400 cm^{-1} aralığındaki spektrumları ifade etmektedir [61,62].

3.2.2.4 Bakteriyel Selülozun Su Tutma Analizi

Bakteriyel selülozların yara örtü malzemesi vve doku yaması olarak tercih edilmesinin nedeni su tutma kapasitelerinin fazla olmasıdır. Elde ettiğimiz bakteriyel selülozların su tutma kapasitelerinin analizi için şişme testi gerçekleştirilmiştir. Üretilen bakteriyel selülozların ilk olarak kuru ağırlıkları ölçülmüştür ve daha sonra distile su içerisine konulmuştur. Distile suda 2 saat bekletilen bakteriyel selülozlar buradan alınıp yüzeyindeki su Kim mendil kağıdına emdirilmiştir. Bakteriyel selülozaların ıslak ağırlıkları da hasssas terazi ile ölçülmüştür. Su tutma kapasitesini ölçmek için yapılan bu işlem 5 farklı numune için tekrarlanmıştır. Bakteriyel selülozların su tutma kapasiteleri yüzde olarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır [56].

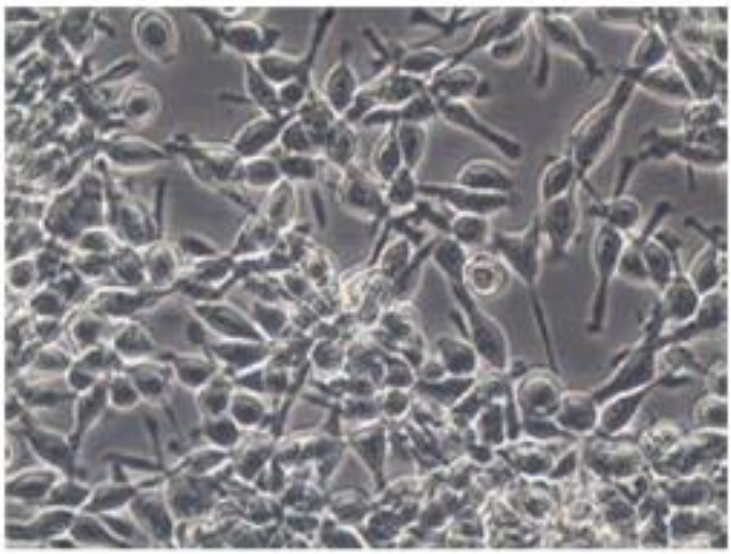
$$Şişme(\%) = (W_h - W_d) / W_d$$

W_h: Islak BS ağırlığı, W_d: Kuru BS ağırlığı

3.2.3 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü ökaryotik veya prokaryotik hücrelerin gerekli fizyolojik şartlarda in vitro ortamda çoğalmasını sağlayan laboratuvar tekniklerini ifade etmek için kullanılmaktadır. Hücrelerin büyümesi, farklılaşmasına ve çoğalması için katı veya sıvı formda besin karışımı, serum, çeşitli iyonlar ve hormonlar gibi beslenme faktörleri içeren uygun kültür ortamlarının oluşturulması gerekmektedirYeni izole edilmiş ve pasajlanmamış hücreler birincil kültürler olarak bilinmektedir. Birincil kültür hücreleri dokulardan izole edilerek elde edilmektedirler. Alt kültürler ise birincil kültürden alınan yeni kültürlerdir. Hücreler kültür ortamında farklı büyüme özellikleri gösterebilirler. Adherent hücreler büyüme ortamında yüzeye tutunarak büyüyüp üremektedir. Süspanse hücreler ise büyüyüp çoğalmak için herhangi bir yüzeye tutunma ihtiyacı duymamaktadır. Hücre kültürü çalışmaları çok çeşitli hücre gruplarının in vitro araştırılmasını sağlayan kanser araştırmaları, aşı üretimi, gen tedavisi gibi pek çok araştırma alanında kullanılan temel tekniklerdir [63].

HEK293 hücreleri (Şekil 3.1) ilk olarak 1973 yılında Hollandalı biyolog Alex Van der Eb tarafında insan embriyonik böbrek kültürlerinin adenovirüs 5 DNA'sı ile transfeksiyonu ile üretilmiştir. Hücreler fetüsten alınan insan böbrek hücreleridir ve 293. Deneyde izole edilmelerinden kaynaklı olarak bu ismi almışlardır. Bu tez çalışmasında yapılan hücre kültürü çalışmaları HEK293 hücreleri kullanılarak yapılmıştır ve hücre tutunma çalışmalarını içermektedir.



Şekil 3.1 HEK293 hücre hattı [64]

3.2.3.1 Hücre Tutunma Çalışmaları

İn vitro olarak hücre canlılığını ve proliferasyonunu incelemek için çok çeşitli analiz yöntemleri geliştirilmiştir. En sık kullanılan testlerden biri ise bir tetrazolyum tuzu olan (3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ile yapılan testtir. MTT testi kolorimetrik bir testtir. MTT sarı renkli bir tetrazolyum tuzudur ve suda çözünebilmektedir. Canlı hücrelerdeki mitokondriler içerisinde dehidrojenazlar ve indirgeyici ajanlarla indirgenen MTT, formazana dönüştürülür. Formazan yalnızca canlı hücrelerde birikmektedir. Formazan suda çözünmeyen ve mor renkli bir bileşiktir. Formazan daha sonra çözdürülüp optik yoğunluk ile konsantrasyonu belirlenir. Formazanın optik yoğunluğunun canlı hücre sayısı ile orantılı olmasıyla hücre canlılığı ve proliferasyonu ölçülmektedir [65].

