T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYEL SELÜLOZ TEMELLİ YAPAY KIKIRDAK DOKU HAZIRLANMASI

Sera UYAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Ekim, 2021

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYEL SELÜLOZ TEMELLİ YAPAY KIKIRDAK DOKUZ HAZIRLANMASI

Sera UYAN tarafından hazırlanan tez çalışması 12.10.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

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

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

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

Danışmanım Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Bakteriyel Selüloz Temelli Yapay Kıkırdak Doku Hazırlanması 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.

Sera UYAN

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FYL-2020-3826 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

TaTü'ye

ve

YabAnıl'a

TEŞEKKÜR

Tüm eğitim-öğretim hayatım boyunca üzerimde emeği olan tüm hocalarıma ve tez çalışmam sırasında benden yardımlarını, desteğini, sabrını ve bilgisini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU'na sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvarda beni hiç yalnız bırakmayan başım sıkıştığında yanlarına koştuğum bilgi birikimi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli ekip arkadaşlarım Hanife Sevgi VARLI, Fatma Ceren KIRMIZITAŞ, Nevra Pelin CESUR, Meryem YILDIRIM, Büşra ÖZKAN ve Ezgi AKYILDIZ'a

Tercihlerimde her zaman yanımda olan, amaçlarımın peşinden giderken beni destekleyen ve cesaretlendiren, bugüne kadar maddi ve manevi olarak desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan aileme,

Hayatıma sevgi ve anlam katan, kendimi bulmaya çalıştığım bu yolda hep yanımda olan, yol gösteren ve her ne olursa olsun yanımda olduğunu hissettiren Anıl HÜSREV'e sonsuz teşekkürler.

Sera UYAN

İÇİNDEKİLER

KISALTMA LİSTESİ viii
ŞEKİL LİSTESİ ix
TABLO LİSTESİ x
ÖZET xi
ABSTRACT xiii
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 3
2 GENEL BİLGİLER 4
2.1 Doku Mühendisliği 4
2.1.1 Hücre Türleri 5
2.2 Biyomalzemeler 6
2.2.1 Biyomalzemelerin Özellikleri 7
2.2.2 Biyomalzemelerin Sınıflandırılması 7
2.3 Bakteriyel Selüloz 13
2.3.1 Bakteriyel Selülozun Yapısal Özellikleri 14
2.3.2 Bakteriyel Selüloz Üreten Mikroorganizmalar 15
2.3.3 Bakteriyel Selülozun Üretimi 17
2.3.4 Bakteriyel Selülozun Uygulama Alanları 19
2.4 Kıkırdak Doku Mühendisliği 21
2.4.1 Kıkırdak Dokusu ve İşlevi 21
2.4.2 Yapay Kıkırdak 24
3 MATERYAL – METOD 26
3.1 Materyal 26
3.2 Metod 32
3.2.1 Bakteriyel Selülozun Sentezlenmesi 30
3.2.2 Bakteriyel Selülozun Karakterizasyonu 31

3.2.3 Hücre Adezyon Çalışmaları ……34

3.2.4 Kondrosit Hücre Hattı ……36

4 SONUÇ VE ÖNERİLER **41**

4.1 Bakteriyel Selülozun Karakterizasyon Çalışmaları ……41

4.1.1 Termogravimetrik Analiz ……39

4.1.2 FTIR ……40

4.1.3 Yüzey Morfoloji Analizi ……41

4.1.4 Bakteriyel Selüloz2un Su Tutma Kapasitesinin Hesaplanması ……42

4.1.5 Yüzey Alanı Analizi ……43

4.2 Hücre Kültürü Çalışmaları ……46

4.2.1 Hücre Tutunma Testi ……44

KAYNAKÇA **49**

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **54**

KISALTMA LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflection – Fourier Infrared Spectroscopy
BS	Bakteriyel Selüloz
Fe	Demir
DMSO	Dimetil Sülfoksit
MTT	Dimetil Tiyazolil Difeniltetrazolyum Bromür
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FBS	Fetal Bovine Serum
PBS	Fosfat Buffered Saline
HS	Hestrin-Schram
CMC	Karboksimetil Selüloz
Co	Kobalt
Cr	Krom
Mg	Magnezyum
Ni	Nikel
Nb	Niyobyum
PGA	Pliglikolikasit
PEG	Polietilen Glikol
PLGA	Poli(laktid-ko-glikolid)
PLA	Polilaktikasit
PMMA	Polimetilmetakrilat
SEM	Scanning Electron Microscope
Ta	Tantal
Ti	Titanyum

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Doku mühendisliği elemanları 4
Şekil 2.2 Biyomalzemelerin sınıflandırılması 8
Şekil 2.3 Bakteriyel selülozun yapısı 15
Şekil 2.4 Bakteriyel selülozun biyosentezi 17
Şekil 3.1 Taramalı elektron mikroskobu (Zeiss, EVO® LS 10) 27
Şekil 3.2 Bet yüzey alanı cihazı (Quantachrome, QuadraSorb SI) 28
Şekil 3.3 FTIR spektrofotometresi (Perkin Elmer Spectrum 100) 28
Şekil 3.4 TG/DTA (SII Nanotechnology, SII6000 Exstar TG/DTA 6300) 29
Şekil 3.5 Elisa reader (Thermo Scientific, Multiskan GO) 29
Şekil 3.6 İnverted mikroskop (Zeiss, Zen Blue2) 30
Şekil 3.7 CO_2 inkübatörü (Esco, CelCulture CO_2 INCUBATOR) 30
Şekil 3.8 Çalkalamalı su banyosu (Memmert WNB 29) 31
Şekil 3.9 Flow kabin (Esco, Sentinel PLATINUM, Class II) 31
Şekil 3.10 Santrifüj (Hermle, Z 206 A) 32
Şekil 3.11 Bakteriyel selülozun sentez aşamaları 33
Şekil 4.1 Membranların sıcaklığa bağlı kütle kaybı 42
Şekil 4.2 FTIR spektroskopi analizi 43
Şekil 4.3 Bakteriyel selülozun SEM görüntüleri (x20000) 44
Şekil 4.4 Bakteriyel selüloz BET analizi sonuçları 46
Şekil 4.5 Bakteriyel selüloz üzerindeki kondrosit hücre görüntüleri 47
Şekil 4.6 MTT testi sonucu 47

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 Bakteriyel Selülozun Şişme Değerleri Hesaplanması 45

ÖZET

Bakteriyel Selüloz Temelli Yapay Kıkırdak Doku Hazırlanması

Sera UYAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Doku mühendisliği, hasar gören veya yapısal ve işlevsel olarak yeterliliğini kaybetmiş dokuları olması gereken en iyi haline getirmeyi amaçlayan multidisipliner bir bilim dalıdır. Doku mühendisliği temel olarak; hedeflenen doku veya organa uygun iskele yapısını bu iskelenin yapılandırılmasını sağlayan faktörleri ve iskeleye ekilecek olan hücreleri içerir. Doku mühendisliği alanında, hücre dışı matriksi taklit edebilen malzemeler olan biyomalzemeler kullanılır. Biyomalzemeler, insan vücudundaki hasarlı doku veya organların işlevlerini yerine getirmesine, tedavi edilmesine olanak sağlayan doğal ve sentetik malzemelerdir. Bu çalışmada bir biyomalzeme çeşidi olan bakteriyel selülozun tercih edilme sebebi; sahip olduğu yüksek mekanik dayanıklılık ve biyouyumlu olmasının yanı sıra nanoağsı yapısı ve yüksek su tutma kapasitesine sahip bir hidrojel olmasıdır.

Kıkırdak doku mühendisliğinde amaç, biyomalzemeler ve/veya hücrelerin kullanımı ile elde edilen kıkırdak yapının doğal eklem kıkırdağı ile aynı veya benzer biyomekanik

özelliklere sahip olmasını sağlamaktır. Bu nedenle, tez kapsamında bakteriyel selüloz üzerine model olarak fare kondrosit hücrelerinin yüklenmesi ile yapay kıkırdak dokusu hazırlanması amaçlanmıştır.

Bu çalışmadaki amacımız; daha sonraki yıllarda yapay kıkırdak olarak kullanılabilecek bakteriyel selüloz temelli model bir malzeme oluşturmaktır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak *Acetobacter xylinum* bakteri türü tarafından sentezlenen bakteriyel selüloz üretimi, sonrasında da elde edilen bakteriyel selülozun karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan tez çalışmasında sentezlenen bakteriyel selülozun morfolojik özellikleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen malzemenin hücre ekilmeden önce otoklav sterilizasyonunun gerçekleştirilebilmesi açısından termal özelliklerinin belirlenmesi için termogravimetrik analizleri yapılmıştır. Bakteriyel selülozun kimyasal yapı analizi Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR) ile belirlenmiştir. Sentezlenen bakteriyel selülozun su tutma kapasitesi, şişme testinden elde edilen veriler ile hesaplanmıştır. Kondrosit hücrelerin bakteriyel selüloz üzerinde kültürü gerçekleştirilmiş ve sonrasında hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla mitokondriyal canlılık analizi 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) yöntemi ile belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyel selüloz, kondrosit, kıkırdak, biyomalzeme

ABSTRACT

Bacterial Cellulose Based Artificial Cartiladge Tissue

Sera UYAN

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Nelisa TÜRKOĞLU

Tissue engineering is a multidisciplinarty science that aims to optimize damaged tissues or tissues that have lost their structural and functional competence. Tissue engineering basically; it includes that make the scaffold structure suitable for the targeted tissue or organ and the cells to be placed on the scaffold. In the field of tissue engineering, biomaterials, which are materials that can imitate the extracellular matrix that provide the desired biological and mechanical properties, are used. Biomaterials are naturel and synthetic materials that enable damaged tissues or organs in the human body to function and be treated. The reason why we chose bacterial cellulose, a type of biomaterial, in this study; it is a biocompatible material with its reticulated structure and high water holding capacity as well as having high mechanical strength and durability properties.

When we look at the field of cartilage tissue engineering, the aim is; to ensure that obtained cartilage has the same or similar biomechanical properties as native cartilage tissue.

In this context, we preffered chondrocyte cells as cells to be cultured on bacterial cellulose.

Our aim in this study is; to create a bacterial cellulose-based model biomaterial that can be used as artificial cartilage in the following years. For this purpose, firstly bacterial cellulose was produced by *Acetobacter xylinum* bacterial species and then characterization of bacterial cellulose was performed. Morphological properties of bacterial cellulose were visualized using Scanning Electron Microscope (SEM). Thermogravimetric analysis was performed to determine thermal properties of bacterial cellulose. Chemical structure analysis of bacterial cellulose was determined by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Chondrocyte cells were cultivated on bacterial cellulose and then mitochondrial viability analysis was performed to determine cell viability by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), and it was aimed to develop a bacterial cellulose-based material for artificial cartilage tissue formation.

Keywords: Bacterial cellulose, chondrocyte, cartilage, biomaterial.

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Doku mühendisliği, en genel tanımı ile hücrelerin ve biyomateryallerin kullanılarak hastalara nakledilmek üzere kullanılacak olan yapay doku ve organların oluşturulmasını amaçlayan bir bilim dalıdır. Doku mühendisliği, mühendislik malzemesi olarak canlı hücreleri, hücre kaynağı olarak otolog hücreleri, allojen hücreleri ve ksenojen hücreleri kullanır.

Biyomalzeme, doku mühendisliği alanında hasar görmüş doku ve organların görevlerini yerine getirmesi için veya hasarlı dokuları desteklemesi için kullanılan doğal ya da sentetik malzemelerdir. Biyomalzemelerin tasarımı sırasında hedeflenen dokunun ihtiyacı olan tüm mekanik, fiziksel ve kimyasal özellikleri barındırması ve hedef doku ile uyum içerisinde olması birincil önceliklerdendir. Doku mühendisliği alanında biyomalzemeler üretildikleri malzemelere göre 4 farklı şekilde sınıflandırılır. Bunlar; metaller, kompozit malzemeler, seramikler ve polimerlerdir.

BS'nin kristal yapıda olması, saf halde elde edilebilmesi ve lignin, pektin veya araban içermemesi bitkisel kaynaklı selüloza göre avantajlarındandır. Ayrıca belirli amaçlar için bitki kaynaklı selülozdan daha iyi olan eşsiz kimyasal ve fiziksel özelliklere de sahiptir. Ayrıca, stabil mekanik dayanımı sebebiyle gıda, kozmetik, kağıt yapımı ve optik gibi uygulama alanlarında tercih edilmektedirler. BS toksik değildir ve hidrofilik olması, sıvılar için iyi emme kabiliyetine sahip olması, alerjik olmaması, modifiye edildiğinde biyolojik olarak parçalanabilmesi, tıp alanında tercih edilmesine neden olmaktadır. Doku mühendisliğinde yapı iskelesi olarak; deri dokusu, kıkırdak, kemik, yumuşak doku, kan damarı ve kornea için destek malzemesi olarak kullanılmaktadır. Eşsiz ağ yapısı ilaçların yüklenebilmesine ve kontrollü salınımına imkan sağlamaktadır.

Bir polimer çeşidi olan bakteriyel selüloz doğada selüloz I ve selüloz II olarak bulunur. Bakteriyel selülozun sentezlenme süresi polimerin moleküler özellikleri

üzerinde etkilidir. Bakteriyel selüloz; algler, küfler ve bazı *Gluconacetobacter, Agrobacterium, Komagataeibacter, Azotobacter, Acetobacter, Alcaligenes, Sarcina, Pseudomonas, Salmonella,* ve *Escherichia* gibi birçok bakteri türü tarafından üretilmektedir. Bakteriyel selülozun biyosentezi, çok sayıda enzimin rol aldığı ve oksidatif karbonhidrat metabolizmasına bağlı biyokimyasal bir olaydır.

Kas ve iskelet sisteminin kıkırdak, bağ ve tendon dokularının tedavisi ve iyileşme süreci onarım dokusu organizasyonu ile gerçekleşmektedir. Onarım dokusu organizasyonunun orjinal dokunun mekanik ve fizyolojik olarak birebir özelliklerini taşımamasından kaynaklı kronik yetersizlikler ve tedavi sürecinde sorunlar ortaya çıkartabilmektedir. Doku mühendisliğinin bu alandaki temel amacı, yaralı bölge ile tamamen uyumlu ve orjinal doku ile aynı özellikleri taşıyan bir sistem ile normal bir doku yenilenmesini sağlamaktır. Bu bağlamda yapılan doku ve organ çalışmalarında kolay bir şekilde elde edilebilecek ve üretimi sırasında zorluk yaşanmayacak hücrelerin kullanımı tercih edilmektedir. Kıkırdak hasarlarında veya kayıplarında yapılan tedavilerde hücre, gen tedavisi ya da büyüme faktörlerinden hangisi kullanılacak olursa olsun iskeleti oluşturacak olan bir ağa ihtiyaç duyulmaktadır. İskelet görevi gören bu ağ olmadan hasarlı bölgeye iyileşmeyi sağlayacak olan maddeler verilse de iyileşme yetersiz olmaktadır. Bu sebeple iskelet görevi görecek olan kıkırdak ekstraselüler matrisini taklit eden bu ağ yapısının bölgeye uygun olarak seçilmesi tedavinin en önemli basamaklarındandır. Yapay kıkırdak için bu iskeleler bu amaç doğrultusunda hidrojel veya polimerlerden yapılmış sentetik malzemelerdir.

1.2 Tezin Amacı

Önerilen çalışmada amacımız, yapay kıkırdak dokusu olarak kullanılmak üzere bakteriyel selüloz temelli kondrosit içeren hidrojel membranın elde edilmesi için hazırlanan bakteriyel selülozlara kondrosit hücreleri yükleyerek bakteriyel selüloz temelli yapay kıkırdak doku oluşumunu gerçekleştirmeye çalışmaktır.