HEK293 hücre hattı kullanılarak yapılacak olan hücre tutunma çalışmaları için öncelikle %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 Strepromisin içeren DMEM High Glucose besi yerinde 37°C' de, %5 CO_2 atmosferde kültürlenmiştir. Bakteriyel selüloz membranlar 1cm2'lik boyutlarda kesilmiştir. Kesilen memranlar üzerine inkübe edilen HEK293 hücreleri 500 hücre/ membran konsantrasyonunda 24 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve 37°C' de, %5 CO_2 atmosferinde kültürlenmiştir. Hücre ekiminden 1, 3 ve 5. Günlerden sonra membranlara yapışan ve kültüre olan hücrelerin konsantrasyonunu belirlemek için membranlar platten alınarak başka bir 24 kuyucuklu plaklara aktarılmıştır. Kuyucuklara 50 µL MTT çözeltisi (25mg/mL, PBS

ile) içeren 500µL taze vasat pipetlenmiştir. 4 saat inkübasyondan sonra kuyucuklardaki vasat atılarak kuyucuklara 100µL DMSO çözeltisi (distile su içerinde %10 DMSO) ilave edilmiştir. DMSO ile çözülen formazan kristallerinin optik yoğunluğu 570 nm'de absorbansına bakılarak hücre canlılıkları değerlendirilmiştir.

4
SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Bakteriyel Selülozların Sentezlenmesi

200 ml inokulum besi yeri hazırlanması için 5 g glikoz, 0,6 g pepton, 1 g maya özütü tartılarak erlene aktarılmıştır. Besi yeri 200 ml olacak şekilde erlene distile su eklenmiştir. Hazırlanan besi yerinin pH derecesini 5.04'e indirecek kadar HCl eklenmiştir. Besi yeri 120°C sıcaklıkla 20 dakika otoklav cihazında sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığına gelen besi yerine *A. xylinum* bakterisi eklenmiş ve 30° C'de 150 rpm'de 48 saat boyunca inkübe edilerek inokulum oluşumu gözlemlenmiştir.

Bakteriyel selüloz üretimini sağlayan besi yerini hazırlamak için 4 g glikoz, 2 g pepton, 2 g maya özütü, 0,2 g KH_2PO_4 ve 0,4 g K_2HPO_4 tartılarak erlene aktarılmıştır. 200 ml besi yeri elde etmek için distile su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan besi yerinin pH derecesi 5'e eşitlenmiş ve 120°C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığına gelen besi yeri cam kaplara her birinde 50 ml olacak şekilde aktarılmıştır. Daha sonra besi yerine 1/10 oranında (5 ml) inokulum eklenmiştir. 30°C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmış ve bakteriyel selüloz oluşumu sağlanmıştır. Bakteriyel selüloz membranlar sterilizasyonları için 1M NaOH içeren 80°C sıcaklıktaki distile su ile pH derecesi 7 olana kadar yaklaşık 2 saat boyunca yıkanmıştır. Bakteriyel selülozlar liyofilizasyon ile kurutulmuşlardır.

4.2 Bakteriyel Selülozların Karakterizasyonu

Sentezlenen bakteriyel selüloz membranların karakterizasyonu için yüzey morfoloji analizi, termogravimetrik analiz, FTIR spektroskopisi ve su tutma analizi uygulanmıştır.

4.2.1 Yüzey Morfoloji Analizi

Bakteriyel selülozların morfolojik özelliklerinin incelenmesi için SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Bakteriyel selüloz membranlar 75 saniye boyunca altın ile kaplandıktan sonra yüzey morfolojileri 1000x- 100000x büyütme oranlarında SEM

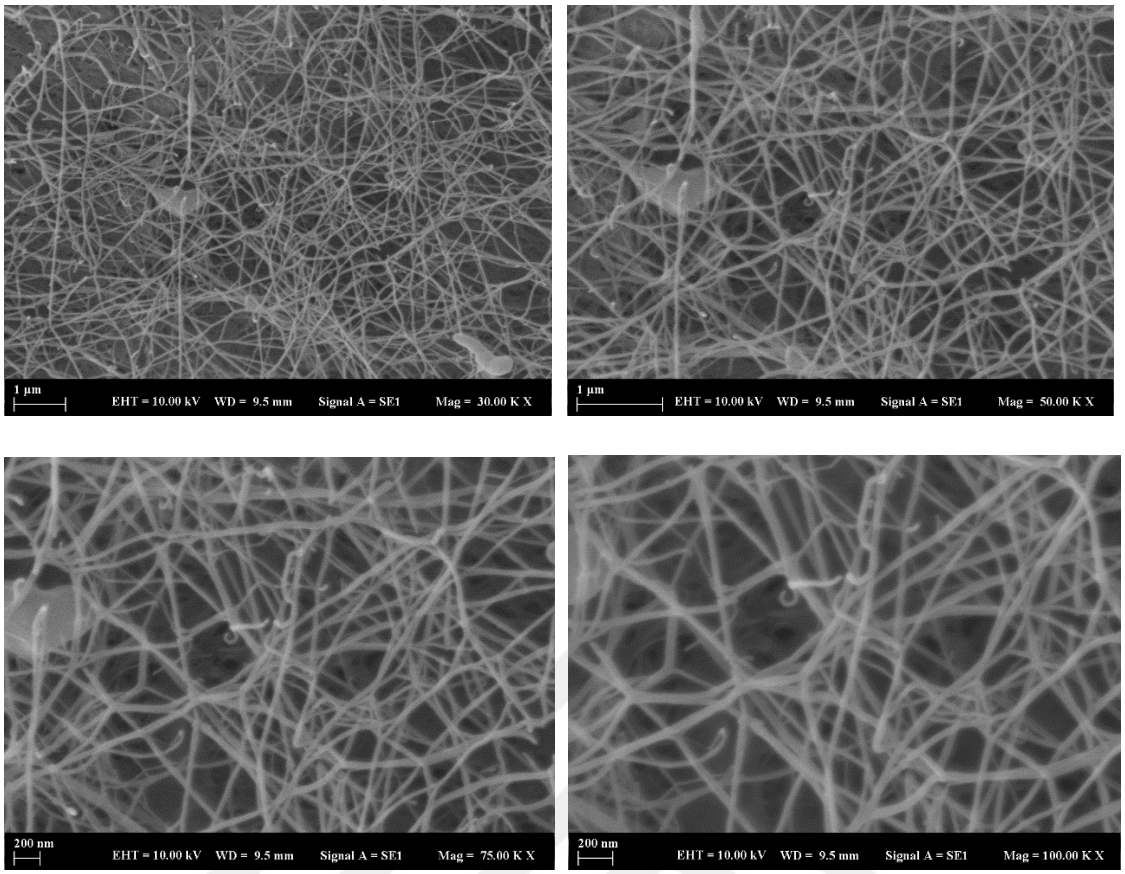
ile incelenmiştir. SEM analizi sonucunda üretilen bakteriyel selüloz fibrillerinin çaplarının 41.91- 46.44 nm arasında olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).

Bakteriyel selüloz fibril yapısı sayesinde mekanik mukavemete ve su tutma kapasitesine sahip bir biyomalzemedir. Bu nedenle elde edilen bakteriyel selüloz membranların ince fibrillere sahip olması beklenmektedir. Bakteriyel selülozu oluşturan fibrillerin çapları inceldikçe biyomalzemenin gözenek yapısı, yüzey alanı, su tutma kapasitesi ve mekanik özellikleri artmaktadır [66].

Peseran ve ark. 2015 yılında yaptıkları çalışmada *Gluconacetobacter xylinum* bakteri ile bakteriyel selüloz elde etmişlerdir. Elde ettikleri bakteriyel selülozların yüzey morfoloji analizleri sonucu selüloz nanoliflerinin çapları 30-70 nm arasında ölçülmüştür [67].

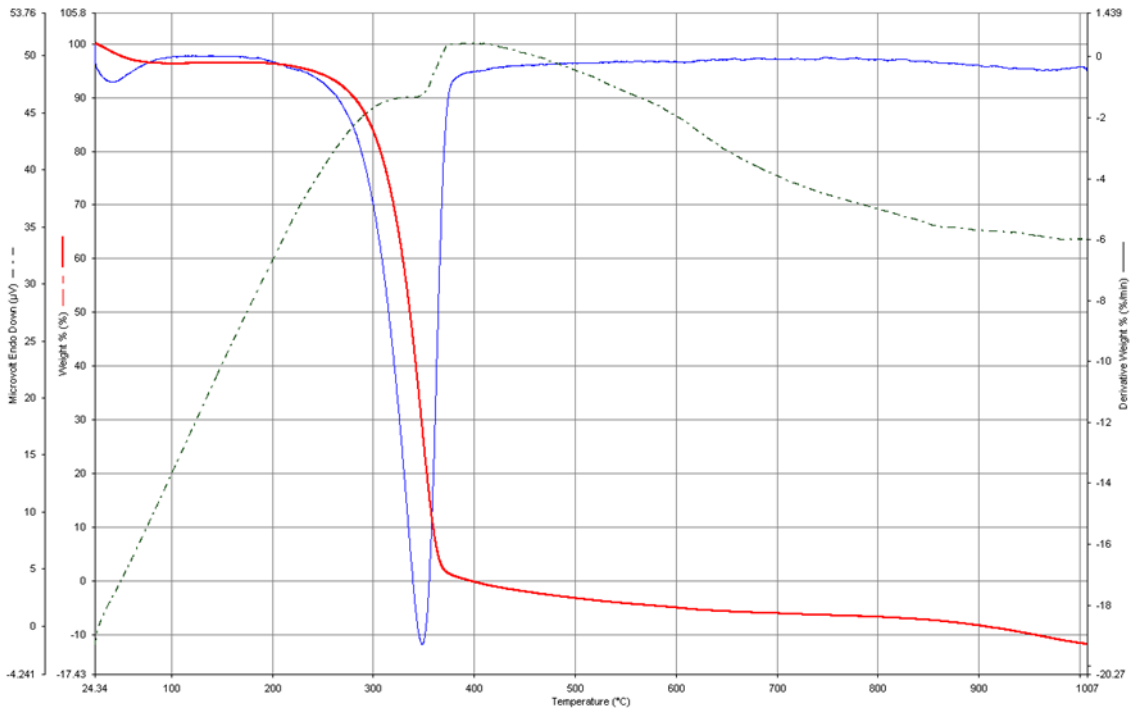
Güzel ve ark. 2017 yılında yaptıkları çalışmada *Komagataeıbacter hansenıı* bakterisi ile elde ettikleri bakteriyel selülozların lif çaplarının ortalamasının 73.63 nm olduğunu SEM analizi sonucu tespit etmişlerdir [68].

Bu çalışmaların sonuçları incelendiğinde elde ettiğimiz bakteriyel selülozun fibril çaplarının istenilen değerlerde olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1 Bakteriyel selülozun SEM analizi sonu elde edilen görüntüler