Çalışmanın amaçları aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır:

1. Bakteriyel selüloz üretilmesi
2. Bakteriyel selülozun termal analizi

3. Bakteriyel selülozun kimyasal ve morfolojik karakterizasyonu
4. Kondrosit hücrelerin çoğaltılması
5. Hücrelerin yüklenmesi ve tutunma testi

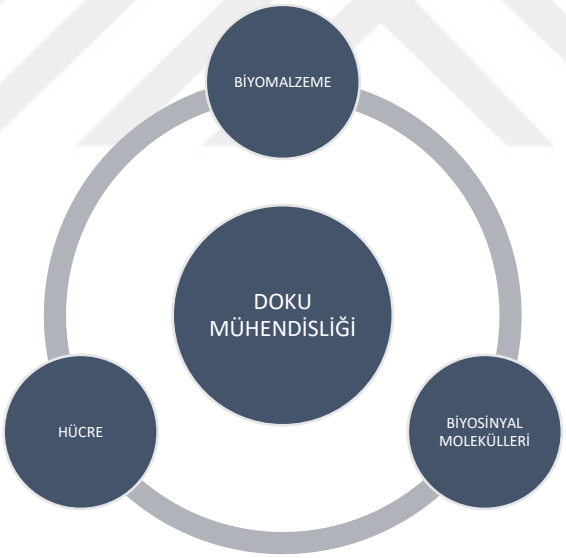
1.3 Hipotez

İnsan yaşamı boyunca önemli olan ve harhangi bir hasar alması durumunda hayat kalitesini fazlasıyla düşüren bir yapı olan kıkırdak dokunun tedavi edilemez bir yapısı olmasından kaynaklı doku mühendisliği çalışmaları bu bağlamda büyük öneme sahiptir. Bizim bu çalışmada hipotezimiz, eğer morfolojik görüntü itibari ile kıkırdak dokunun ekstraselüler matriksine çok benzeyen bakteriyel selüloz membran üzerine kondrosit hücre tutunması sağlanabilirse o zaman ileride bu malzeme kişiye özel yapay kıkırdak doku oluşturulması için kullanılabilecektir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, farklı biyolojik doku türlerinde hasar gören dokuyu iyileştirmek, onarmak, işlevini devam ettirmek veya yeniden işlevini kazandırmak ya da organ transplantasyonununda yaşanan donör yetersizliği ve immün cevap oluşumu gibi sorunlara çözüm bulabilmek için biyokimyasal, fizikokimyasal yöntemleri ve mühendislik yöntemlerini kullanan multidisipliner bir uygulama alanıdır. Aynı zamanda doku mühendisliği tıbbi bir amaç doğrultusunda yeni canlı doku oluşumu için doku iskelesinin kullanımını içerir [1].



Şekil 2.1 Doku mühendisliği elemanları

Doku mühendisliği çalışmalarının temelinde; biyopsi yoluyla hedef hücreler hastadan alınarak, kontollü kültür ortamlarında biyomalzemelerden oluşan iskeletler üzerinde, biyosinyal moleküller varlığında kültüre edildikten sonra oluşan yapının vücuttaki hasarlı bölgeye entegrasyonu sonucu doku rejenerasyonunun geçekleştirilmesi vardır [2].

Doku mühendisliği, mühendislik malzemesi olarak canlı hücreleri kullanır. Kullandığı canlı hücre örnekleri arasında cilt replasmanı veya onarımında canlı fibroblastların kullanılması, canlı kondrositlerle onarılmış kıkırdak veya başka şekillerde kullanılan diğer hücre türleri yer almaktadır [3].

2.1.1 Hücre Türleri

Doku mühendisliğinde kullanılan hücre kaynakları; hastanın kendisinden alınan otolog hücreler, farklı insan donörlerinden alınan allojen hücreler ve farklı canlı türlerinden alınan ksenojen hücrelerdir [4, 5].

- **Otolog Hücreler**

Otolog hücreler, yeniden implante edilecekleri kişiden elde edilirler. Otolog hücreler, reddedilme ve patojen iletimi ile ilgili en az riske sahip hücrelerdir ancak bazı durumlarda bu risk artabilir. Örneğin genetik hastalığa uygun otolog hücreler yüksek riske sahiptirler. Ayrıca, hastalık düzeyi yüksek veya yaşı ilerlemiş kişilerin yanı sıra ciddi yanıklara sahip hastalar, sağlıklı hücre dizileri oluşturmak için yeterli miktarda otolog hücreye sahip olmayabilir.

Otolog hücreler kullanılmadan önce örneklerden kültürlenmelidir. Bu zaman alan bir işlem olduğundan otolog çözeltiler çok hızlı olmayabilir. Son zamanlarda kemik iliği ve yağdan daha çok mezankimal kök hücrelerin kullanımına doğru bir eğilim olmuştur. Bu hücreler kemik, kıkırdak, yağ ve sinir dahil olmak üzere çeşitli doku türlerine farklılaşabilen hücrelerdir. Çok sayıda hücre yağdan kolay ve hızlı bir şekilde izole edilebilir, böylece çok sayıda hücrenin hızlı ve kolay bir şekilde elde edilebilme potansiyeli oluşur.

- **Allojenik Hücreler**

Allojenik hücreler, sağlıklı bir donörün vücudundan alınarak hastaya nakli gerçekleştirilen hücrelerdir. İn vitro çalışmalarda insan hücrelerinin kullanımına yönelik bazı etik kısıtlamalar söz konusuyken, insan derisinden dermal fibroblastların kullanımının immünolojik olarak güvenli olmasından kaynaklı deri doku mühendisliği için uygun bir seçim olduğu gösterilmiştir.

Allojenik hücrelerin kullanımında da bazı riskler vardır; konak nakledilen yeni hücreleri yabancı olarak algılaması ile birlikte bu sağlıklı hücrelere karşı bir savaş başlatır ve bu durum konak vücudunda ağır hasara yol açabilmektedir. Bunun

önüne geçebilmek adına nakilden hemen önce hasta ile donör arasında neredeyse %100'e yakın doku uyumu olması hedeflenir ve nakil sonrasında hastaya yeni hücrelere karşı savaş başlatmaması için bağışıklık sistemini baskılayan ilaçlar verilir.

- **Ksenojenik Hücreler**

Ksenojenik hücreler, farklı canlı türlerinden izole edilen hücrelerdir. Özellikle hayvan hücreleri, kardiyovasküler implantların yapımını amaçlayan deneylerde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmıştır. En sık kullanılanlar; singenik veya izojenik hücreler, ikizler, klonlar veya yüksek oranda kendi içinde melezlenmiş araştırma hayvan modelleri gibi genetik olarak özdeş organizmalardan izole edilen hücrelerdir [6].

2.2 Biyomalzemeler

Biyomalzeme, hasar görmüş doku ve organlara destek olan veya bir parçası olarak entegre edilen ve bazı durumlarda hasarlı doku/organın yerine geçmek üzere geliştirilen ve kullanılan malzemeler olarak tanımlanmaktadır [7, 8]

Biyomalzemelerin kullanıldığı farklı çalışma alanlarında kabul edilen bir diğer tanımı; 'doğal veya sentetik olabilen, canlının vücuduna yerleştirilen veya canlı vücudu ile temas halinde olan ya da biyomedikal bir cihazın tamamını veya bir kısmını içeren, canlının hasarlı doku veya organının işlevini arttırabilen veya değiştirebilen malzemeler' şeklindedir [9]

Biyomalzemelerin ilk kullanımları yüzlerce yıl öncesine dayanmaktadır. İlk biyomalzemelerden biri olan ve hastanın dişlerine altın bir tel ile bağlanan hayvan dişinden yapılan hibrit bir materyaldir. Mısır tarihi incelemelerinde insanların 'eksik' veya 'yaralı' gözlerinin yerini alabilecek ahşap yapay gözlerin kullanıldığı gözlenmektedir. Bunun yanı sıra eksik uzuvların yerine kullanılmak üzere birincil nesil biyomalzemeler tarihte kullanılmıştır ve en dikkat çeken durum ise eski zamanlarda kullanılan bazı materyallerin günümüzde hala kullanılıyor olmasıdır [10].

Biyomalzemeler üretildikleri malzeme yelpazesinin geniş olmasından kaynaklı kullanım alanları da aynı oranda geniştir. Yerleştirilecek olan malzemenin

herhangi bir immün yanıt veya reddedilme oluşturmaması için hedef dokuya uygun olması ve bu doğrultuda belli başlı bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Biyomalzemelerin konak vücudunda kullanılacakları bölgeye ve kullanım amaçlarına göre farklılık gösteren ortamlara uyum sağlayabilen, karşılaşabileceği gerilimlere karşı mekanik dayanım gösterebilen malzemeler olmaları gerekmektedir [11].

2.2.1 Biyomalzemelerin Özellikleri

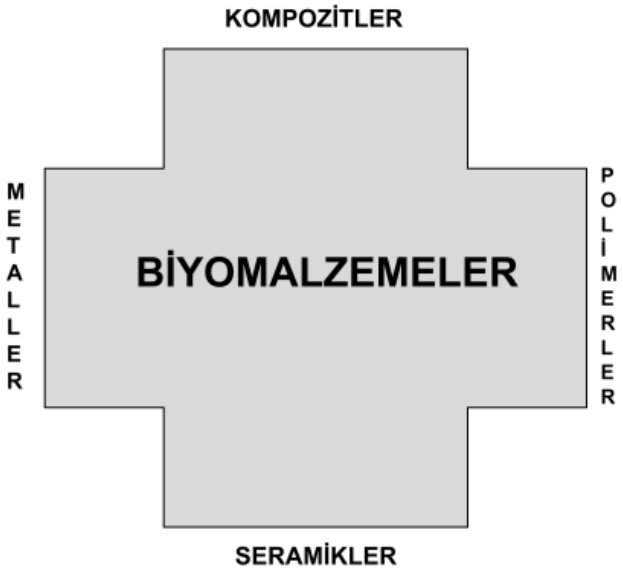
Biyomalzemelerin taşıması gereken temel özellikler aşağıda sıralanmaktadır:

- Kullanılcak olan malzemenin, yerini almasını hedeflenen dokuya yakın mekanik özelliklere sahip olması,
- Hedef dokuya yerleştirildikten sonra kararlılığını koruması (okside olmaması, paslanmaması, iyon salınımı yapmaması) [12, 13],
- Besinlerin, gazların ve hücresel atıkların geçişine izin verecek şekilde gözenekli bir yapıya sahip olması,
- Kullanılacak olan hasarlı dokuya uygun 3 boyutlu yapıya sahip olması,
- Yerleştirildiği dokuda kanserojen, toksik etki yaratmaması ideal bir biyomalzemeden beklenen özelliklerdir [14].

Biyomalzemelerin tasarımı sırasında hedeflenen dokunun ihtiyacı olan mekanik, fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olması ve doku ile uyum içerisinde olması önemlidir [15].

2.2.2 Biyomalzemelerin Sınıflandırılması

Biyomalzemeler temel olarak metaller, kompozit malzemeler, seramikler ve polimeler olarak sınıflandırılmaktadır. Şekil 2.2'de biyomalzemelerin türleri gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Biyomalzemelerin sınıflandırılması

- **Metaller**

Metalik malzemeler en yaygın olarak vücudumuzun yük taşıyan kısımlarına destek olmak amacıyla kullanılmaktadır. Metalik malzemelerin öne çıkan bazı özellikleri, yüksek çekme mukavemeti, yüksek akma mukavemeti, döngüsel yüklemeye (yorulma), zamana bağlı deformasyona (sünme) karşı direnci ve korozyon direncidir. Genellikle kalça eklemi protezi, diz eklemi protezi, diş implantları, kardiyovasküler cihazlar, cerrahi aletler vb. gibi implant cihazlarının imalatında kullanılırlar. Tıbbi cihaz uygulamaları için en yaygın kullanılan metaller ve alaşımlar, ticari olarak saf paslanmaz çelikleri içermektedir [16].

Paslanmaz çelik tipi olarak; geleneksel olarak paslanmaz çelikler ve nikel (Ni) içermeyen paslanmaz çelikler olarak sınıflandırılırlar. Ni içermeyen paslanmaz çelikler, adından da anlaşılacağı gibi nikel ve herhangi bir Ni elementi içermezler. Bu durum, korozyon direncini arttırırken stres korozyonunu da azaltır. Ni içeren çelik implanlar alerjen olabilmektedir [17]. Bunun dışında metal alaşımların kullanımı çok yaygındır. Kobalt (Co)-krom (Cr) alaşımları ve titanyum (Ti) ve alaşımları en yaygın kullanılan alaşımlardır. Bu metalik biyomalzemeler arasında Ti alaşımları, paslanmaz çelikler ve Co-Cr alaşımları ile karşılaştırıldığında en yüksek biyouyumluluk, korozyon direnci ve özgül mukavemet (çekme mukavemetinin yoğunluğa oranı) oranına sahiptir. Co-Cr alaşımları, paslanmaz çelikler ve Ti alaşımları ile karşılaştırıldığında en yüksek aşınma direncini ve

nispeten daha yüksek mukavemet oranı göstermektedir. Magnezyum (Mg) alaşımları, demir (Fe), tantal (Ta) ve niyobyum (Nb) gibi diğer metalik biyomalzemeler de bu alandaki payları küçük olsa da önemlidir. Her türlü metalik biyomalzeme üzerinde dünya çapında yoğun araştırma ve geliştirme yapılmaktadır. Metalik biyomalzemelerin temel bileşenleri temelde toksik değildir ancak günümüzde Ni, uyumsuzluk sorunları açısından yüksek riskli olarak kabul edilmektedir [18].

Metal ve metal alaşımları taşıdıkları kristal yapıdan dolayı hem yüksek dayanıma, yüksek kırılma direncine ve sertliğe hem de süneklik özelliklerine sahip olmalarından dolayı biyomalzeme olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Aynı zamanda vücut dokularına kıyasla çok daha sert olmalarından kaynaklı da bir dezavantaja sahiptir [1, 19].

Aşınmaya karşı çoğunlukla iyi bir direnç sağlayan metaller (soymetaller hariç) insan vücudunda korozyona uğraması oldukça riskli bir durumdur. Insan vücudu içerisindeki vücut sıvılarında bulunan su, çözünmüş iyon ve protein metalik biyomalzemeler için korozyona uğrayan bir ortam hazırlamaktadır. Korozyonla birlikte hem malzeme aşınımı hem de vücuda metal iyon salınımı başlatır ki bu asla istenmeyen bir durumdur. Bu durumu engellemek için metal biyomalzemelerin vücut sıvıları ile olan teması kesilmelidir, bu da kimyasal olarak kararlı olan başka malzemelerle yüzey kaplaması yaparak gerçekleştirilmektedir [1, 20]

- **Kompozitler**

Tek başına herhangi bir malzemenin gösteremediği veya sergileyemediği bazı özellikleri karşılayabilmek adına belirli bir amaç doğrultusunda farklı farklı bileşenlerin özelliklerini bir araya getirme yöntemi kullanılarak oluşturulan malzemelerdir [20, 21].

En az iki farklı malzemenin bir araya getirilmesi ile oluşturulan kompozit malzemelerin en önemli farkı bir araya getirilen bileşenlerin özelliklerini kaybedip malzemeye yeni özellikler kazandırmasıdır [22].

Kompozit formda olan malzemeleri akıllı özelliklere sahip biyomateryaller olarak tanımlayabiliriz. Bu bağlamda kompozit malzemeler, doğal ya da sentetik, farklı polimerler ve/veya inorganik yapı içeren polimerler arasında ve hatta bazen

biyolojik faktörlere sahip farklı malzemelerin birleştirilmesi ile elde edilen malzemeleri ifade eder. Akıllı kompozit biyomalzemelerin kullanıldığı alanlar; dokular, kemik ve dişler dahil olmak üzere özellikle özel kompozit formülasyonlar gerektiren sert dokulardan, yumuşak dokulara kadar değişebilir. Bu kompozit malzeme alanı heyecan vericidir çünkü malzemeler arasındaki birleşik özellikler, tek fazlı bir malzemeden gelen sınırlamaların büyük ölçüde üstesinden gelebilmektedir [23].

Kompozit malzemeleri bir araya getiren malzemelerden biri matris diğeri matrisi mekanik açıdan destekleyen dolgu bileşenidir. Bu iki malzeme birbiri içerisinde çözünmezler ve bir ara yüzey ile birbirinden ayrılmaktadırlar.

Kompozit malzemeler en az iki farklı bileşenden meydana gelmelerinden ötürü diğer biyomalzemeler olan polimerlere, metallere ve seramiklere göre daha karmaşık bir yapıya sahiptirler. Bu karmaşık yapının oluşumu sırasında kullanılan malzemelerin çeşitleri değiştiği gibi kullanılan malzemenin miktarı, bileşimi, tane morfolojileri gibi karakteristikleri de farklı olabilmektedir ve bu durum kompozit malzemelerin özelliklerini istenilen oranda değiştirme imkanı sunmaktadır [20, 21].

- **Seramikler**

Biyomalzeme alanında her geçen gün daha popüler hale gelen biyoseramik malzemeler, hem sentetik hem de doğal bileşenlerden elde edilebilmeleri ve yüksek oranda biyouyumluluk gösterebilme gibi önemli temel özellikleri nedeniyle oldukça yaygın bir kullanım alanına sahiptir.