4.2.2 Termogravimetrik Analiz

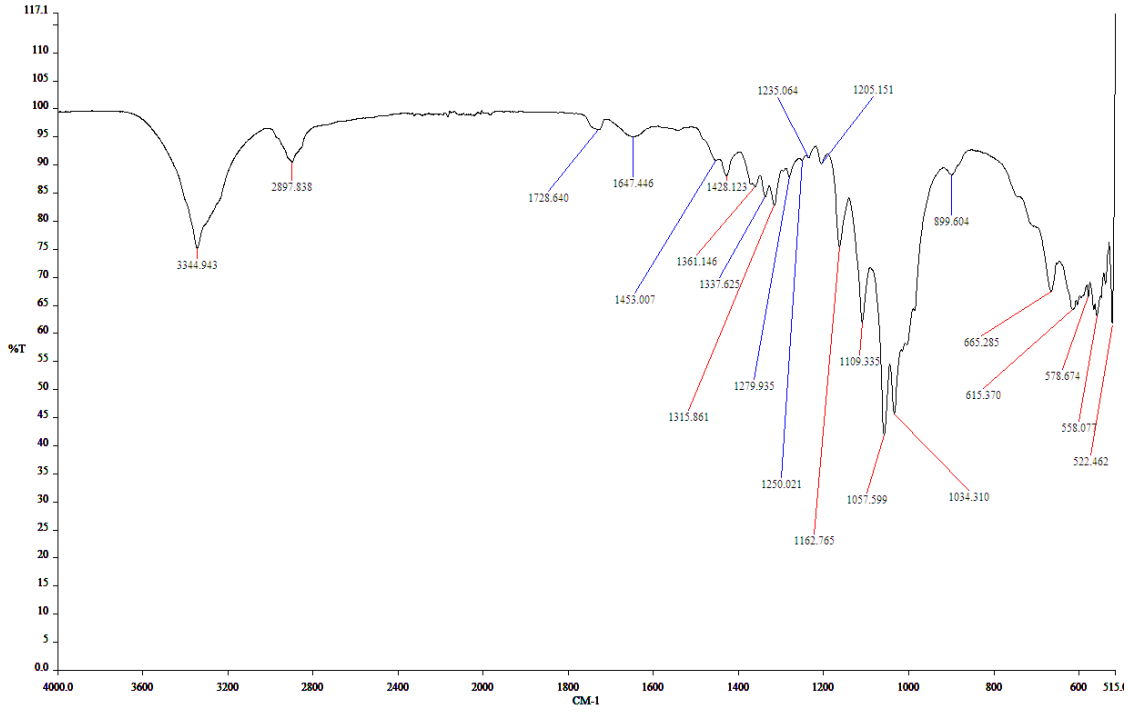


Şekil 4.2 Üretilen bakteriyel selülozun TG analizi

Biyomalzeme olarak tedavi amaçlı kullanılacak olan malzemelerin yüksek sıcaklık ile sterilizasyonu gerekebilmektedir ve bu nedenle de sıcaklık karşısında gösterdikleri davranışlar önemlidir. Üretilen bakteriyel selülozların sıcaklıkla ilişkili bozunma davranışlarının incelenmesi için TG analiz yapılmıştır (Şekil 4.2). Analiz sonucunda ana kütle kaybının 300°C civarında yaşandığı gözlemlenmiştir. Sıcaklık 380°C olduğunda ise kütle kaybı %99,12'dir. Literatürdeki bakteriyel selülozla ilgili çalışmalar incelendiğinde az miktardaki ilk kütle kayıplarının yapıdaki suyun ayrılmasıyla gerçekleştiği, bozunmanın ise 350°C'den sonra başladığı bildirilmiştir [69,70].

Erçalışkan 2017 yılında yaptığı çalışmasında *Komagateibacter intermedius* ve *Komagataeibacter xylinum* bakterilerini kullanarak bakteriyel selülozları üreterek bunların TGA analizlerini yapmıştır. iki farklı kaynaktan elde edilen bakteriyel selülozlar 30-100°C arasında ufak kütle kayıpları yaşanmıştır ve kütle kaybı 190°C'ye kadar sabit kalmıştır. Ana kütle kaybının ise *K. intermedius* için 330°C ve *K. xylinus* için 316,5°C olarak ölçülmüştür [71]. Bu çalışmalardaki sonuçlar incelendiğinde bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları destekler yönde olduğu görülmektedir.

4.2.3 Bakteriyel Selülozun Kimyasal Karakterizasyonu



Şekil 4.3 Bakteriyel selüloz karakterizasyonu için yapılan FTIR spektrumu

FTIR spektroskopisi sonucu oluşan spektrum incelendiğinde oluşan piklerin bakteriyel selüloz için karakteristik pikler olduğu görülmüştür. Oluşan pikler 3344 cm^{-1} O-H gerilme piki, 2897 cm^{-1} C-H gerilme piki, 1428 cm^{-1} C-H_2 eğilme piki, 1315 cm^{-1} C-H eğilme piki, 1162 cm^{-1} C-O-C asimetrik gerilme piki ve 1037 cm^{-1} dalga sayısında C-O gerilme pikidir (Şekil 4.3).

Gökhan Gündüz ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışmada *Glucaonacetobacter hansenii* bakterisini kullanarak bakteriyel selüloz elde etmişlerdir. Elde ettikleri bakteriyel selülozun karakterizasyonu için gerçekleştirdikleri FTIR spektroskopisi sonucunda 3346 cm-^{1}, 2895 cm^{-1}, 1417 cm-^{1}, 1311 cm^{-1}, 1161 cm -^{1}, 1056 cm $^{-1}$, 1033 cm^{-1} piklerini elde ettiklerini göstermişlerdir [72].

2012 yılında Naia Halib ve ark. nata de coco kullanarak elde ettikleri bakteriyel selülozların FTIR analizleri selüloz için karakteristik olan 3440 cm^{-1}, 2926 cm-^{1}, 1300 cm^{-1}, 1440 cm^{-1}, 1163 cm-^{1} ve 1040 cm-^{1} piklerini vermiştir [73]. Öz ve ark. ise 2017 yılında yaptıkları çalışmada HS besiyerinde *Glucaonacetobacter xylinum* bakterisinin ekimini yaparak bakteriyel selüloz üretmişlerdir. Ürettikleri bakteriyel

selülozun FTIR analizinde 3400 cm^{-1} pikinde -OH gerilme titreşim piki, 2900 cm^{-1} dalga boyuna gelen C-H bağının absorpsiyon piki,1430 cm^{-1} metil ve 1367 cm^{-1} CH_2 eğilme pikleri gösterilmiştir [74]. Literatürde incelene bu çalışmalar bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. Elde ettiğimiz bakteriyel selülozların saf selülozla ve literatürde bulunan diğer bakteriyel selüloz örnekleri ile aynı karakteristik pikleri verdiği görülmüştür.