Günümüzde en önemli birincil nesil metalik olmayan inorganik seramik biyomalzemeler alümina, zirkonya ve diğer gözenekli seramiklerdir. Bu materyallerin sınırlı bir formülasyon yelpazesi vardır. Uygulanan üretim süreci ve pişirme sıcaklığı; gözenekliliğini, toz saflığını, tane boyutunu ve dağılımını, mikro yapılarını, mekanik, fiziksel ve biyolojik özellikler üzerindeki doğrudan rolünü büyük ölçüde etkilemektedir. Alümina (Al203, Alüminyum oksit), düşük aşınma ve sürtünme özelliğinden dolayı uzun yıllardır ortopedi de yaygın olarak kullanılmaktadır. Uzun yıllar boyunca başka bir spesifikasyon olmaksızın tek başına seramik teriminin alümina için kullanılması, alüminanın ne kadar yaygın kullanıldığının göstergesidir. Zirkonya, ortopedik kullanıma uygun çelik seramikler

olarak ifade edilen en yüksek mukavemetli seramiklerdendir. Zirkonya, kalça protezi apareyi için alümina eklere göre oldukça düşük bir aşınma (milyon döngüde 0.1 mm^3'ten az) göstermektedir. Günümüzde kemik dokusu büyümesini indüklemek ve protez apareyinin stabilizasyonunu arttırmak için oldukça gözenekli seramikler geliştirilmiştir [24].

Seramik biyomalzemeler, orbital ve kulak implantları, kalp kapakçıkları, diş ve ortopedik implantlar ve temal implantların biyouyumluluğunu arttırmak için kaplama olarak da kullanılmaktadır. Seramik biyomalzemelerin kaplama olarak kullanılmasının yanı sıra metaller ve polimerlerle kompozit yapı oluşturarak kırılganlık ve gevreklik gibi özelliklerini tolere ederek kullanılabilmektedir [25].

- **Polimerler**

Polimerlerin tıpta kullanımı neredeyse polimer bilimi alanının doğuşuna kadar uzanmaktadır. Naylon süturlar, poli(metilmetakrilat) (PMMA), dakron polyester ve polivinil klorür gibi polimerlerin cerrahide kullanımı hakkında araştırma makaleleri 1940'ların ortalarında önde gelen tıp dergilerinde yayınlanmaya başlamıştır. Bu polimerler, kalça implantları, yapay lensler, geniş çaplı vasküler greftler, kateterler vb. dahil olmak üzere kalıcı protez cihazlarının temel bileşenleri olarak da bugün klinik tıpta önemini korumaktadır ve bu malzemelerin in vivo stabilitesini ve performansını optimize etmek için araştırmalar hala devam etmektedir [26].

Doku mühendisliğinde kullanılan polimerik malzemelerin sayısı son on yılda büyük ölçüde artmıştır. Doku mühendisliğinde kullanılan doku iskeleleri genellikle vücut dışında oluşturulur ve daha sonra cerrahi olarak gereken bölgeye implante edilir. Bununla birlikte, laparoskopi hatta belki de basit enjeksiyon gibi minimal invaziv yöntemlerin kullanılabilmesine artan bir ilgi vardır ve böyle durumlar içinde vücut dışındayken düşük viskoziteli (enjekte edilmesi kolay) olan ancak yerinde daha yapışkan ve jel benzeri hale gelen biyomalzemelerde tasarlanmaktadır. Polipropilen oksit ve polietilen oksitten oluşan üç bloklu polimerler bu gibi durumlar için kullanılabilir. Polimerler ayrıca kovalent olarak çapraz bağlanabilir. UV fotopolimeriazyonu ve çok sayıda küçük moleküllü çapraz bağlayıcı aracılı yöntem bu amaç için kullanılmaktadır [27].

Polimerler düşük molekül ağırlıklı aynı veya farklı atomik grupların kimyasal bağlar aracılığı ile tekrarlanması sonucu oluşan uzun zincirli veya dallanmış yapıdaki yüksek molekül ağırlıklı malzemelerdir [28].

Polimerik malzemeler biyomühendislik ve biyomedikal alanlarında çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan malzemelerden aşağıda bazı örnekler verilmiştir.

Sentetik polimerlere en yaygın örnek olarak poli(laktid-ko-glikolid)(PLGA), Polilaktik asit (PLA), ve poliglikolik asit (PGA) karışımı olan kopolimer verilebilir. Bu kopolimer, biyouyumluluk, mekanik mukavemet ve istenen şekil ve boyutlarda manipülasyon kolaylığı gibi bir çok önemli özelliğe sahiptir. Bu biyolojik olarak parçalanabilen polimer Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Polietilen glikol (PEG), hidrofilik, biyouyumlu, immünojenik olmayan, esnek eter bazlı bir polimerdir. PEG, epidermal büyüme fakötrü (EGF) gibi büyüme farktörlerine karşı iyi bir afiniteye sahiptir, birbirine kolaylıkla bağlanabilir ve doku onarımında avantaj sağlayabilmektedir [29]. Karboksimetil selüloz (CMC), selülozun sodyum hidroksit ve kloroasetik asit ile reaksiyonu sonucu elde edilir. CMC ve bozunma ürünleri toksik olmamakla birlikte sulu ortamda çözünmektedir. Aljinat, sıklıkla kullanılan başla bir hidrofilik polimerdir. Aljinat bir mukopolisakkarittir ve β-D, 1-4 glikozit bağı ile bağlanan mannuronik asit ve α-L-guluronik asitten oluşmaktadır. Kalsiyum, stronsiyum gibi iki değerlikli iyonlara basit, ucuz ve toksik olmayan yöntemlerle aljinat hidrojeller elde etmek mümkündür. Kitosan lineer bi polikatyonik mukopolisakkarittir ve kitinin deasetilasyonu ile elde edilir. 2-amino-2-deoksi-D-glukoz (D-glukozamin) ve 2-asetamido-2-deoksi-D-glukoz (N-asetil-D-glukozamin) birimlerinden oluşmaktadır. Kitosan birimleri, β(1-4) glikozit bağı ile bağlanır.

Polimerik biyomalzemeler, viskoelastik ve düşük elastik modül özelliği taşıdığından hazırlamak istenilen malzemeye şeklinin verilmesi kolaydır ancak mekanik özellikleri bakımından metaller ya da seramikler kadar yeterli performans gösterememektedir. Genel olarak polimerik biyomalzemelerin mekanik özellikleri biyoseramikler ve metalik biyomalzemeler ile karşılaştırıldıklarında zayıf kalmaktadır. Uygulanan yükü karşılayabilmenin önemli olduğu yerlerde; diz, eklem gibi polimerik biyomalzemeler yeterli olmamaktadır.

Aynı zamanda hareketin yoğun olduğu ve aşınmanın yüksek düzeyde yaşandığı eklemlerde kullanılacak olan implant malzemesinin güçlü aşınma direnci göstermesi gerekir ki bu durumda polimerik biyomalzemeler çok tercih edilmemektedir. Ancak bazı polimerler yapısal özelliklerinden dolayı çok iyi mekanik özellikler sergilerler ve bu genellemenin dışında kalmaktadırlar. Bu duruma en iyi verilebilecek örnek polimerik biyomalzeme ise kristalin yapılarından dolayı gösterdiği düzenli zincir yapısı ve düşük esneklikten dolayı polietilen (UHMWPE)dir [30].

Sunulan tez çalışmasında yapay kıkırdak doku oluşumu için temel olarak kullanılacak olan ve doğal polimerik biyomalzeme sınıfının bir üyesi olan bakteriyel selüloz kullanılmıştır.

2.3 Bakteriyel Selüloz

Bakteriyel selüloz (BS), ilk olarak, fruktoz içeren bir ortamda yetiştirildiğinde son derece güçlü membranlar üreten "sirke anası" olarak tanımlanmıştır. Bu yapıyı üreten mikroorganizmaya *A. xylinum* adı verilmiştir. Aslında bakteriyel selüloz belirli bakteri türleri tarafından üretilen organik bir bileşiktir. Doğal habitatlarda, bakterilerin çoğu, hücrelerin etrafında koruyucu zarflar oluşturan selüloz gibi hücre dışı polisakkaritleri sentezlemektedir. BS'de bunlardan bir tanesidir. Lineer bir polisakkarit olan selüloz bitkilerin, alglerin hücre duvarında genellikle diğer polimerlere (pektin, lignin, hemiselüloz vb.) bağlı yapısal bir bileşen olarak bulunmaktadır. *Acetobacter xylinum* cinsi ile taksonomik olarak yakın akraba olan sadece bir kaç bakteri türü, lif şeklinde selüloz üretir ve hücre dışı olarak salgılar. *A. xylinum* tarafından üretilen bakteriyel selüloz, yüksek su tutma kapasitesi, yüksek kristallik, hidrofilik, yüksek gerilme mukavemeti ve oldukça saf ve ultra ince lif ağ yapısı gibi benzersiz özelliklere sahiptir [31, 32].

Kimyasal yapısı benzer olmasına ragmen BS, bitki selülozuna göre farklı ve üstün fiziksel, mekanik, biyolojik özelliklere sahiptir. Bu üstün özelliklerinden dolayı gıda, kozmetik, biyotıp ve ilaç dağıtımında uygulama alanı bulmaktadır. BS, tamamen pektin, hemiselüloz ve lignin içermeyen en saf haliyle biyosentezlenmektedir. Bu nedenle BS, bitki selülozuna kıyasla kolayca rafine edilebilir. Sentezlendiği gibi sahip olduğu doğal yapısı sayesinde BS, sıvı ve gazlara karşı yüksek geçirgenliğe sahip, doğası gereği oldukça gözenekli ve yüksek su alma

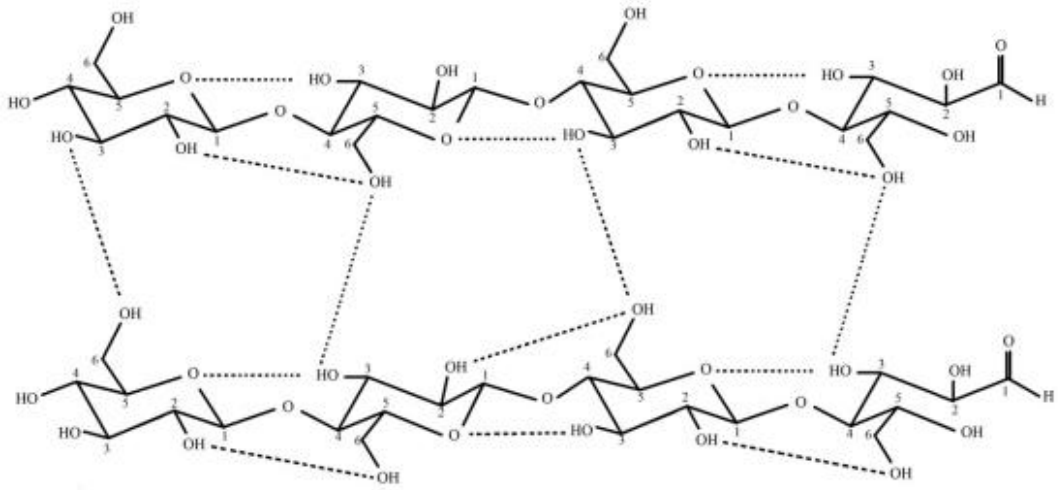
kapasitesine sahiptir. BS'nin bu özellikleri, bitki selülozuna kıyasla liflerindeki yaklaşık 100 kat daha ince olan şerit şeklindeki mikro ve nanofibrillerin ultra ince ağından kaynaklanmaktadır. BS'nin bu özellikleri onu bazı formülasyonlarda stabilizatör ve koyulaştırıcı olarak uygulamaya ve küçük liflerden oluşan yumuşak dokusu nedeniyle cilde zarar vermemesi özelliğinden dolayı deri uygulamalarında kullanılmaya uygun bir potansiyel malzeme haline getirmektedir. Ayrıca biyouyumluluk, düşük immünojenik potansiyel ve yerinde katlanabilirlik, BS'nin biyotıp alanında uygulanabilirliğini daha da arttırmaktadır. Bu özellikler BS'yi kozmetik alanında dermal uygulamalar, topikal ve transdermal ilaç dağıtımı için uygun bir seçenek yapmaktadır. Yüksek su tutma ve iyon değiştirme kapasiteleri nedeniyle BS, sırasıyla müshil etkileri ve düşük kolesterol diyeti için uygun bir materyaldir. Benzer şekilde şeffaflık, sıvı ve gazlara karşı yüksek geçirgenlik özellikleri ile BS'nin yüz maskesi, kontakt lensler ve yara muayenesi kolaylığı ile yaraya ilaç salınması gibi uygulama alanlarında kullanım için uygun bir malzeme olmasını sağlamaktadır. BS'nin lif mukavemeti, hemen hemen karşılaştırılabilir ve bu özelliğinden dolayı BS, yüksek çekme mukavemetinin gerekli olduğu, örneğin ilaç yüklü kemik çimentosu gibi uygulamalar için uygun bir aday haline gelmektedir [33].

Bu çalışmamızda fare kondrosit hücrelerin ekimi için kullanılacak olan iskelet olarak bakteriyel selülozu kullanacağız.

2.3.1 Bakteriyel Selülozun (BS) Yapısal Özellikleri

Bakteriyel selüloz ağırlıklı olarak sola bükülen, çapı 25-100 nm arasında değişen tek tek lifleri olan ve bir kaç mikrometre uzunluğunda bir makromoleküldür. Ayrıca BS membranlarındaki rastgele hizalanmış BS nanolifleri, kurutma sırasında membrana bir stres uygulanırsa tek eksenli veya tek düzlemli olarak kolayca yönlendirilebilmektedir. BS'in en küçük fibrilleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendiğinde 6-7 nm çapa sahip olduğu belirlenmektedir. Bu en ince fibrillere, elementer fibriller adı verilir çünkü boyutları doğal liflerden, bakteriyel selülozdan, tunik selülozdan veya suni ipekten çok farklıdır. Ayrıca Valonia selüloz, BS ve pamuktan üretilen selüloz mikrofibrilleri arasındaki farkların, kristallik derecesi ve kristal genişliğindeki farklılıklardan kaynaklandığı bilinmektedir [34].

BS, moleküler formülü $(C6H10O5)_n$ olan β-1→4 glukan zincirinden oluşan fibrilin temel yapısı olarak bulunur. Glukan zincirleri, hidrojen içi ve arası bağ ile bir arada tutulur. BS'un mikrofibrilleri bitki selülozundan yaklaşık 100 kat daha küçüktür. BS'nin lifli ağı, iyi düzenlenmiş, yüksek yüzey alanlı ve gözenekli hidrojel tabakasının oluşumuyla sonuçlanan üç boyutlu nano liflerden yapılmıştır. *Acetobacter xylinum'*un BS sentez işlemi sırasında glikoz zincirinin protofibrillerini bakteri hücre duvarından salgılar ve bir araya gelerek nanofibriller selüloz şeritleri oluşturur. Bu şeritler sayesinde BS'nin ağ yapısı oldukça gözenekli bir matris şeklindedir. Oluşan selüloz bol miktarda hidroksil grubuna sahip olan bir yüzeye sahiptir ve hidrofiliktir [35]. Şekil 2.3'de bakteriyel selülozun yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Bakteriyel selülozun yapısı [35]

2.3.2 Bakteriyel Selüloz Üreten Mikroorganizmalar

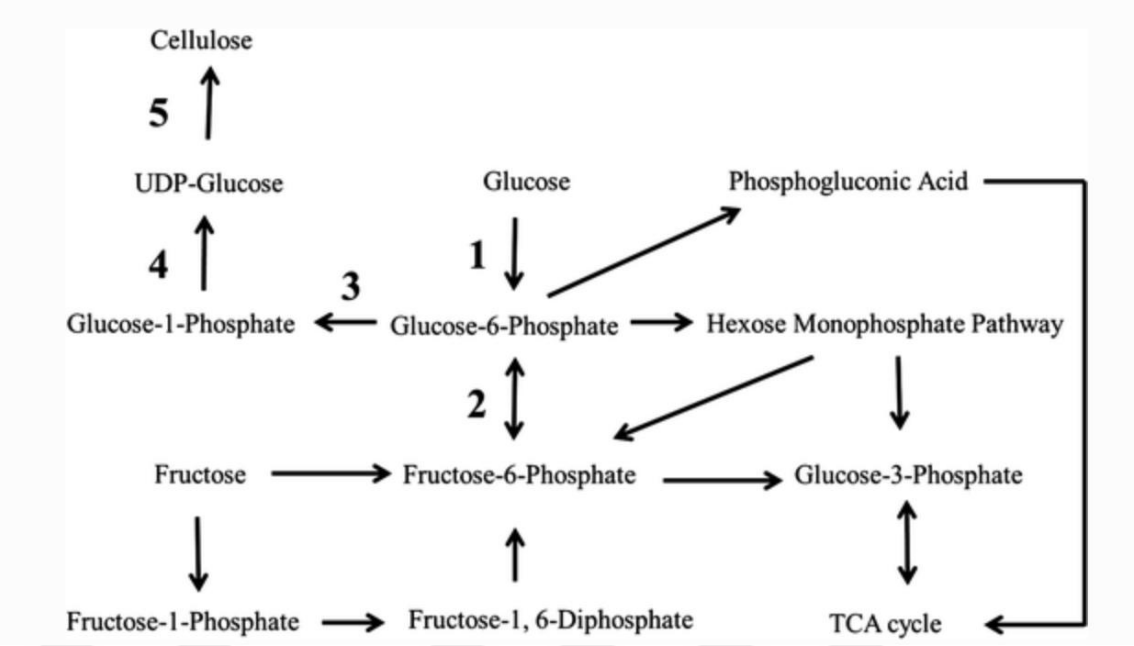
Gluconacetobacter (eski adıyla *Acetobacter*), *Agrobacterium, Aerobacter, Achromobacter, Alcaligenes, Azotobacter, Rhizobium, Sarcina, Salmonella, Escherichia* vb. mikroorganizmalar BS sentezleyen bakterilere örnek olarak verilebilir [36].

Gluconacetobacter tarafından üretilen selüloza bakteriyel selüloz denir. İki glikoz molekülü arasında β-1,4 bağı bulunan BS $(C6H10O5)_n$'nin moleküler formülü bitki selülozu ile aynıdır, ancak fiziksel ve kimyasal özellikleri farklıdır. Farklılıklardan biri, bu selülozların oldukça düzenli yapısında yatmaktadır. Bitki selülozu için bir

dizi selüloz moleküler zinciri birikerek mikrofibriller oluşturur ve ardından fibril lamel ve lif hücreleri adı verilen yüksek dereceli yapıların demetleri ve kümelerini oluşturur. Bitki selülozu genellikle hücre duvarında bulunur ve hemiselüloz, lignin ve diğer safsızlıklarla karmaşık bir yapı oluşturur. Tersine, *G. xylinus* tarafından üretilen BS, mikrofibril demetlerinden oluşan bir şerit şeklinde salgılanır. Bu şerit çok incedir ve genişliği bitki selülozunun sadece yüzde biri kadardır. Şerit selüloz, bitki selülozundan farklı olarak düzenli bir yapı oluşturan görünür ağsı bir yapı olarak daha da büyür. BS aşağıdaki benzersiz özellikleri sergiler:

i. Bitki selülozunda hemiselüloz ve lignin olmadığı için yüksek derecede saflık
ii. Yüksek kristallik
iii. Yüksek Young modülü 15-30 GPa
iv. Mükemmel biyolojik afinite [37].

Bitki selülozundan farklı olarak, mikroorganizmalardan üretilen BS, zincir moleküllerinin sentezinde benzersiz bir mekanizmaya sahiptir ve ardından detaylı bir self-assembly (kendi kendine birleşme) söz konusudur. Tek bir *A. xylinum* hücresi, hücre yüzeyindeki gözeneklerde beliren ve daha sonra hücreyi çevreleyen ve hücre ortamına salınan selüloz sentaz enzimi ile saniyede 200.000'e kadar glikoz molekülünü polimerize edebilen BS sentezleyebilmektedir. Süreç Şekil 2.4'de gösterilmiştir [36].



Şekil 2.4 Bakteriyel selülozun biyosentezi [38]

2.3.3 Bakteriyel Selülozun Üretimi

Mevcut BS üretim yöntemleri; statik kültür, çalkalayıcı kültür ve havalandırmalı reaktör şeklindedir. Her durumda amaç, optimum form ve uygun özelliklere sahip maksimum BS üretimine ulaşmaktır. BS üretimi için temel olarak 3 çeşit teknik mevcuttur. Bunlardan biri statik kültürdür. Statik kültür, nispeten basit ve yaygın olarak kullanılan bir selüloz üretim yöntemidir. Besiyeri sığ tepsilere yerleştirilir, aşılama yapılır ve selüloz tepsiyi neredeyse doldurana kadar 5-20 gün boyunca kültür devam ettirilir. *G. xylinus*, havaya maruz kalan tarafta jelatinimsi bir BS pelikülü üretir. Derinlik 4,5 cm'den az olduğunda BS üretimi doğrudan hava/sıvı yüzey alanı ile ilgilidir. Duvar etkisi olarak adlandırılan bir dış faktör, BS üretimi için en güçlü sınırlayıcı faktör olduğu belirlenmiştir. Geleneksel statik kültür yönteminde, üretkenlik düşük olduğundan ve uzun kültür süresi gerektiğinden endüstriyel uygulamalarda genellikle tercih edilmek istenmeyen pahalı bir yöntemdir. Diğer bir yöntem sub-merged fermantasyon yöntemidir. Bu yöntemde iki ana endişe vardır: (1) yetersiz oksijen kaynağı ve üretilen BS'nin düzensiz şekli ve (2) BS üretmeyen mutantların ajitasyon kültüründe aynı anda birikmesidir. Bir diğer yöntem Airlift reaktör sistemidir. Airlift reaktör, karıştırmalı biyoreaktörle karşılaştırıldığında daha düşük güç kaynağı gerektirir. Airlift biyoreaktör, BS üretimi için başka bir seçenektir. Alttan hava veya oksijenle zenginleştirilmiş hava sağlanan bu sistem bugüne kadar en verimli BS elde edilen sistemdir [39].

Bakteriyel selüloz üretimini etkileyen önemli faktörler; kullanılan karbon ve azot kaynakları, oksijen miktarı, pH ve sıcaklık derecesidir.

- **Bakteriyel Selüloz Üretimine Karbon ve Azot Kaynaklarının Etkisi**

Her ne kadar *Gluconacetobacter* (eski adıyla *Acetobacter*), *Agrobacterium, Aerobacter, Achromobacter, Alcaligenes, Azotobacter, Rhizobium, Sarcina, Salmonella, Escherichia* vb. mikroorganizmalar BS sentezleyen bakteriler olsa da, üretilen BS'nin kalitesi ve miktarına, üreme ortamında bulunan azot ve karbon kaynaklarının kompozisyonu ve oranının büyük etkisi olmaktadır [36]. Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda BS üretimi için birçok farklı karbon kaynağı kullanılması ile birlikte en çok karbon kaynağı olarak glikoz ve azot kaynağı olarak da maya ekstratının kullanıldığı koşullarda en verimli BS gerçekleştiği sonucuna varılmıştır [40].

Selüloz oluşumunu teşvik etmek için ortamın optimizasyonu önemlidir. Üretilecek olan BS'nin verimi, mikroorganizmalar için gerekli besin maddelerine, sıcaklığa, pH'a, kültür tipine ve katkı maddelerine bağlıdır. Bu parametreler değiştirilerek BS'nin farklı bir bileşimi, farklı morfolojisi ve özellikleri elde edilebilir. Her bir suş için en uygun besinleri bulmak için bakteri suşu, öncelikle klasik Hestrin-Schram (HS) ortamın varyasyonları, karbon veya nitrojen kaynakları değiştirilerek test edilmektedir. Genel olarak BS üretiminde karbon kaynakları olarak glikozdan, sukrozdan, fruktozdan, gliserol, mannitol ve arabitoldan yararlanılmaktadır. Bir karbon kaynağı olarak glikoz, yalnızca bir enerji kaynağı olarak değil, aynı zamanda bir selüloz öncüsü olarak da işlev görür. Glukoz öncelikle (keto) glukonik asitlere dönüştürülür, bu da glikozun BS üretimi için sınırlı faydası olmasını sağlar, çünkü bu durum pH'da bir düşmeye neden olmaktadır. Bu nedenle yüksek verimli BS üretimi için endüstriyel atıklardan veya diğer süreçlerin yan ürünlerinden uygun maliyetli yeni karbon ve azot kaynakları bulmak önemli bir çalışma alanıdır. Maya özütü ve pepton, BS üretiminde en yaygın kullanılan azot kaynaklarıdır.

- **Bakteriyel Selüloz Üretimine pH ve Sıcaklığın Etkisi**

Her BS üreten suşun maksimum hücre büyümesi için spesifik bir ortamı olması gereklidir. Bakteri suşlarının çoğu, 24-72 saat süreyle HS ortamında veya mısır likörü ve fruktoz ortamında (CSL-Fru) 28–30 °C'de inkübe edilmektedir. Seçilen

besin ortamında, maksimum BS üretimi için uygun karbon ve azot kaynaklarının bulunması önemlidir [41].

Bakterilerin büyümesi ve BS üretimi için optimum pH'ın, kullanılan bakteri türüne bağlı olduğu, ancak pH derecesinin genellikle 4-7 aralığında olduğu gösterilmiştir. BS üretimi, 4.5 ile 7.5 arasındaki geniş pH aralıklarında gözlemlenebilmektedir ve en yüksek BS üretiminin pH 6.5'te gerçekleştiği bilinmektedir. Ayrıca kültür ortamının pH'ının, şekerlerin ve azot kaynaklarının tüketilmesi sırasında üretilen glukonik, asetik veya laktik asitler gibi ikincil metabolitlerin birikmesinden dolayı zamanın bir fonksiyonu olarak düşebileceğine dikkat edilmelidir. Bu nedenle, maksimum BS verimi için kültür ortamının pH'ını korumak önemlidir. Bu bağlamda, kültür ortamının pH'ını korumak için kültür ortamına bir tampon eklenmesi tercih edilebilmektedir [34].

2.3.4 Bakteriyel Selülozun Uygulama Alanları

Sadece birkaç fakat spesifik mikrobiyal tür tarafından üretilen bakteriyel selüloz, son derece saf doğal bir ekzopolisakkarittir. Bakteriyel selüloz, yapışkan özellikleri ve nano yapılı matrisi sebebiyle çeşitli tıbbi uygulamalar ve tıbbi olmayan uygulamalar için geniş çapta araştırılmaktadır. Biyotıpta çeşitli kullanım alanları bulması nedeniyle çeşitli şekil ve formlarda üretimleri araştırılmaktadır. Bakteriyel selülozun biyouyumluluk, hemouyumluluk, mekanik mukavemet, mikro gözeneklilik ve biyobozunurluk gibi özellikleri, benzersiz yüzey kimyası ile çok sayıda biyomedikal uygulama için ideal olmasını sağlar. Ayrıca, BS, doku mühendisliği için implantlar ve yapı iskelelerinden, ilaç dağıtımı için taşıyıcılara, yara pansuman malzemelerine kadar geniş bir uygulama alanına sahiptir [35].

Bir mikrobiyal polisakkarit olan bakteriyel selüloz, yüksek saflığı, bulunduğu ortamda lezzet ve renk değişimi ve çeşitli şekil ve dokular oluşturma kabiliyeti nedeniyle bir gıda bileşeni olarak önemli bir potansiyele sahiptir. Nano ölçekli bir fiber olarak 3 boyutlu bir ağ yapısı oluşturabilir. BS'nin gıda uygulamalarında koyulaştırma, jelleştirme, stabilize etme, su bağlama ve paketleme malzemesi olarak potansiyel kullanımları vardır. Diyette lifli gıdaların bir dizi sağlık yararı sağladığı ve diyabet, obezite, kardiyovasküler hastalık ve divertikülit gibi kronik hastalık riskini azaltmaya yardımcı olabileceği iyi bilinmektedir. Bakteriyel selüloz,

bir diyet lifi türüdür ve düzenleyici özelliğe sahiptir. Diğer diyet lifi (DF) ile karşılaştırıldığında, BS'in çeşitli avantajları vardır:

i. Mikroorganizma tarafından üretilen bakteriyel selüloz, oldukça saf bir selüloz formudur ve bitki kaynaklarından elde edilen selüloz için gerekli olduğu gibi izole etmek ve saflaştırmak için sert kimyasal işlemler gerektirmez.
ii. Bakteriler, ortamın lezzetini ve rengini yerinde büyütmek, çoğaltmak ve salgılamak için meyve şurubu gibi bir kültür ortamı kaynağını kullanabilmektedir. Bu besiyerinde kültürlenen BS, meyvenin doğal aromasını ve pigmentini alabilmektedir.
iii. Filmler, çok şekilli hamurlar, filamentler, küreler, parçacıklar vb. gibi bir dizi şekil ve doku üretmek, BS'ye gıda da birçok farklı uygulama alanı sağlayabilmektedir.
iv. BS' lifleri, BS'nin yeni gıda üretim süreçlerinde kullanılmasını sağlayan ince bir üç boyutlu ağ yapısına sahip nano ölçektedir.

Filipin kökenli Nata adlı bakteriyel selüloz jel, Güneydoğu Asya'da geleneksel bir tatlıdır. Pürüzsüz ağız hissi ve basit üretim süreci nedeniyle, bu yiyecek çok popülerdir. Nata de coco ve Nata de pina gibi lezzetleri kültür ortamı kaynağı tarafından kontrol edilen birçok Nata türü vardır: Nata de coco'da hindistan cevizi kullanırken Nata de pina'da ananas aroması kullanılmaktadır [42].

BS, aynı zamanda yaygın olarak yara örtü materyal ve doku yaması olarak da kullanılmaktadır. Yara örtü malzemleri, üç boyutlu olup yarayı örtmeli, dış enfeksiyona karşı fiziksel bir bariyer görevi görmeli ve hücresel destek sağlamalıdır. Başarılı bir doku iskelesi, hücresel bağlanma, çoğalma ve farklılaşmayı kolaylaştırmak için uygun bir yüzey kimyasına sahip olmanın yanı sıra uygun fiziksel ve mekanik özelliklere sahip olmalıdır. BS, statik kültür koşullarında oluşan kalın, jelatinimsi zar, yüksek oranda tek eksenli olarak yönlendirilmiş ultra ince bir selüloz nanofiber ağından (3-8 nm) oluşan bir 3D yapı ile karakterize edilir. BS doğal bir hidrojeldir. Hidrojeller, büyük miktarlarda çözücü ile şişirilmiş üç boyutlu polimer ağları olarak tanımlanır. BS, esas olarak amorf yapısı nedeniyle kendi ağırlığının %99'una kadar su alabilen bir hidrojeldir. Benzersiz nano ölçekli üç boyutlu ağ yapısı sayesinde BS, yüksek su tutma, yüksek

mekanik mukavemet ve olağanüstü biyouyumluluğa sahiptir ve bu da çok çeşitli dokuların yenilenmesi için doğal bir iskele malzemesi olarak hizmet etmesini sağlamaktadır [32].

Bakteriyel selüloz, saflık, yüksek derecede gözeneklilik, sıvı ve gazlara karşı görece yüksek geçirgenlik, yüksek su alma kapasitesi, gerilme mukavemeti ve ultra ince ağ gibi daha iyi malzeme özelliklerine sahip çok yönlü bir biyopolimerdir. BS ve BS-hidrojellerinin gıda, kozmetik ve ilaç salınımı alanlarındaki uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. BS'nin gıdalardaki uygulamaları, geleneksel tatlı, düşük kolesterol diyeti, vejeteryan et ve gıda katkı maddesi ve diyete yardımcı olarak enzimlerin ve hücrelerin immobilizasyonu gibi yeni uygulamalara kadar uzanmaktadır. Kozmetikteki uygulamalar arasında yüz maskesi, yüz ovma, kişisel temizlik formülasyonları ve kontakt lensler bulunmaktadır. Kontrollü ilaç salınımı, transdermal ilaç salınımı, dental ilaç salınımı, protein salınımı, doku mühendisliği ilaç salınımı, makromoleküler ön ilaç salınımı BS'nin kullanım alanlarındadır. BS'nin gıda ve kozmetikteki uygulamaları, BS bazlı fonksiyonel gıdalar, nutrasötikler, kozmetikler ve ilaçlı kozmetiklerdir [33].

2.4 Kıkırdak Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği günümüzde kayıp veya işlevini yitirmiş organların tedavisinde kullanılan başlıca yöntemlerden biridir. Yapay doku ve organ üretiminde hücre kültürü çalışmaları ve malzeme bilimindeki gelişmeler yakından takip edilerek birbiri ile entegre bir çalışma prosedürleri kullanılmaktadır. Kas ve iskelet sisteminin kıkırdak, bağ ve tendon dokularının tedavisi ve iyileşme süreci organize onarım dokusu ile gerçekleşmektedir. Organize onarım dokusunun orijinal dokunun mekanik ve fizyolojik olarak birebir özelliklerini taşımamasından kaynaklı kronik yetersizlikler ve tedavi sürecinde sorunlar yaşanabilmektedir. Doku mühendisliğinin bu alandaki temel amacı, yaralı bölge ile tamamen uyumlu ve orjinal doku ile aynı özellikleri taşıyan bir sistem ile normal bir doku yenilenmesini sağlamaktır [43, 44].