4.2.4 Bakteriyel Selülozların Su Tutma Kapasitesi

Bakteriyel selülozların su tutma kapasitesinin incelenmesi için 5 farklı numunenin önce kuru ağırlıkları tartılmıştır. Ağırlıkları 1 mg ile 3.1 mg arasında değişen numuneler daha sonra ise 2 saat distile suda bekletildikten sornaki ıslak ağırlıkları tartılmıştır. Daha önce gösterilen formül ile su tutma yüzdeleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Bakteriyel selülozlar numunelerinin su tutma yüzdeleri

Numune Numarası	Kuru Ağırlık(g)	Islak Ağırlık(g)	Su Tutma Yüzdesi (%)
1	0,0010	0,0164	15,4
2	0,0019	0,0301	14,8
3	0,0020	0,0103	4,15
4	0,0031	0,0247	6,96
5	0,0010	0,0262	25,2

Elde edilen sonuçlara göre bakteriyel selülozların su tutma kapasitelerinin 2 saat sonunda ortalama %13,3 $\pm$ 8,2 olarak hesaplanmıştır.

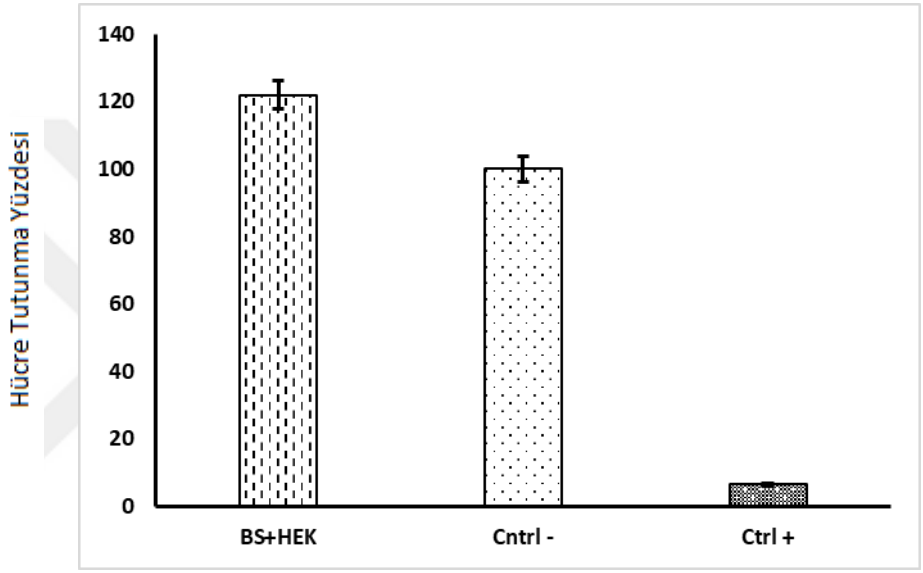
Siddhan ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada *Acetobacter xylinum* bakterisini kullanarak biyosentezini gerçekleştirdikleri bakteriyel selüloz ile bitkisel selülozun su tutma kapasitelerini karşılaştırmışlardır. Bakteriyel selülozlardaki ağırlık artışlarını suya doydukları anda, damlatma sonrasında ve kurutma sonrasında ölçmüşlerdir. Bakteriyel selülozların kurutma sonrası su tutma kapasitelerinin %25 olduğu, bitkisel selülozların ise %7,6 olduğunu göstermişlerdir [75]. Literatürde bulunan bir başka çalışmada Gayathry ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada

Acetobacter xylinum bakterisi kullanarak elde ettikleri bakteriyel selülozun su tutma kapasitesini %84 olarak ölçmüşlerdir [76].

Litertürdeki bu çalışmalarla karşılaştırıldığında yaptığımız deneyler sonucu elde ettiğimiz bakteriyel selülozun bitkisel selülozdan daha yüksek su tutma kapasitesine sahip olduğunu gösterilmiştir.

4.3 Hücre Kültürü Çalışmaları

4.3.1 Hücre Tutunma Çalışmaları



Şekil 4.4 Bakteriyel selüloz üzerinde HEK293 hücre hattının tutunma oranı

Daha önce laboratuvarımızda toksisitesi bilinen yöntemle elde etiğimiz bakteriyel selülozların üzerinde HEK293 hücre hattı kullanılarak yapılan hücre tutunma çalışmaları ile hücrelerin bakteriyel selüloz üzerinde tutunma kapasitelerinin ve çoğalmalarının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Üretilen bakteriyel selüloz membranlar 1cm^2'lik boyutlarda kesilmiştir ve kesilen memranlar üzerine inkübe edilen HEK293 hücreleri 500 hücre/membran konsantrasyonunda 24 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Bakteriyel selülozlar 37°C' de, %5 CO_2 atmosferinde inkübe edilmiştir. Hücre tutunmasını tespit etmek için MTT testi uygulanmıştır. Yapılan hesaplamalarda hücre tutunmasının %122 olduğu ve bakteriyel selüloz üzerinde hücre tutunmasının negatif kontrole göre %22 ($\pm$9,8) daha fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 4.4). Bakteriyel selüloz temelli doku yamasının hücre

tutunmasını desteklediği ve kontrol grubuna göre tutunma oranını arttırdığı gözlemlenmiştir.

Ürkmez ve ark. 2017 yılında doku mühendisliği alanında yaptıkları çalışmada farklı hidrojel tipleri üzerinde keratinosit tutunmasını incelemişlerdir. MTT analizi sonucunda keratinostilerin farklı hidrojellerde iki boyutlu kontrollerle karşılaştırıldığında %50'den fazla tutunduğunu gözlemlemişlerdir [77].

Literatürdeki bir başka çalışmada ise Capan ve ark. bitkisel yağ bazlı bir monomer olan akrillenmiş metil risinoleat kullanarak hidrojel üretimini gerçekleştirmişler ve bu hidrojel üzerinde HEK293 ve Cos-7 hücre hatlarının tutunmasını incelemişlerdir. MTT analizi ile ölçülen hücre tutunmasının hem HEK293 hem de Cos-7 hücre hattı için en az %70 olarak belirtilmiştir [78].

Ramezani ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada HEK293 hücre hattınınn kitosan, kitosan-gelatin hidrojelleri ve altın nanoparçacık-kitosan nanokompoziti üzerindeki tutunmasını incelemişlerdir. Hücrelerin canlılık oranları kontrol grubu için %50, kitosan ve kitosan/gelatin hidrojeli için yaklaşık %40 ve GNP- CHIT nanokompoziti için %90 civarında ölçülmüştür [79].

Loh ve ark. ise 2018 yılında yara örtü malzemesi olarak kullanılmak amaçlı üretilen bakteriyel selüloz temelli hidrojelde keratinosit ve fibroblast tutunmasını incelemişlerdir. Bakteriyel selüloz ve akrilik asit kompoziti olarak üretilen BC/AA hidrojelin üzerine ekilen fibroblast ve keratinosit hücrelerinin tutunma oranlarını 1. ,4. ve 6. saatlerde gözlemlemişlerdir. Deney sonucunda fibroblastların hidrojele tutunma oranını %84 ve keratinositlerin tutunma oranını ise %82 olarak bildirmişlerdir [80].

Hidrojeller yapıları gereği hücre tutunmasını destekleyen doğal ECM benzeri yapılardır. Literatürdeki bu çalışmalar ve bizim yaptığımız çalışma da hidrojellerin bu özelliğini desteklemektedir.

Biyomalzemeler, hasarlı doku ve organların onarılması amacıyla kullanılan biyouyumlu malzemelerdir. Doğal kaynaklı bir biyomalzeme olan bakteriyel selüloz bir hücre dışı polisakkarittir ve yapısındaki özel nanolifler sayesinde hidrojel özelliğine sahiptir. Hidrojel yapıdaki bu özel membran, biyouyumluluk, esneklik ve hidrofiliklik gibi özelliklerinin yüksek olması nedeniyle hedef dokular ile uyumluluk

sağlayabilmekte ve biyomalzeme olarak yaygın olarak tercih edilmektedir. Sunulan tez çalışmasında uygun morfolojik özelliklere sahip bakteriyel selüloz elde edilmiştir. Daha sonra, bakteriyel selüloz temelli doku yaması üzerinde kök hücre tutunmasında model olarak, HEK293 insan embriyonik böbrek hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerin hidrojel yapıdaki membrana başarıyla tutunduğu gözlemlenmiştir. Bakteriyal selüloz yapıdaki doku yaması, model kök hücre hattının üzerine yüklenebilmesi sayesinde, birçok farklı dokunun rejenerasyonu için potansiyel bir biyomalzeme olmaktadır ve farklı dokuların onarımı amacıyla yapılacak birçok çalışmanın önünün açmaktadır.

KAYNAKÇA

[1] S. Bose, A. Bandyopadhyay, "Introduction of Biomaterials" in Characterization of Biomaterials, Amsterdam, Hollanda: Elsevier, 2013, ch. 1, 1-9.

[2] F. Esa, S.M. Tasirin, N.A. Rahman, "Overview of bacterial cellulose production and application" Agriculture and Agricultural Science Procedia, vol. 2, pp. 113-119, 2014.

[3] Y. Xu, C. Chen, P.B. Hellwarth, X. Bao, "Biomaterials for stem cell engineering and biomanufacturing", Bioactive Materials, vol. 4, pp. 366-379, 2019.

[4] S.M. Willerth, S.E. Sakiyama-Elbert, "Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery", Journal of StemJournal, vol. 1, pp. 1-25, 2019.

[5] Z.D. Çırak, D.B. Yakıncı, "Tıbbi uygulamalarda kullanılan biyouyumlu malzemeler", İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi, vol. 8, pp. 515-526, 2020.

[6] N. Huebsch, D.J. Mooney, "Inspiration and application in the evolution of biomaterials", Nature, vol. 462, pp. 426-432, 2009.

[7] M. Gümüşderelioğlu, "Biyomalzemeler", Bilim Teknik Dergisi, pp. 1-23, Temmuz 2002.

[8] V. dos Santos , "Engineering of Biomaterials", Springer International Publishing, 2017 , ch.2, pp. 5-15.

[9] F.J. O'Brien, "Biomaterials and scaffolds for tissue engineering", Materialstoday, vol. 14, pp. 88-95, 2011.

[10] D.S. Kohane, R. Langer, "Polymeric biomaterials in tissue engineering", Pediatric Research, vol. 63, pp. 487-491, 2008.

[11] S.G. Sukaryo, A. Purnama, H. Hermawan, "Structure and properties of biomaterials", Biomaterials and Medical Devices, pp. 1-22, 2016.

[12] A.K. Gür, M. Taşkın, "Metalik biyomalzemeler ve biyouyum", Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları, pp. 106-113, 2004.

[13] A.T. Güner, C. Meran, “Ortopedik implantlarda kullanılan biyomalzemeler”, Pamukkale University Journal of Engineering Sciences, vol.26, no. 1, pp.54-67, 2020.

[14] R. Narayan , “Biomedical Matrials”, Springer Nature Switzerland, 2021, pp. 101-137.

[15] A. Boccaccini, P.X. Ma, “Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers”, Woodhead Publishing, pp. 3-31, 2014.

[16] X. Tang, S.K. Thankappan, P. Lee, S.E. Fard, M.D. Harmon, K. Tran, X. Yu, “Polymeric Biomaterials in tissue engineering and regenerative medicine”, Natural and Synthetic Biomedical Polymers, pp. 351-371, 2014.

[17] L.A.L. dos Santos, “ Natural polymeric biomaterials: Processing and properties”, Reference ModuleinMaterialsScienceandMaterialsEngineering, pp.1-6, 2017.