2.4.1 Kıkırdak Dokusu ve İşlevi

Eklem kıkırdağı insanda hareket edebilme işlevini yerine getirmek için ileri derecede farklılaşmış dokudur ve sınırlı iyileşme özelliğine sahiptir.

Hiyalin kıkırdak yapısındaki eklem kıkırdağı ağırlıklı olarak kondrosit ve tip II kolajenlerden oluşan ekstrasellüker matriks (hücreler arası ağ) tabakasını içerir. Hücreler arası ağın üç boyutlu yapısında bulunan proteoglikanlar fibriller ile hücreleri birleştirir ve bu proteoglikan yapı; yük taşıma, darbe soğurma ve kayma gibi özelliklere sahiptir. Hücreler arası ağ; su, elektrolit, kolajen ve proteoglikanları içerir.

Eklem kıkırdağı, hücreler arası ağı sentezleyen ve mezankimal kondroblastlardan farklılaşan kondrosit hücrelerini içerir. Kondrosit hücreler, hücreler arası ağın içerisinde az yoğunlukta bulunmaktadır. Kıkırdak doku damar ve sinir içermez bu sebeple düzensiz sıkı bağ dokusu olan perikondriyumdan beslenir fakat eklem kıkırdağı perikondriyum içermediğinden eklem kıkırdağı ve eklem kıkırdağında bulunan kondrosit hücreler, eklem kapsülünün iç kısmıdan bulunan sinovyal sıvısından beslenir. Bu sebeple kıkırdak yaralanmalarında kondrosit hücrelerin onarım gücü sınırlıdır.

Hücreler arası ağ ile kondrosit hücrelerin arasındaki etkileşim hayat boyunca dokunun sürekliliğinin sağlanması bakımından son derece önemlidir. Yaşam boyunca olağan eklem hareketleri sırasında ağ, kondrositleri mekanik yaralanmalardan korumaktadır. Kondrositler ise yaşamları boyunca ağ moleküllerini sentezlerler ve parçalarlar.

Ağ yapısı, kondrositlere uyarı oluştururlar. Eklem yüzeyinde gerçekleşen mekanik değişiklikler ağ aracılığı ile kondrositlere iletilir ve kondrositler ağ sentezini yönledirebilmektedir. Ayrıca ağ yapısı dokuya karşı gerçekleşen yüklenme eylemlerinin süresini kaydederek dokunun yanıtının değişmesine sebep olabilmektedir [43, 44].

Eklem kıkırdağı kendi kendini yeterli derecede onaramadığından çoğu bilim insanı kıkırdak iyileşmesi çalışmalarına yoğunlaşmıştır. Olgun eklem kıkırdağı kayıpları iki şekilde olur. Bunlardan ilki tam kat olarak da bilinen subkondral kemiğe kadar gerçekleşen kayıplar fibröz kıkırdak ile iyileşebilmektedir. İkinci kayıp şekli ise subkondral kemiğe uzanmayan, yüzeysel olarak gerçekleşen kayıplardır [45].

Eklem kıkırdağının hasar alması sonrasındaki iyileşme sürecindeki sorunlar bilim insanlarını, biyoloji ve mekanik olarak orijinal eklem kıkırdağı ile aynı özellikleri taşıyan dokular elde etmek için çalışmalar yapmaya yöneltmiştir. Bu bağlamda

yapılan yapay doku ve organ çalışmalarında kolay bir şekilde elde edilebilecek ve üretimi sırasında zorluk yaşanmayacak hücrelerin kullanımı tercih edilmektedir.

Özellikle gençlik çağına kadar yaşanan spor aktivitelerinden kaynaklı gerçekleşen kıkırdak yaralanmalarında kıkırdağın kendi kendini onaramaması sorun teşkil etmektedir. Yaşanan bu kıkırdak yaralanmalarının onarımı için Amerika Birleşik Devletleri (ABD) her yıl yaklaşık 1.000.000 cerrahi işlem gerçekleştirmektedir. Zamanında tedavisi doğru yapılmayan kıkırdak yaralanmalarının sonraki yıllarda kireçlenme gibi daha farklı ve kalıcı sorunlara evrilebileceği olası bir durumdur. Bu gibi sonuçların yaşanmaması için kıkırdak yaralanmalarının zamanında ve doğru onarımının yapılması büyük önem taşımaktadır [43, 45].

Travma nedeniyle hasar gören kıkırdağın yenilenme kapasitesi sınırlıdır. Küçük kondral defektleri tedavi etmek için mevcut yöntemler arasında artroskopik debridman ve lavaj ile palyatif tedavi, kemik iliği stimülasyon teknikleriyle (örneğin mikrokırık) onarıcı tedavi ve osteokondral aşılama ve otolog kondrosit implantasyonu dahil onarıcı tedavi yer almaktadır. Daha büyük kusurlar ise, osteokondral allogreftleme veya toplam eklem replasmanları ile tedavi edilmektedir. Bununla birlikte, kıkırdak kusurlarını tedavi etmenin geleceği, kıkırdak rejenerasyonu yoluyla biyolojik çözümler sağlamakta yatmaktadır. Laboratuvar ve klinik çalışmalar, daha büyük lezyonların doku mühendisliği ile tasarlanmış kıkırdak kullanılarak tedavisini araştırmaktadır. Rejenere kıkırdak, kondrositler, mezenkimal kök hücreler ve pluripotent kök hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinden elde edilebilmektedir. Yaygın iskele malzemeleri arasında proteinler, karbonhidratlar, sentetik malzemeler ve kompozit polimerler bulunmaktadır. Kıkırdak iskeleleri nanofiberlere sahip bükülebilir özellikteki veya hidrojeller olarak yapılandırılabilinmektedir. Kondrojenez, kondroindüktif büyüme faktörlerinin bu iskelelerin yapılarına uygulanmasıyla arttırılabilinmektedir [46].

Günümüzde kıkırdak hasarlarının onarımı için çeşitli tedavi yöntemleri gerçekleştirilmektedir. Bu tedavi yöntemlerinden biri, ABD'de bulunan Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration (FDA)) tarafından onaylı yapay ortamda üretilen kıkırdak hücrelerinin yeniden kişiye aktarılmasıdır. Bu yöntemin çözülmesi gereken bazı sorunları vardır. Bu sorunların en önemlileri, yapay

ortamda üretimi yapılmış hücrelerde gerçekleşen farklılaşma ve hücreler arası ağın gelişememesi gelmektedir. Kıkırdak yaralanmalarının onarımında kullanılan diğer yöntemler ise otolog/kök hücre aktarımı, yapay ağ kombinasyonlarının ve sinyal moleküllerinin uygulanmasıdır.

Kıkırdak dokusunda gerçekleşen hasar sonrasında diğer dokulara göre çok daha farklı enflamatuar yanıt oluşur. Bunun başlıca sebebi kıkırdak yapısının avasküler yapıda olmasıdır. Kıkırdak dokunun onarımında, vasküler yapılarda iyileşme sırasında gerçekleşen son iki faz gerçekleşmemektedir. Kıkırdak dokunun iyileşmeyi zorlaştıran yapısına ek olarak kollajen ve proteoglikan ağ içerisinde bulunan kondrositlerin yaralı bölgeye hareket etmemesi de sahip olduğu diğer bir dezavantajdır [47].

Kıkırdak hasarlarında veya kayıplarında yapılan tedavilerde hücre, gen tedavisi ya da büyüme faktörlerinden hangisi kullanılacak olursa olsun iskeleti oluşturacak olan bir ağa ihtiyaç duyulmaktadır. İskelet görevi gören bu ağ olmadan hasarlı bölgeye iyileşmeyi sağlayacak olan maddeler verilse de iyileşme gerçekleşmemektedir. Bu sebeple iskelet görevi görecek olan ağın bölgeye uygun olarak seçilmesi tedavinin en önemli basamaklarındandır [48].

2.4.2 Yapay Kıkırdak

İnsan vücudunda, fibrokartilaj, hiyalin kıkırdak ve elastik kıkırdak olmak üzere 3 çeşit kıkırdak vardır. Tüm bu kıkırdak tiplerinde farklı konsantrasyonlarda proteoglikanlar, kollajenler ve su gibi bileşenler bulunmaktadır.

Yapay kıkırdak, insan vücudundaki doğal kıkırdağın işlevsel özelliklerini taklit etmeyi amaçlayan hidrojel veya polimerlerden yapılmış sentetik bir malzemedir. Doku mühendisliği prensipleri, kıkırdağın yerini alabilecek parçalanamayan ve biyouyumlu bir materyal oluşturmak için kullanılır.

Eklem kıkırdağı hasarının tedavisi, ortopedi tıp biliminde çalışma alanlarındandır. Hidrojeller, sulu bir faza daldırıldığında polimerik şişebilirliğe sahip olduklarından, çok işlevli kıkırdak desteği oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu malzemelerin kondrojenik fenotipi, canlı hücrelerin iskele yapısına yüklenmesi ie geliştirilebilir. Biyolojik olarak türetilmiş ve sentezlenmiş polimerik malzemelerden üretilen yapay hidrojeller, kontrollü bozunma profilleri ile uyarıcı büyüme faktörlerinin

salınımına da sağlamaktadır. Bu hidrojellerden yararlanmak için, fizyolojik kıkırdağın biyonik mekanik davranışlarını göstermesi gerekmektedir. Enjekte edilebilir polimerik hidrojelleri elde etmek için sentetik veya doğal bir dizi biyomedikal malzeme bulunmaktadır. Bu malzemeler poli(vinil alkol) , poli(etilen glikol) (PEG) veya kolajen, hiyalüronik asit, aljinat, kondroitin sülfat içermektedir. Heparin, jelatin ve kitosan da bu alanda tercih edilen malzemelerdir. Bunlara ek olarak bazı peptit moleküllerinin iskele yapısına ilave edilmesi, hücre dışı matrisin doğal içgüdülerini biyotaklit etmek ve potansiyel olarak performansı artırmak için önemlidir [49].

3
MATERYAL – METOD

3.1 Materyal

Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzemeler

- L929 hücre hattı
- DMEM-F12 besi yeri
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- Fetal bovine serum (FBS)
- Ethanol
- Tripsin EDTA
- Tripan blue
- 75 cm^2 flask
- 25 cm^2 flask
- 96 kuyulu hücre kültür plakaları
- 24 kuyulu hücre kültür plakaları
- Nitril eldiven
- Falkon Tüp
- Fosfat Buffered Saline (PBS) Tablet
- Dimetil sülfoksit (DMSO)
- Steril pipetler tek kullanımlık - 2 ml
- Steril pipetler tek kullanımlık - 5 ml
- Steril pipetler tek kullanımlık - 10 ml
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)

Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

- Total Antioxidant Status (TAS) Test Kiti
- Total Oxidant Status (TOS) Test Kiti
- CD1 Human Elisa Kit
- TP53/P53 Elisa Kit

Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar



Şekil 3.1 Taramalı elektron mikroskobu (Zeiss, EVO® LS 10)



Şekil 3.2 Bet yüzey alanı cihazı (Quantachrome, QuadraSorb SI)



Şekil 3.3 FTIR spektrofotometresi (Perkin Elmer Spectrum 100)



Şekil 3.4 TG/DTA (SII Nanotechnology, SII6000 Exstar TG/DTA 6300)



Şekil 3.5 Elisa reader (Thermo Scientific, Multiskan GO)



Şekil 3.6 İnverted mikroskop (Zeiss, Zen Blue2)



Şekil 3.7 CO_2 inkübatörü (Esco, CelCulture CO_2 INCUBATOR)



Şekil 3.8 Çalkalamalı su banyosu (Memmert WNB 29)



Şekil 3.9 Flow kabin (Esco, Sentinel PLATINUM, Class II)



Şekil 3.10 Santrifüj (Hermle, Z 206 A)

3.2 Metod

Sunulan tez çalışmasının metod kısmı bakteriyel selülozun sentezlenmesini, BS'nin karakterizasyon çalışmalarını, hücre kültürü çalışmalarını ve kondrosit hücre yüklenmesini kapsamaktadır.

3.2.1 Bakteriyel Selülozun Sentezlenmesi

Çalışmada kullanılacak olan bakteriyel selüloz, bir bakteri türü olan *Acetobacter xylinum* tarafından üretilecek ve ardından üretilen bakteriyel selülozun karakterizasyon çalışmaları yapılacaktır.

Bakterileri canlandırmak için kullanılacak olan inokulum besi yeri hazırlamak için hassas terazide ölçümü yapılan 2,5 g/L glikoz, 0,3 g/L pepton ve 0,5 g/L maya özütü erlene eklenmiştir ve 100 ml distile su konulmuştur. Hazırlanan bu karışımın pH'ını 5'e ayarlayabilmek için 0,3 g/L HCL damlatılmıştır daha sonra hazırlanan bu karışım 120°C'de 20 dk otoklavlanmıştır. Otoklavlanan besiyerine bakteri eklenmiştir ve 30°C'de 150 rpm de 2 gün kalacak şekilde etüve konulmuştur. Selüloz üretimi için 2 g/L glikoz, 1 g/L pepton,1 g/L maya özütü ve 1,2 mM K_2HPO_4 hassas terazide tartılarak erlene aktarılmıştır. 100 mL distile su eklenerek ve pH metre ile pH'ın 5 olması için HCl eklenerek ölçümü yapılmıştır. Hazırlanan bu karışım 120°C'de 20 dk otoklavlanmıştır. Besi ortamı daha sonra %10'luk inokulum ilavesi ile farklı derinliklerde deney kaplarına konulmuştur. Bu işlem sonrasında numuneler 7 gün boyunca 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 7.günün sonunda alınan membranlar, 1M NaOH ile 80°C'de 2 saat su banyosunda

bekletilmiştir böylece tüm bakteriyel ve hücresel kirliliklerden membran arıtılmıştır. Daha sonra defalarca DI su ile yıkanarak pH'ın 7 olması sağlanmıştır. Son olarak liyofilizasyon işlemi ile bir gece boyunca membran kurutulmuştur. BS üretim aşamaları Şekil 3.11'de gösterilmiştir.



Şekil 3.11 Bakteriyel selülozun sentez aşamaları

3.2.2 Bakteriyel Selülozun Karakterizasyonu

3.2.2.1 Termogravimetrik Analizi

Termogravimetrik analiz (TG) yöntemi, atmosferde bulunan bir numunenin belirli bir ortamda sabit bir hızla ısıtıldığında ya da soğutulduğunda gösterdiği kütlesel değişimlerinin zamanın ve sıcaklığın fonksiyonu olarak kaydedildiği bir tekniktir. Numunenin sıcaklık değişimleri karşısında gösterdiği kütle kaybı, numunenin dekompozisyon (bozunma) sıcaklığını göstermektedir.

TG analiz eğrilerinde genel olarak 3 önemli bölge bulunur. Bunlar numunenin kütlesinin arttığı, azaldığı eğriler ve kütlenin sabit kaldığı yatay eğrilerin olduğu bölgelerdir. İncelenen numunenin kararlılığının tespiti için bu 3 bölge arasından TG eğrilerindeki yatay bölge en önemli kısımlardır [50, 51].

Diferansiyel termal analiz (DTA) tekniğinde ise, numune ile referans madde arasındaki sıcaklık farkı sıcaklığın bir fonksiyonu olarak incelenmektedir. Bu yönteme matematiksel olarak bakıldığında, numunenin kütle değişiminin zamana göre türevini deneysel olarak kaydeden bir yöntem olduğu için TG ile yakından ilgilidir [50, 52].

TG/DTA analizi için kullanılan cihaz ise aynı anda bir numunenin hem diferansiyel termal analizini hem de termogravimetrik analizini inceleyip kaydedebilen bir yönteme sahiptir. Bu iki farklı analizin sonuçlarını birleştirerek tek bir grafik üzerinde gösterir.

Bakteriyel selülozun termal özellikleri, TG/DTA ölçümleri ile belirlenerek analiz edilmiştir. (SII Nanotechnology, SII6000 Exstar TG/DTA 6300). Alüminyum penlere yerleştirilen malzemeler dinamik bir hava ve azot atmosferi altında, 10 °C/ dk ısıtma hızlarında ısıtılmış ve kütle kaybı takip edilmiştir. Analiz 25°C - 600°C aralığında 90 dakika sürmüştür.

3.2.2.2 Zayıflatılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR)

FTIR spektroskopik görüntüleme, çok çeşitli numunelere ve sistemlere uygulanabilen bir kimyasal görüntüleme tekniğidir. Bu tekniğin biyomedikal alanındaki önemli potansiyeli, tanıtılan bir dizi yeni uygulama ile fark edilmeye başlanmıştır. FTIR görüntülemenin ana avantajlarından biri, hızlı ve etiketsiz bir görüntüleme teknolojisi olmasıdır. Bu nedenle, herhangi bir boya veya etiketleme metodolojisine gerek olmaması biyomedikal uygulamalar için avantaj sağlamaktadır.