[18] R. De Santis, V. Guarino, L. Ambrosio, “Bone Repair Biomaterials”, Elsevier, 2019, pp. 273-299.

[19] J. Park, R.S. Lakes, “Biomaterials: An Introduction”, Springer 2007, ch. 8, pp. 207-224.

[20] A. Patel, K. Mequanint, “Biomedical Engineering – Frontiers and Challenges”, InTech, pp. 275-296, 2011.

[21] P.B. Mohite, S.S. Adhav, “A hydrogels: Methods of preparation and applications”, International Journal of Advances in Pharmaceutics, vol. 6, no. 3, pp. 79-85, 2017.

[22] J. Kopecek, J. Yung, “Hydrogels as smart biomaterials”, Polymer International, vol. 56, pp. 1078-1098, 2007.

[23] A. Ulusoy, N. Dikmen, “Hidrojellerin tıpta kullanımı”, Archives Medical Review Journal, pp. 129-137, 2020.

[24] V. K. Thakur, M. K. Thakur, “Hydrogels, Gels Horizons: From Science to Smart Materials”, Springer Nature, 2018, ch. 2, pp. 29-50.

[25] S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, E. Schacht, “Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review”, Biomolecules, vol.12, pp. 1387-1408, 2011.

[26] E.M. Ahmed, “Hyrogel: Preparation, characterization, applications: a review”, Journal of Advanced Research, vol. 6, pp. 105-121, 2015.

[27] E. Calo, V.V. Khutoryanskiy, “Biomedical applications of hydrogels: a review of patents and commercial products”, European Polymer Journal, vol. 65, pp. 252-287, 2015.

[28] N. Chirani, L. Yahia, F.L. Motta, S. Chirani, S. Fare, “History and applications of hydrogels”, Journal of Biomedical Sciences, vol. 4, pp. 1-23, 2015.

[29] S.B. Majee (ed), “Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels”, Intech, pp. 9-38, 2016.

[30] A.H. Asif, M. Rahman, P. Sarker, Z. Hassan, “Hydrogel fibre: Future Material of interest for biomedical applications”, Journal of Textile Science and Technology, vol. 5, pp. 92-107, 2019.

[31] S. Tavakoli, A. S. Klar, “Advanced hydrogels as wound dressing”, Biomolecules, pp. 2-20, 2020.

[32] J. Wang, J. Tavakoli, Y. Tang, “Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods- a review”, Carbohydrate Polymers, pp. 63-76, 2019.

[33] V. Raghavendran, E. Asare, I. Roy, “Advances in Microbial Physiology”, Elsevier, vol. 77, pp. 89-138, 2020.

[34] R. Narayan, “Encyclopedia of Biomedical Engineering”, Elsevier, 462-482, 2019.

[35] S.M. Keshk, “Bacterial cellulose production and its industrial applications”, Journal of Bioprocessing & Biotecniques, vol. 4, no. 2, pp. 1-10, 2014.

[36] S. Gorgieva, J. Trcek, “Bacterial cellulose: production, modification and perspectives in biomedical applications”, Nanomaterials, vol. 9, no. 1352, pp. 1-20, 2019.

[37] L. Bacakova, J. Pajorova, M. Bacakova, A. Skogberg, P. Kallio, K. Kolarova, V. Svorcik, “ Nanocellulose in biotechnology and medicine: focus on skin tissue engineering and wound healing”, Nanomaterials, vol.9, no. 164, pp. 1-50, 2019.

[38] J.M. Rajwade, K.M. Paknikar, J.V. Kumbar, “Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine”, Appl Microbiol Biotecnol, 2014.

[39] M. Ul-Islam, S. Khan, W.A. Khattak, M.W. Ullah, J.K. Park, "Eco-friendly Polmer Nanocomposites, Advanced Structured Materials", Springer, pp. 399-437, 2015.

[40] G.F. Picheth, C.L. Pirich, M.R. Sierakowski, "Bacterial cellulose in biomedical applications: a review", International Journal of Biological Macromolecules, vol. 104, pp. 97-106, 2017.

[41] S. Swingker, A. Gupta, H. Gibson, M. Kowalczuk, "Recent advances and applications of bacterial cellulose in Biomedicine", Polymers, vol. 13, pp. 1-29, 2021.

[42] T. Karaşahin, "Embriyonik Kök Hücreler", Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg., vol.9, pp. 65-71, 2012.

[43] M. Kıvanç, Ş. Öztürk, S. Gökalp, İ. Özdemir, İ. Tuğlu, "Adipoz Kaynaklı Kök Hücreler ve Uygulama Alanarı", Cukurova Medical Journal, vol. 40, pp. 399-408, 2015.

[44] S. Tekeli, E.A. Naghavi, B. Gökçe, G. Sır, "Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları", FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi, vol. 1, pp. 72-83, 2016.

[45] H. Ören, "Kök Hücreler", DEU Tıp Derg, vol. 33, pp. 271-280, 2019.

[46] U. Ateş, "Kök hücreyi tanıyalım", FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi, vol. 1, pp. 19-28, 2016.

[47] E. Çerçi, H. Erdost, "Kök hücre", Ankara University Journal of Veterinary Sciences, vol. 14, pp. 221-228, 2019.

[48] H. Avcılar, B. Saraymen, O.Ö. Özturan, M.Y. Köker, "Embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler", Asthma Allergy Immunol, pp. 1-10, 2018.

[49] M.G. Worku, "Pluripotent and multipotent stem cells and current therapeutic applicatios: review", Stem Cell and Cloning: Advances and Applications, vol. 14, pp. 3-7, 2021.

[50] Ö. Şimşek, "Yetişkin kök hücrelerin dünü ve bugünü", Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, vol. 7, pp. 231-236, 2012.

[51] L. Bacakova, J. Zarubova, “Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells”, Biotechnology Advances, 2018.

[52] K. Takahashi, S. Yamanaka, “Introduction of pluripotent stem cells from Mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors”, Cell, vol. 126, pp. 663-676, 2006.

[53] V.K. Singh, M. Kalsan, N. Kumar, “Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery” Cell and Developmental Biology, vol. 3, pp. 1-18, 2015.

[54] H. Sevim, Ö.A. Gürpınar, “ İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ve uygulamaları”, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, pp. 5-9, 2012.

[55] M.S. Rao, N. Malik, “Assessing iPSC repogramming methods for their suitability in translational medicine”, J Cell Biochem, vol. 113, pp. 1-14, 2012.

[56] N.T. Laçin, “Development of biodegradable antibacterial cellulose based hydrogel membranes for wound healing”, International Journal of Biologicaal Macromolecules, vol. 67, pp. 22-27, 2014.

[57] W. Zhou, R.P. Apkarian, Z.L. Wang, D. Joy, “Fundamentals of scanning electron microscopy”, Scanning Microscopy for Nanotechnology, pp. 1-40, 2007.

[58] P. Gabbott, “Principles and applications of thermal analysis”, Blackwell Publishing, pp. 87-118, 2008.

[59] R.B. Prime, H.E. Bair, S. Vyazovkin, “Thermal Analysis of Polymers: Fundamentals and Applications”, John Wiley & Sons Inc, pp. 241-317, 2009.

[60] G.B. Kılıç, A.G. Karahan, “Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve laktik asit bakterilerinin tanısında kullanılması”, GIDA, vol. 35, pp. 445-452, 2010.

[61] D. Titus, E.J.J. Samuel, S.M. Roopan, “Characterization and Application of Nanoparticles” Elsevier Inc, pp. 303-319, 2019.

[62] T. Büyüksırıt, H. Kuleaşan, “Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve gıda analizlerinde kullanımı”, GIDA, vol. 39, pp. 235-241, 2014.

[63] O.O. Oyeleye, S.T. Ogundeji, S.I. Ola, O.G. Omitogun, " Basics of animal cll culture: Foundation for modern science", Academic Journals, vol. 11, pp. 6-16, 2016.

[64] Morphology of HEK293 Cells, Temmuz 2021. [Online]. Available: https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-morphology/morphology-of-293-cells.html.

[65] J.C. Stockert, R.W. Horobin, L.L. Colombo, A. Biazquez-Castro, "Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives" Acta Histochemica, vol. 120, pp. 159-167, 2018.

[66] Cheng, K.C., Catchmark , J.M., Demirci, A. "Effect of different additives on bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum and analysis of material property",Cellulose, vol. 16, pp. 1033- 1045, 2009.

[67] Peseran, M., Amobediny, Gh., Yazdian, F. "Effect of cultivation time and medium condition in production of bacterial cellulose nanofiber for urease immobilization", International Journal of Polymer Science, pp. 1-8, 2015.

[68] Güzel, A., Akpınar, Ö. "Komagataeibacter hansenii GA2016 ile bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu", The journal of Food, vol. 42, no. 5, pp. 620-633, 2017.

[69] S. Gea, C.T. Reynolds, N. Roohpour, " Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two-step purification process", Bioresource Technology, vol. 102, pp. 9105-9110, 2011.

[70]R.L. Oliviera, J.G. Vieira, H.S. Barud, "Synthesis and Characterization of Methylcellulose Produced from Bacterial Cellulose under Heterogeneous Condition", J. Braz. Chem. Soc., vol. 26, pp. 1861-1870, 2015.

[71] Erçalışkan,K., "Çeşitli kaynaklardan bakteriyel selüloz elde eden bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu", Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Bilecik, 2017.

[72] Gündüz, G., Aşık, N., Aydemir, D., Kılıç, A. "Bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu", Ormancılık Dergisi, pp. 1-10, 2015.

[73]Halib, N., Ahmad, I. “Physicochemical Properties and Characterization of Nata de Coco from Local Food Industries as a Source of Cellulose”, Sains Malaysiama, vol. 41, no. 2, pp. 205-211, 2012.

[74] Öz, Y.E. “Şeker pancarı melasından gluconacetobacter xylinus nrrl b-759 kullanarak farklı kültür teknikleri ile bakteriyel selüloz üretimi”, Fırat Üniversitesi, Elazığ, 2017.

[75] Siddhan, P., K. Sakthivel, H. Basavaraj. “Biosynthesis of Bacterial Cellulose imparting Antibacterial Property through Novel Bio-Agents”, Research Journal of Biotechnology, vol. 11, pp. 86-93, 2016.

[76] Gayathry, G., Gopalaswamy, G., “Production and characterisation of microbial cellulosic fibree from Acetobacter xylinum”, Indian Journal of Fibre&Textile Research, vol. 39, pp. 93-96, 2014.

[77] Ürkmez, A.Ş., Seçkin, U.D., Görgün, C., Uyanıkgil, Y. “Deri doku mühendisliği amaçlı üç boyutlu biyobaskı ve keratinosit kültürü”, Dicle Medical Journal, pp. 9-18, 2018.

[78] Capan, O.Y., Hatır, P.C., “Synthesıs, characterızatıon and bıocompatıbılıty of plant-oıl based hydrogels”, Trakya University Journal of Natural Sciences, vol. 22, no. 2, 2021.

[79] Ramezani, M.R., Naderi-Manesh, H. “Cytotoxicity assessment of a gold nanoparticle-chitosan nanocomposite as an effi cient support for cell immobilization: comparison with chitosan hydrogel and chitosan-gelatin” Biocell, vol. 38, pp. 11-16. 2014.

[80] Loh, EYX, Mohamad, N., Fauzi, B. “Development of a bacterial cellulose-based hydrogel cell carrier containing keratinocytes and fibroblasts for full-thickness wound healing”, Nature, vol.8, no. 2875, pp. 1-12, 2018.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Bakteriyel Selüloz Temelli Doku Yamasında Kök Hücre Tutunmasının Gösterilmesi- 5. Erciyes Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi- 16-17/04/2021