Geleneksel ATR-FTIR spektroskopisi yüksek kırılma indeksli bir malzeme (bir dahili yansıma elemanı) ve bir kızılötesi emici düşük kırılma indeksli malzeme (numune) arasındaki bir arayüzde dahili olarak yansıtılır. Işık, penetrasyon derinliği (elektrik alan gücünün azaldığı mesafe) ile birlikte kaybolan bir dalga olarak numuneye nüfuz eder. ATR-FTIR ölçümleri için tipik dp değerleri 0,2 mm ile 5 mm arasında değişmektedir. Işığın numuneye dp'nin ötesinde nüfuz ettiğini ve numuneden toplanan bilgilerin dp değerinin 2 ila 3 katına kadar çıktığını not etmek önemlidir.

ATR modunda FTIR görüntüleme, ATR-FTIR spektroskopisinin görüntüleme teknolojileriyle birleşimine dayanır. Konvansiyonel ATR-FTIR spektroskopisinde tek element detektörü kullanılır ve her ölçümde tek bir spektrum toplanır. Daha sonra toplanan spektrum, ışığın içinden geçtiği numune alanından gelen ortalama sinyali temsil eder. ATR-FTIR görüntülemede, bir dizi detektör kullanılarak çok sayıda uzamsal olarak çözümlenmiş ATR spektrumu toplanır [53].

3.2.2.3 Yüzey Morfoloji Analizi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), mikro yapı morfolojisi ve kimyasal bileşim karakterizasyonlarının incelenmesi ve analizi için mevcut en çok yönlü araçlardan biridir. Yardımsız göz, yaklaşık $1/60^{o}$ görüş açısına sahip nesneleri ayırt edebilir, bu da ~0,1 mm çözünürlüğe karşılık gelir (optimum 25 cm görüş mesafesinde). Optik mikroskopi, optik lens aracılığıyla görsel açıyı genişleterek ~2.000 Å çözünürlük sınırına sahiptir.

Işık mikroskobu, bilimsel araştırmalar için büyük önem taşımaktadır. 1890'larda yapılan çok sayıda deneyde elektronların manyetik alan tarafından saptırılabileceğinin keşfinden beri, ışık kaynağının yüksek enerjili elektron ışını ile değiştirilmesiyle elektron mikroskobu geliştirilmiştir.

SEM'in temel prensibi olan elastik saçılma, gelen elektronun numune atom çekirdeği veya benzer enerjiye sahip dış kabuk elektronları tarafından saptırılmasından kaynaklanmaktadır. Bu tür bir etkileşim, çarpışma sırasında ihmal edilebilir enerji kaybı ve saçılan elektronun geniş açılı yön değişimi ile karakterize edilmektedir. 90^{o}'den daha büyük bir açıyla elastik olarak saçılan olay elektronlarına geri saçılan elektronlar denir ve numuneyi görüntülemek için faydalı bir sinyal verirler. Elastik olmayan saçılma, gelen elektronlar ile numunenin elektronları ve atomları arasındaki çeşitli etkileşimler yoluyla meydana gelir ve birincil ışın elektronunun bu atoma önemli miktarda enerji aktarmasıyla sonuçlanır. Enerji kaybı miktarı, numune elektronlarının tek tek mi yoksa toplu olarak mı uyarıldığına ve elektronun atoma bağlanma enerjisine bağlı olarak değişir. Sonuç olarak, numune atomlarının iyonizasyonu sırasında numune elektronlarının uyarılması, geleneksel olarak 50 eV'den daha düşük enerjilere sahip olarak tanımlanan ikincil elektronların üretilmesine yol açar ve bu elektronların görüntülenmesi veya analiz edilmesi için kullanılmaktadır. Bir görüntü oluşturmak için kullanılan sinyallere ek olarak, bir elektron ışını bir numuneye çarptığında, karakteristik x-ışınları emisyonu, Auger elektronları ve katodolüminesans dahil olmak üzere bir dizi başka sinyal de üretmektedir. Bu sinyallere göre incelenecek olan numunenin yüzey morfolojisi veya elementel içeriği analiz edilebilinmektedir [54].

3.2.2.4 Yüzey Alanı Analizi

Elde edilen membranların yüzey alanının yüksek olması önemlidir. Yüzey alanı ne kadar yüksek olursa, su tutma kapasitesi ve hücre tutunma miktarının orantılı olarak yüksek olması beklenmektedir.

1900'lerin ortalarına doğru Brunauer, Emmet ve Teller tarafından geliştirilen BET analiz yöntemi, 1950'lerin sonlarında Haul ve Dümbgen tarafından ortaya çıkartılan cihazın geliştirilmesi sonucunda son halini almıştır. BET cihazının çalışma prensibi gaz basıncı yardımı ile katı maddelerin yüzey alanının ölçülmesine dayanmaktadır. Ölçümü yapılacak örneğin gaz basıncına maruz bırakıldığı ve örneğin gözenekli yapısı tarafından gazın absorbe edildikten sonraki gaz basıncı P ile ifade edilmektedir. Örneğe uygulanan gazın ilk basıncı ise P0 ile ifade edilmektedir. P/P0 formülü ile katı örneğin yüzey alanı hesaplanmaktadır.

Bakteriyel selülozun yüzey alanı BET yüzey alanı cihazı (Quantachrome, Quadrasorb SI) ile belirlenmiştir.

3.2.2.5 Bakteriyel Selülozun Su Tutma Kapasitesi

Bakteriyel selülozların su tutma kapasitesini belirlemek üzere şişme testi yapılmıştır. Öncelikle kuru ağırlıkları hassas tartı ile ölçülen bakteriyel selülozların ağırlıkları kaydedilmiştir. Kuru ağırlıkları tartılan bakteriyel selülozlar, distile suyun içerisinde 2 saat bekletilmiştir. 2 saat sonunda distile sudan çıkartılan bakteriyel selülozların yüzeyindeki fazla su, Kim mendil kâğıdına emdirilmiştir. Fazla suyu alınan bakteriyel selülozların ıslak ağırlıkları ölçülmüştür. 5 farklı numuneye aynı prosedür uygulanmıştır ve ıslak ağırlıkları da not edilen bakteriyel selülozların su tutma yüzdeleri aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmıştır.

$$Şişme(\%) = (W_h - W_d) / W_d \quad (3.1)$$

W_h: Islak BS ağırlığı, W_d: Kuru BS ağırlığı

3.2.3 Hücre Adezyon Çalışmaları

Doku veya organdan izole edilen belirli hücre gruplarının in vitro ortamda, uygun şartlara adaptasyonu sağlanarak çoğaltılması işlemine hücre kültürü çalışmaları denilmektedir. Canlı türlerinin farklı dokularından çıkartılan dokulardan hücreler açığa çıkartılır ve bu çıkartılan hücreler, içerisinde mineraller, proteinler ve temel aminoasitler bulunduran belirli bazı besiyerlerine 37^0C'de entegre edilir.

Entegrasyon sonrasında bu yüzeylere tutunması sağlanan hücrelerin üremesi sağlanır. Bu yapılan çalışmalarda amaç, izole edilen hücre gruplarının canlılığını koruyarak çoğalmasını sağlamak ve farklı birçok çalışamada kullanılmasını sağlamaktır.

Hücre kültürü çalışmalarının tarihsel sürecine baktığımızda; ilk çalışma 1885 yılında Roux tarafından embriyonik civciv hücrelerinin vücudun dışında serum çözeltisi içerisinde canlı kalmalarını sağlayabilmek üzerinedir. İlerleyen yıllarda Gey ve arkadaşları, insan serviks kanser hücrelerinden bir hücre hattı elde etmişlerdir ve bu hücre hattına Hela hücre hattı denilmektedir. Hela hücre hattı keşfinin ardından teknolojininde ilerlemesi sayesinde birçok kanserli veya sağlıklı dokudan izole edilerek oluşturulan farklı hücre hatları geliştirilmiştir [55].

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücreler morfolojik özelliklerine göre 3'e ayrılırlar. Bunlar, fibroblastik hücre, epiteliyal hücre, lenfoblast hücrelerdir [56, 57].

Fibroblastik hücreler; bipolar veya multipolar, uzun bir forma sahiptirler ve yüzeye tutunarak büyüme gerçekleştirirler. Mikroskop ile bakıldığında uzun iplik görüntüsüne benzeyen bir görüntü verirler.

Epitelyal hücreler; poligonal şekilde ve çokgen, dikdörtgen gibi geometrik şekillere benzeyen morfolojiye sahip olan bu grup da yüzeye tutunarak büyüme gerçekleştirirler.

Lenfoblast hücreler; morfolojik olarak yuvarlak küre şeklinde olup büyümeleri süspanse halde olur. Mikroskop ile bakıldığında üzümün tanelerini andıran çoklu bir görüntü verirler.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak olan hücrenin hangi morfolojik özelliğe sahip olduğunu bilmek çalışmadaki kontaminasyon riskine hakim olabilmek ve bu riskin takibini sağlayabilmek açısından önemlidir. Örneğin aynı anda farklı morfolojilere sahip hücrelerle çalışılan bir ortamda çapraz kontaminasyon denilen farklı hücrelerin birbiriyle kontamine olması durumu mikroskop altında bu bilgi sayesinde farkedilebilmektedir. Bunun yanı sıra aynı morfolojik özelliklere sahip hücrelerle çalışılan bir ortamda gerçekleşecek olan çapraz kontaminasyon durumu mikroskop altında incelendiğinde farkedilemez.

Hücre kültürü çalışmalarında bazı basamaklar standart olup bazı basamaklar ise zorunlu olarak kontrol altında tutulmayı gerektirir. Kontrol edilmesi zorunlu olan bu konular; hücrelerin herhangi bir sorun yaşamadan büyümelerini sağlayacak ve hücrelerin ihtiyacını karşılayacak olan besiyerinin pH'ı oksijen ve karbondioksit seviyesi ile optimum sıcaklığıdır [56, 58].

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan hücre hatları hücrenin türüne göre 3'e ayrılır. Bunlar; primer, sekonder ve devamlı hücre hatlarıdır.

Primer hücre hatları, doku ya da organdan izole edilen ilk hücrelerdir ve bu hücreler besiyerine aktarıldıktan sonra besiyerinin bulunduğu şişenin yüzeyine yapışarak çoğalırlar. Bu hücrelerin metabolik aktiviteleri oldukça yavaştır ve hücre üretimi en fazla 7-9 pasaj sürmektedir. Primer hücreler direkt olarak canlı dokudan alındığından kontaminasyon riski en yüksek olan hücre hattıdır.

Sekonder hücre hattı, primer hücre kültüründen elde edile ve pasaj sayısı 50 ila 100 arasında değişen fakat belli bir pasaj sayısına eriştikten sonra üreme yeteneğini kaybeden hücrelerden oluşmaktadır. Sekonder hücre hattı genel olarak fibroblastoid hücre tiplerinden oluşmaktadır.

Devamlı hücre hattı, bölünme yeteneğini kaybetmeyen ve sonsuz bölünebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Çoğunlukla kimyasal olarak yapısı bozulmuş hücrelerden ya da tümör dokusundan elde edilerek kültüre edilen ve bu sebeple normal hücrelere ait olan genotip ve fenotip özelliklerini taşımayan hücre hattıdır. Normal hücre kültürünün en az 50 alt kültürü işlemi yapıldıktan sonra devamlı hücre hatları oluşabilmektedir [59].

3.2.4 Kondrosit Hücre Hattı

Kondrosit hücreler, eklem kıkırdağının matriksi içerisinde bulunan laküna denen boşlukların içerisinde bulunurlar. Gelişimleri sırasında çoğunlukla morfolojik olarak yuvarlaktırlar fakat bu durumun bazı istisnaları vardır; farklı yaşlarda, patolojik durumlarda ve kıkırdağın tabakalarında bu istisnalar görülebilir.

Kondrosit hücreler metabolik ihtiyaçlarını matriks aracılı difüzyon ile karşılarlar. Kondrosit hücrelerin metabolik açıdan ihtiyaçları kıkırdağın tabakalarına göre değişiklik göstermektedir. Örnek vermek gerekirse, yüzeysel zon kondrosit hücreleri derin zon kondrosit hücrelerine göre farklı miktarlarda agrekan ve

proteoglikan sentezlerler. Bu farklı oranlarda sentezlerin gerçekleştiği matrikslerde de farklı oranlarda yük emilimleri ve dağıtımları gerçekleşmektedir.

Kondrosit hücrelerin yoğunluğu yaşa göre ters orantılı olarak değişmektedir. Biyolojik yaş arttıkça kondrosit yoğunluğu azalmaktadır. Buna karşın hücrenin yoğunluğu kıkırdağın bölgelerine göre değişiklik gösterebilmektedir; bacak kısmında menisküslerden kaynaklı korunan ve bu sebeple yük binmeyen bölgenin kondrosit yoğunluğuna göre yükün bindiği bölgenin kondrosit yoğunluğu çok daha azdır [60].

Biz bu çalışmada ilk olarak fare kondrosit hücrelerinin çalışma için yeterli büyüme ve yoğunluğa ulaşmalarını sağlamak amacıyla hücre kültür çalışmalarını gerçekleştirdik.
-80°C'den çıkartılan ve oda sıcaklığında bir süre bekletilen kondrosit hücreler falcon tüpe aktarılmıştır ve üzerine medium eklenmiştir. 2100 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan sıvı besiyeri uzaklaştırılmıştır ve hücrelerin oluşturduğu pellet üzerine 2 ml medium eklenerek 25 cm^3 flaska aktarılmıştır. Flask üzerine 5ml daha medium eklenerek 37°C etüvde büyümeye bırakılmıştır. Bir gün sonra hücrelerde büyüme ve çoğalmanın devam ettiği gözlemlenmiştir.

Çalışmada membran üzerine hücre adezyonunu belirlemek amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide or MTT) bir tetrazolyum tuzudur. Heterosiklik organik yapıda bileşiktir ve tetrazolyum tuzunun canlı hücre mitokondrisinde elektron alarak indirgenmeleri sonucunda formazan kristalleri denilen yapılar oluşur. Tetrazolyum halkası ancak aktif mitokondri tarafından kırılabilir ve böylece renk reaksiyonunu yalnızca canlı hücreler meydana getirebilirler. Ölü hücreler ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybeder ve herhangi bir renk değişimine neden olmazlar. Biz bu tez çalışmasında bakteriyal selüloz membranlar üzerine hücre tutunma kapasitesini belirlenmesi için MTT testi uyguladık. Öncelikle, kondrosit hücre hattı %10 FBS, % 1 L-glutamin içeren DMEM F-12 besiyerinde; 37^{o}C'de, %5 atmosferinde kültüre edilmiştir. 1cm uzunluğunda ve 1 cm genişliğinde kesilen membranlar üzerine inkübe edilen kondrosit hücreleri 500 hücre/membran konsantrasyonunda 24 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Membranlar 37^{o}C'de, %5

atmosferinde inkübe edilmiştir. Hücre ekiminden 24 saat sonra membranlara yapışan ve kültüre olan hücrelerin konsantrasyonunu belirlemek için amacıyla plate üzerinden membranlar alınarak başka bir 24 kuyucuklu plaklara alınmıştır. 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 570nm'de absorbansına bakılarak hücre canlılıkları değerlendirilmiştir. Çalışmada negatif kontrol olarak membran içermeyen sadece besin ve kondrosit hücreleri içeren örnekler, pozitif kontrol olarak da hücrelere toksik olan DMSO içeren medium kullanılmıştır.

4
SONUÇ VE ÖNERİLER

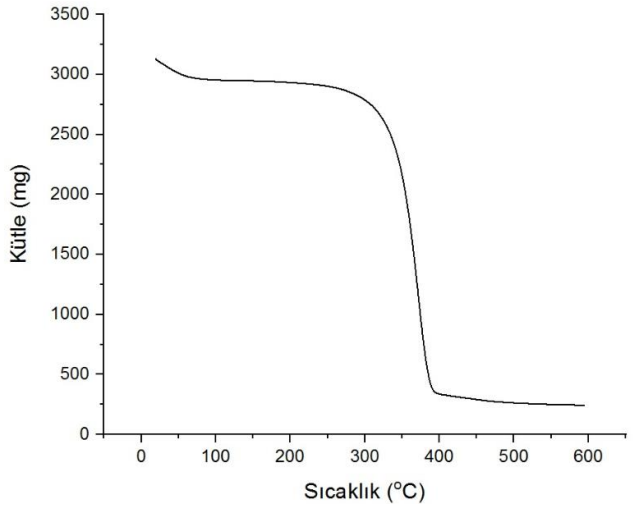
4.1 Bakteriyel Selülozun Karakterizasyon Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında iskelet olarak kullanılmak üzere sentezlenen bakteriyel selülozun karakterizasyonu için termogravimetrik analiz, yüzey alanı analizi, yüzey morfolojisi analizi ve FTIR spektrofotometresi ve analizleri yapılmıştır.

4.1.1 Termogravimetrik Analiz

Doku mühendisliği çalışmalarında elde edilen ve geliştirilen malzemelerin hem vücut ısısı ortamında hem de ısı ile gerçekleştirilen sterilizasyon işlemlerinde dayanıklılığı önem arz etmektedir. Dolayısı ile sentezlenen bakteriyel selülozun termal bozunma davranışlarının belirlenmesi için termogravimetrik analizi yapılmıştır.

Bakteriyel selüloz, kıkırdak implantı olarak kullanılması sebebiyle otoklavda steril edilmesinin kontrolünü sağlayabilmek adına termal dayanımının ölçülerek değerlendirilmesi gerekmiştir. Bakteriyel selülozun termal özellikleri termogravimetrik (TG)/diferansiyel termal analizinin (DTA) ölçümler ile belirlenmiştir (SII Nanotechnology, SII6000 Exstar TG/DTA 6300). Alüminyum penlere yerleştirilen malzemeler dinamik bir hava ve azot atmosferi altında, 10°C/ dk ısıtma hızlarında ısıtılmış ve kütle kaybı takip edilmiştir. Analiz 25°C-600°C aralığında 90 dakika sürmüştür.



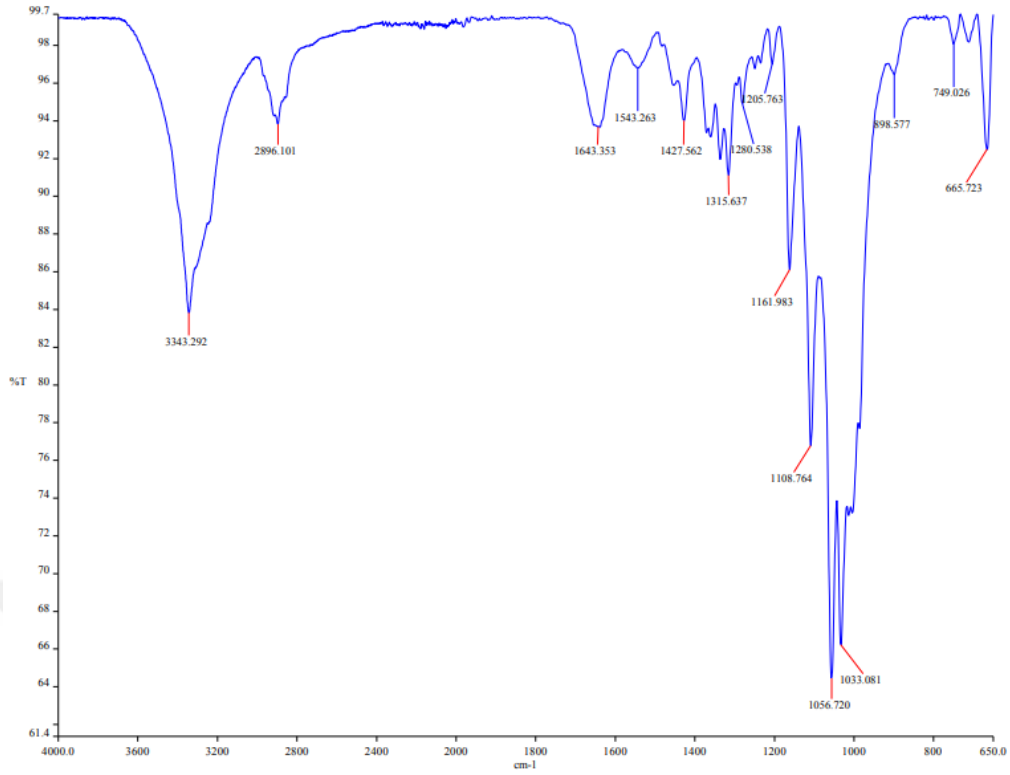
Şekil 4.1 Membranların sıcaklığa bağlı kütle kaybı

Şekil 4.1'de kademeli sıcaklık artışı sırasındaki incelemelerde, elde edilen membranın 100^0C sıcaklıktan 200^0C sıcaklıklara kadar sabit bir kütle kaybı gösterdiği görülmektedir. Ancak bozunmanın yüksek miktarda olmadığı görülmüştür. Özellikle 250^0C sonrasında hızlanan kütle kaybının 280^0C ve 390^0C derecelerde en yüksek değerde olduğu görülmektedir.

Barud ve arkadaşlarının BS'nin termal dayanımı ile ilgili yaptıkları çalışmada, oda sıcaklığından 200^0C'ye ve 200^0C'den 400^0C'ye kadar iki önemli kütle kaybının gözlemlendiği bildirmişlerdir. 30^0C ila 300^0C arasında meydana gelen ilk kütle kaybının membran dehidrasyonundan kaynaklandığını ve fiziksel olarak adsorbe edilmiş ve hidrojen bağına bağlı su moleküllerinin bu ilk aşamada gerçekleşen kaybının nedeni olduğunu açıklamışlardır. İkinci kütle kaybının ise termal bozunmadan kaynaklandığını bildirmişlerdir [61].

4.1.2 FTIR

Bakteriyel selüloz numuneleri üzerinde yapılan FTIR analizi ile 4 cm^{-1} çözünürlükte numune başına 200 tarama altında $4000cm^{-1}$ – $650cm^{-1}$ dalga sayısında ölçümler gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesinde numuneler 90°C ve vakum altında 24 saat kurutulmuştur.



Şekil 4.2 FTIR spektroskopi analizi

FTIR analizine ait değerler Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Spektrum incelendiğinde bakteriyel selüloza ait karakteristik pikler görülmektedir. Bu değerler, 3000cm^{-1} – 3350cm^{-1} arası O-H bağını, 2800cm^{-1} – 2900cm^{-1} arası C-H bağını, 1161cm^{-1} C-O-C bağını, 1030cm^{-1} – 1060cm^{-1} arası C-O bağını, 1430cm^{-1} ve 1660 cm^{-1} değerleri ise karboksilat grupları ve karboksilik asit gruplarının yüzeydeki varlığını göstermektedir.

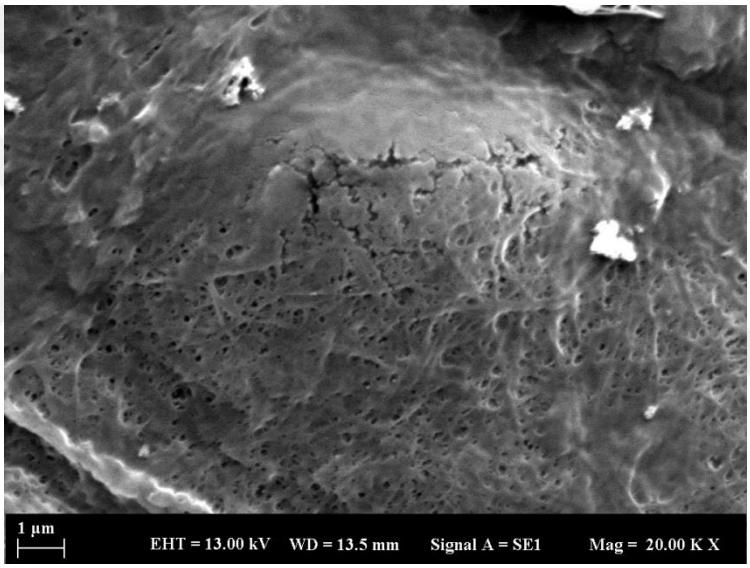
Saf BS için gözlemlenen karakteristik bantlar OH gerilmesi (3454 cm^{-1}), H bağları (3237 cm^{-1}), CH_2'nin CH gerilmesi ve CH_3 grupları (2902 cm^{-1} - 2717 cm^{-1}), su OH bükme (1650 cm^{-1}), CH_2 simetirk bükme (1432 cm^{-1}), CH bükme (1368 cm^{-1}), antisimetrik köprü C-O-C germe (1162 cm^{-1}), C-O esnemesi (1114 cm^{-1}-1058 cm^{-1}), antisimetrik faz dışı esneme (896 cm^{-1}) ve OH faz dışı eğilme (666 cm^{-1}-619 cm^{-1}) içeren iskelet titreşimleri olarak bildirilmiştir [61].

Başka bir çalışmada, BS spekturumunda gözlemlenen bantlar 400 cm^{-1}-700 cm^{-1} aralığında OH bükülmesine, ~896 cm^{-1}'deki glikoz birimleri arasındaki β-glukosidik bağlara ve C-O simetrik gerilmesine ait olduğu bildirilmiştir. 1040 cm^{-1} ve 1168 cm^{-1}'de uzanan birincil alkol ve C-O-C ve C-H deformasyonu 1340 cm^{-1}'de

ve 1400 cm^{-1}'de CH_2 bükülmesi ve OH ile ilgilendirilmiştir. Adsorbe edilmiş suyun H-O-H bükülmesi (1650 cm^{-1}), CH_2 ve CH_3 gruplarının CH gerilmesi (2900 cm^{-1}) ve OH gerilmesi (3500 cm^{-1}'de geniş bant) de araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [62].

4.1.3 Yüzey Morfoloji Analizi

SEM kullanılarak membranların yüzey morfolojileri 20000x büyütme oranında incelenmiştir. Şekil 4.3'te gösterilen ve elde edilen SEM sonuçlarına göre standart bir bakteriyel selüloz elde edilmiş ve selüloz zinciri çaplarının 20nm–75nm arasında olduğu belirlenmiştir. Farklı literatürdeki SEM görüntüleri ile karşılaştırıldığında benzer yapıda oldukları görülmüştür.



Şekil 4.3 Bakteriyel selülozun SEM görüntüleri (x20000)

Literatürde Nejla Aşık'ın 2016 yılında yayınladığı çalışmasında, 210ml, 310ml ve 360ml BS-H numunelerini 30000x büyütmede incelediğinde ortalama zincir çaplarını sırası ile 38,75nm, 39,4 nm ve 42,15 nm olarak kaydetmiştir [63]. Yunus Emre Öz'ün 2017 de farklı karbon kaynakları kullanarak elde ettiği bakteriyel selüloz örneklerinin SEM görüntülerini incelediğinde farklı ortamlarda üretilen BS'lerin literatür ile uyumlu SEM görüntülerine sahip olduğunu ve tüm bakteriyel selülozların yapısının nanofibril olduğunu bildirmiştir [64]. Melih ve ark. 2017 yılında yayınladıkları çalışmada elde ettikleri BS'nin ortalama lif çapının 73.63 nm olduğu bildirilmiştir [65]. Faranak ve ark. 2014 yılında farklı karbon kaynakları kullanarak üretimini sağladıkları bakteriyel selülozların SEM görüntülerine

baktığımızda ise farklı karbon kaynaklarından elde edilen nanofibrillerin 15-31nm değerleri arasındaki kalınlık değerleri ile 29-77nm aralığındaki nanofibril genişlikleri arasında önemli farklılıkların olmadığı sonucuna ulaşmışlardır [66]. Sunulan tez çalışmasında bakteriyel selülozun SEM görüntülerinin literatürde bulunan benzer çalışmalarla benzerlik gösterdiği sonucuna ulaşılabilmektedir.

4.1.4 Bakteriyel Selülozun Su Tutma Kapasitesinin Hesaplanması

Öncelikle kuru ağırlıkları tartılarak tespit edilen BS'lerin saf su içerisinde 2 saat bekletildikten sonra sulu ağırlıkları da tartılmış ve hesaplanmak üzere not edilmiştir. Su tutma kapasitesi Şişme(%) = (Wh-Wd) / Wd formülü ile hesaplanmıştır. Tablo 4.1'de 5 farklı bakteriyel selüloz numunesine ait su tutma kapasitesi değerleri gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Bakteriyel Selülozun Şişme Değerleri Hesaplanması

ÖRNEK NUMARASI	*KURU AĞIRLIK (g)*	*ISLAK AĞIRLIK (g)*	*SONUÇ (g)*
1	*0,0027*	*0,0508*	*%17*
2	*0,0028*	*0,0376*	*%12*
3	*0,0017*	*0,0226*	*%12*
4	*0,0021*	*0,0406*	*%18*
5	*0,0028*	*0,0392*	*%13*

Yapılan çalışmada bakteriyel selülozun 2 saat sonunda su tutma kapasitesi ortalama %13,40 (standart hata= ± 2,49) olarak hesaplanmıştır. Literatürde Nelisa TÜRKOĞLU'nun 2014 yılında yayınladığı çalışmada hem selüloz bazlı hidrojellere yüklenen kloramfenikol (CAP) yüklü 2,3 dialdehit selüloz (DABS) hidrojel membranlar ve *Acetobacter xylinum* tarafından salgılanan BS, sodyum metaperiodat ile oksidasyon yöntemi uygulanarak DABS olacak şekilde entegre edilmiştir. Bu hazırlanan örneklere uygulanan MTT testi sonuçlarına göre; CAP yüklü DABC membranları üzerindeki fibroblastların yapışması ve proliferasyonu,

CAP yüklü BS membranından belirgin bir şekilde daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. DABS membranlarını içeren bu yeni geliştirilmiş ilacın biyouyumluluğu ve antimikrobiyal etkinliği bakımından yara iyileşmelerinde çok uygun görülmüştür. Çalışma sürecinde BS'ye yapılan su tutma kapasitesi testine göre 24 saat sonunda bakteriyel selülozların kendi ağırlığının %65,6 katı kadar su tutabildiği gözlemlenmiştir [32].

4.1.5 Yüzey Alanı Analizi

Bakteriyel selülozların yüzey alanının belirlenmesi için yapılan BET analizi sonuçları Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Bu analizin sonucunda BS yüzey alanı 37,53 m2/g olarak tespit edilmiştir.

BET Surface Area Report

BET Surface Area: 37.5322 ± 3.1126 m²/g
Slope: 2.543251 ± 0.215596 g/mmol
Y-Intercept: 0.056462 ± 0.000998 g/mmol
C: 46.043541
Qm: 0.38466 mmol/g
Correlation Coefficient: 0.9691504
Molecular Cross-Sectional Area: 0.1620 nm²

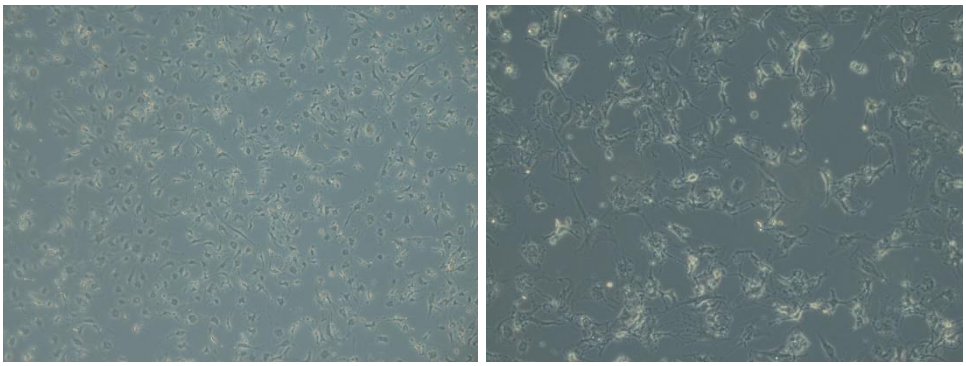
Relative Pressure (P/Po)	Quantity Adsorbed (mmol/g)	1/[Q(Po/P - 1)]
0.002811935	0.04320	0.06528
0.003148898	0.04897	0.06451
0.003486795	0.05388	0.06495
0.003824252	0.05893	0.06515
0.004163860	0.06302	0.06635
0.004503432	0.06715	0.06737
0.004843386	0.07092	0.06863
0.005182929	0.07484	0.06962
0.005522685	0.07834	0.07088
0.005860998	0.08229	0.07165
0.006200252	0.08579	0.07273

Şekil 4.4 Bakteriyel selüloz BET analizi sonuçları

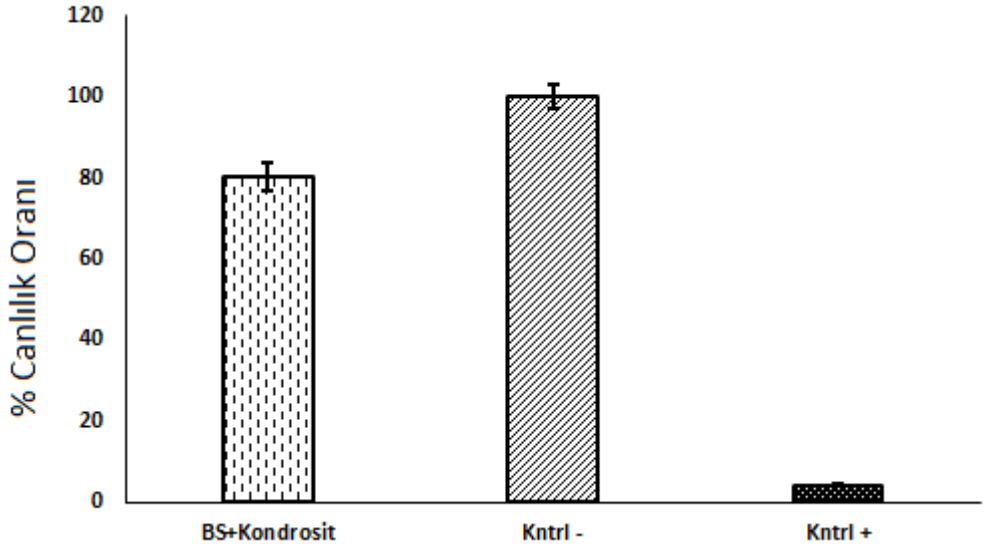
BS'nin yüzey alanına, kültür şartlarının etkisinin incelendiği bir çalışmada BS'nin yüzey alanının değişen şartlara göre 28 ile 227 cm^2/g arasında değişebileceği bildirilmiştir [67].

4.2 Hücre Kültürü Çalışmaları

4.2.1 Hücre Tutunma Testi



Şekil 4.5 Bakteriyel selüloz üzerindeki kondrosit hücre görüntüleri



Şekil 4.6 MTT testi sonucu

Bu çalışma sonucunda kondrosit hücrelerin membrana tutunma kapasitesi yaklaşık olarak %80 (standart hata= ± 1,79) oranında olmuştur.

Literatürde Elif Aydoğdu'nun 2011 yılında yayınladığı çalışmasında, kondrosit hücreleri kriyojeller üzerine kültüre edilmiş ve bunların morfolojik özellikleri SEM mikroskobu ile incelenmiş ayrıca biyokimyasal ve moleküler biyolojik özelliklerini araştırılmış. Araştırmalar sonucunda kondrositlerin kriyojeller üzerine tutunduğunu ve karakteristik özelliklerini gösterdiklerini tespit etmişlerdir fakat uzun süreli inkübasyon sonucunda kondrosit hücrelerin karakteristik özelliklerini kaybetttiklerini gözlemlemişlerdir [68]. Rümeysa Akçapınar'ın 2014 yılında primer kondrostilerin hidrojel içi ve dışı kondrojenik potansiyellerini araştırdığı

çalışmasında, 8.günün sonunda ölçümlediği kapsüllenmiş hücrelerin canlılık oranını %84,3 olarak kaydetmiştir [69]. Aylin ve ark. 2017 yılında deri doku mühendisliği alanında yaptıkları bir çalışmada, aljinat, jelatin ve kitosan hidrojelleri üzerine deri doku mühendisliği uygulamasında kullanılan keratinosit hücre hattının biyobaskı ile hidrojellere yüklenmesi ve ardından yapılan MTT canlılık testi yapılmıştır. MTT sonuçlarına göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %50'nin üzerinde bir hücre canlılığının olduğu bildirilmiştir ve bu sonuçlara göre keratinositlerin hidrojeller üzerinde rahatlıkla canlılıklarını devam ettirebildiklerini göstermiştir [70]. Nayak ark. 2014 yılında yaptığı ipek serisin/karboksimetil selülozu üzerine fare rekombinant transforme büyüme faktörü b1 (TGFb1) yüklenmiş ve hücre canlılık testi sonucunda serisin/karboksimetil selüloz matrislerinin sitotoksik bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir [71]. Sunduğumuz bu tez çalışmasında bakteriyel selüloza tutunan kondrosit hücreler üzerinde yapılan canlılık testi sonuçları ile literatürde yer alan diğer benzer çalışmalarla uyumlu olduğu ve diğer çalışmalarla arasında tutarlılık olduğu sonucuna varıldığı görülebilmektedir.

Bakteriyel selülozun benzersiz fiziksel özelliklerinin yanı sıra mükemmel biyouyumluluğa sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan tez çalışmasında sentezlenen bakteriyel selülozun nanofiber ağ yapısı SEM ile görüntülenmiştir. Elde edilen malzemenin sterilizasyonunun gerçekleştirilebilmesi açısından termal davranışının uygun olduğu termogravimetrik analizler ile belirlenmiştir. Bakteriyel selülozun kimyasal yapı analizi FTIR ile belirlenmiştir. Bu tez kapsamında elde edilen veriler, modifiye edilmemiş bakteriyel selüloza, fare kondrositlerinin %80 oranında tutunduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, BS'nin kıkırdak doku mühendisliği için üç boyutlu bir iskele olarak potansiyele sahip olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, BS'nin uzun vadeli yüke maruz kalması sırasında stres koşullarının etkisini incelemek için daha fazla çalışma yapılmalıdır.

KAYNAKÇA

[1] Gümüşderelioğlu, M., *Doku mühendisliği ve ürünleri.* Bilim ve Teknik, 2010. **516**: p. 70-75.

[2] Chaignaud, B.E., R. Langer, and J.P. Vacanti, *The history of tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds and cells*, in *Synthetic biodegradable polymer scaffolds*. 1997, Springer. p. 1-14.

[3] Bodnar, A.G., et al., *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells.* science, 1998. **279**(5349): p. 349-352.

[4] Griffith, L.G. and G. Naughton, *Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities.* science, 2002. **295**(5557): p. 1009-1014.

[5] Duailibi, M., et al., *Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells.* Journal of dental research, 2004. **83**(7): p. 523-528.

[6] Wang, Q., *Smart Materials for Tissue Engineering: Fundamental Principles*. 2016: Royal Society of Chemistry.

[7] Hudecki, A., G. Kiryczyński, and M.J. Łos, *Biomaterials, definition, overview*, in *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*. 2019, Elsevier. p. 85-98.

[8] Los, M.J., A. Hudecki, and E. Wiechec, *Stem cells and biomaterials for regenerative medicine*. 2018: Academic Press.

[9] Campoccia, D., L. Montanaro, and C.R. Arciola, *A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces.* Biomaterials, 2013. **34**(34): p. 8533-8554.

[10] Migonney, V., *History of biomaterials.* Biomaterials, 2014: p. 1-10.

[11] Demirtaş, T.T., A. Karakeçili, and M. Gümüşderelioğlu, *PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF HYDROXYAPATITE CONTAINING SUPERPOROUS HYDROGEL COMPOSITES FOR BONE TISSUE ENGINEERING.*

[12] Bose, S., M. Roy, and A. Bandyopadhyay, *Recent advances in bone tissue engineering scaffolds.* Trends in biotechnology, 2012. **30**(10): p. 546-554.

[13] O'brien, F.J., *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering.* Materials today, 2011. **14**(3): p. 88-95.

[14] Ma, P.X., *Scaffolds for tissue fabrication.* Materials today, 2004. **7**(5): p. 30-40.

[15] Keskin, A.O., *Hidroksiapatit Seramiklerinin Mekanik Özelliklerinin Zirkonya İlavesiyle Geliştirilmesi*. 2000, Fen Bilimleri Enstitüsü.

[16] Rezaie, H.R., L. Bakhtiari, and A. Öchsner, *Biomaterials and their applications*. 2015: Springer.

[17] Prasad, K., et al., *Metallic biomaterials: Current challenges and opportunities.* Materials, 2017. **10**(8): p. 884.

[18] Niinomi, M., M. Nakai, and J. Hieda, *Development of new metallic alloys for biomedical applications.* Acta biomaterialia, 2012. **8**(11): p. 3888-3903.

[19] Park, J.B. and J.D. Bronzino, *Biomaterials: principles and applications*. 2002: crc press.

[20] Ratner, B.D., et al., *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2004: Elsevier.

[21] Ramakrishna, S., *An Introduction To Biocomposites: Series on Biomaterials and Bioengineering" vol. 1, 1 Page*. 2004, Copyright.

[22] Armentano, I., et al., *Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review.* Polymer degradation and stability, 2010. **95**(11): p. 2126-2146.

[23] Perez, R.A., et al., *Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration.* Advanced drug delivery reviews, 2013. **65**(4): p. 471-496.

[24] Hamdy, T.M., *Polymers and ceramics biomaterials in orthopedics and dentistry: A review article.* Egyptian Journal of Chemistry, 2018. **61**(4): p. 723-730.

[25] Dubok, V.A., *Bioceramics—yesterday, today, tomorrow.* Powder Metallurgy and Metal Ceramics, 2000. **39**(7): p. 381-394.

[26] Griffith, L., *Polymeric biomaterials.* Acta materialia, 2000. **48**(1): p. 263-277.

[27] Seal, B., T. Otero, and A. Panitch, *Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration.* Materials Science and Engineering: R: Reports, 2001. **34**(4-5): p. 147-230.

[28] Kohane, D.S. and R. Langer, *Polymeric biomaterials in tissue engineering.* Pediatric research, 2008. **63**(5): p. 487-491.

[29] Mir, M., et al., *Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review.* Progress in biomaterials, 2018. **7**(1): p. 1-21.

[30] Laçin, N.T., M. Demirbilek, and V. Yalman, *Tissue Engineering and Wound Healing Biomaterials.* Frontiers in Stem Cell and Regenerative Medicine Research, 2018. **8**: p. 168-201.

[31] Saibuatong, O.-a. and M. Phisalaphong, *Novo aloe vera–bacterial cellulose composite film from biosynthesis.* Carbohydrate Polymers, 2010. **79**(2): p. 455-460.

[32] Laçin, N.T., *Development of biodegradable antibacterial cellulose based hydrogel membranes for wound healing.* International journal of biological macromolecules, 2014. **67**: p. 22-27.

[33] Ullah, H., H.A. Santos, and T. Khan, *Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery.* Cellulose, 2016. **23**(4): p. 2291-2314.

[34] Lee, K.Y., et al., *More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites.* Macromolecular bioscience, 2014. **14**(1): p. 10-32.

[35] Esa, F., S.M. Tasirin, and N. Abd Rahman, *Overview of bacterial cellulose production and application.* Agriculture and Agricultural Science Procedia, 2014. **2**: p. 113-119.

[36] Huang, Y., et al., *Recent advances in bacterial cellulose.* Cellulose, 2014. **21**(1): p. 1-30.

[37] Shoda, M. and Y. Sugano, *Recent advances in bacterial cellulose production.* Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2005. **10**(1): p. 1.

[38] Lin, S.-P., et al., *Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose.* Cellulose, 2013. **20**(5): p. 2191-2219.

[39] Bielecki, S., et al., *Bacterial cellulose.* Polysaccharides and polyamides in the food industry: properties, production, and patents, 2005: p. 31-84.

[40] Poyrazoğlu Çoban, E. and H. Bıyık, *Acetobacter pasteurianus HBB6 ve Acetobacter lovaniensis HBB5 Tarafından Yüzey Kültür Fermentasyonu ile Bakteriyel Selüloz Üretimi. 15.* Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 2007: p. 28-31.

[41] Campano, C., et al., *Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review.* Cellulose, 2016. **23**(1): p. 57-91.

[42] Shi, Z., et al., *Utilization of bacterial cellulose in food.* Food hydrocolloids, 2014. **35**: p. 539-545.

[43] Vacanti, C.A. and J.P. Vacanti, *The science of tissue engineering.* The Orthopedic Clinics of North America, 2000. **31**(3): p. 351-356.

[44] Ja, B., *articular cartilage. Part I: tissue design and chondrocyte-matrix interactions.* J Bone Joint Surg am, 1997. **79**(4): p. 600-611.

[45] Basad, E., et al., *Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study.* Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy, 2010. **18**(4): p. 519-527.

[46] Tuan, R.S., A.F. Chen, and B.A. Klatt, *Cartilage regeneration.* The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2013. **21**(5): p. 303.

[47] Mankin, H.J., *The response of articular cartilage to mechanical injury.* JBJS, 1982. **64**(3): p. 460-466.

[48] Hunziker, E.B. and L.C. Rosenberg, *Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane.* JBJS, 1996. **78**(5): p. 721-33.

[49] Chuang, E.-Y., et al., *Hydrogels for the application of articular cartilage tissue Engineering: A review of hydrogels.* Advances in Materials Science and Engineering, 2018. **2018**.

[50] Gabbott, P., *Principles and applications of thermal analysis*. 2008: John Wiley & Sons.

[51] Derkuş, B., *Apta-sensör teknolojisinde kullanılmak üzere doğal kaynaklardan biyomalzemelerin izolasyonu, karakterizasyonu, elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi ve biyolojik uygulamaları*.

[52] Van Hulse, J., T.M. Khoshgoftaar, and A. Napolitano. *Experimental perspectives on learning from imbalanced data*. in *Proceedings of the 24th international conference on Machine learning*. 2007.

[53] Kazarian, S.G. and K.A. Chan, *ATR-FTIR spectroscopic imaging: recent advances and applications to biological systems.* Analyst, 2013. **138**(7): p. 1940-1951.

[54] Zhou, W., et al., *Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM)*, in *Scanning microscopy for nanotechnology*. 2006, Springer. p. 1-40.

[55] De Ridder, L. and M. Mareel, *Morphology and 125I-concentration of embryonic chick thyroids cultured in an atmosphere of oxygen.* Cell biology international reports, 1978. **2**(2): p. 189-194.

[56] Yao, T. and Y. Asayama, *Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues.* Reproductive medicine and biology, 2017. **16**(2): p. 99-117.

[57] Alberts, B., et al., *Isolating cells and growing them in culture*, in *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. 2002, Garland Science.

[58] Koçaklı, Z., K. Akıllıoğlu, and A. Doğan, *Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü.* Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. **24**(3): p. 390-401.

[59] Helmrich, A. and D. Barnes, *Animal cell culture equipment and techniques.* Methods in cell biology, 1998. **57**: p. 3-17.

[60] Thambyah, A., A. Nather, and J. Goh, *Mechanical properties of articular cartilage covered by the meniscus.* Osteoarthritis and Cartilage, 2006. **14**(6): p. 580-588.

[61] Barud, H., et al., *Thermal characterization of bacterial cellulose–phosphate composite membranes.* Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2007. **87**(3): p. 815-818.

[62] De Salvi, D.T., et al., *Preparation, thermal characterization, and DFT study of the bacterial cellulose.* Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2014. **118**(1): p. 205-215.

[63] Aşık, N., *Farklı besi ortamı ve yüzey-hacim oranları kullanılarak bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu*. 2016, Bartın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

[64] ÖZ, Y.E., *Şeker pancarı melasından gluconacetobacter xylinus nrrl b-759 kullanarak farklı kültür teknikleri ile bakteriyel selüloz üretimi/Bacterial cellulose production from sugar beet molasses with different culture techniques using gluconacetobacter xylinus nrrl b-759.* 2017.

[65] Güzel, M. and Ö. Akpınar, *Komagataeibacter hansenii GA2016 ile bakteriyel selüloz üretimi ve karakterizasyonu.* Gıda, 2017. **42**(5): p. 620-633.

[66] Mohammadkazemi, F., M. Azin, and A. Ashori, *Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media.* Carbohydrate polymers, 2015. **117**: p. 518-523.

[67] AL-Kalifawi, E.J. and I.A. Hassan, *Factors Influence on the yield of bacterial cellulose of Kombucha (Khubdat Humza).* Baghdad Science Journal, 2014. **11**(3): p. 1420-1428.

[68] Aydoğdu, E., *Kondrosit hücrelerinin poli (hidroksietil metakrilat) temelli disulfide ile çapraz bağlanmış makro gözenekli hidrojeller üzerinde kültürü*. 2011, Kırıkkale Üniversitesi.

[69] Güçlü, R., *Aljinat ile mikroenkapsülasyonu yapılan primer kondrositlerin hidrojel içi ve dışı kondrojenik potansiyelleri*. 2014, Kırıkkale Üniversitesi.

[70] Ürkmez, A.Ş., et al., *Deri doku mühendisliği amaçlı üç boyutlu biyobaskı ve keratinosit kültürü.* Dicle Tıp Dergisi, 2018. **45**(1): p. 9-14.

[71] Nayak, S. and S. Kundu, *Sericin–carboxymethyl cellulose porous matrices as cellular wound dressing material.* Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2014. **102**(6): p. 1928-1940.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Bakteriyel Selüloz Temelli Yapay Kıkırdak Doku Hazırlanması – International Marmara Sciences Congress (Spring 2021) – 21-22/05/2021