

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEMİK YÜZEY TAKLİTLİ METAKRİLATLANMIŞ HİDROJELLERİN
OSTEOBLAST HÜCRE DAVRANIŞLARI ÜZERİNDE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

Süveydanas KOCACIK

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KEMİK YÜZEY TAKLİTLİ METAKRİLATLANMIŞ HİDROJELLERİN OSTEOBLAST HÜCRE DAVRANIŞLARI ÜZERİNDE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Süveydanas KOCACIK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sedat ODABAŞ

Bu çalışma, kemik yüzey topografyasının yumuşak litografi tekniğiyle agar jel kalıplama kullanılarak aktarılmasına odaklanmaktadır. Metakrilatlanmış doğal ekstrasellüler matriks (ECM) ve jelatin malzemeleri üzerinde yapılan çalışmada, pozitif kemik yüzey taklitleri elde edilmiştir. Agar jel kalıbının kullanımıyla kemik yüzeyinin özgün topografik özellikleri başarılı bir şekilde hidrojel yüzeyine aktarılmış ve incelenmiştir. Bu çalışma, kemik yüzey topografyasının yumuşak litografi tekniğiyle agar jel kalıplama kullanılarak hidrojellere aktarılmasını ve elde edilen hidrojellerin karakterizasyonunu ele almaktadır. Sentezlenen hidrojellerin karakterizasyonu için NMR (Nükleer Manyetik Rezonans), FTIR (Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi) ve profilometre analizleri gibi teknikler kullanılmıştır. Ayrıca, kemik yüzeyinin hidrojel yüzeyine başarılı bir şekilde aktarımını destekleyen profilometre analizleri yapılmıştır. Kemik yüzey taklitli hidrojellerin osteoblast hücreleri üzerindeki etkileri değerlendirmek için hücre çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, kemik yüzey taklitli hidrojellerin yüzey topografyasının düzensiz yapısı, osteoblast hücrelerinin bu yüzeylere daha iyi yapışma özelliği gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu bulgular, kemik dokusunun doğal özelliklerini taklit eden biyomalzemelerin tasarımında ve dokuların rejenerasyonunu hedefleyen tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynayabilir.

Temmuz 2023, 55 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kemik doku mühendisliği, Yumuşak Litografi, Kemik Yüzey Taklidi, Hidrojel

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF BONE SURFACE MIMICKING METHACRYLATED HYDROGELS ON OSTEOBLAST CELL BEHAVIOR

Süveydanas KOCACIK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Doç. Dr. Sedat ODABAŞ

This study focuses on the transfer of bone surface topography using soft lithography technique and agar gel molding. In the study conducted on methacrylated natural extracellular matrix (ECM) and gelatin materials, positive bone surface mimics were achieved. The use of agar gel mold successfully transferred the unique topographic features of the bone surface onto the hydrogel surface and was examined. This study addresses the transfer of bone surface topography to hydrogels using soft lithography technique with agar gel molding and the characterization of the obtained hydrogels. Techniques such as NMR (Nuclear Magnetic Resonance), FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), and profilometer analysis were used for the characterization of the synthesized hydrogels. Additionally, profilometer analysis supporting the successful transfer of bone surface onto the hydrogel surface was performed. Cell studies were conducted to evaluate the effects of bone surface mimicking hydrogels on osteoblast cells. According to the results of the study, it was concluded that the irregular structure of the surface topography of the bone mimicking hydrogels enhances the adhesion of osteoblast cells to these surfaces. These findings can play a significant role in the design of biomaterials that mimic the natural properties of bone tissue and the development of treatment methods targeting tissue regeneration.

July 2023, 55 page

Key Words: Bone tissue engineering, Soft Lithography, Bone Surface Mimicry, Hydrogel.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca bana yol gösteren, değerli önerilerde bulunan ve tezimin her aşamasında destekleyici olan sabrı, bilgeliği ve özverisi sayesinde bana bu tez çalışmasını tamamlamama büyük motivasyonu sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Sedat ODABAŞ'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya ABD),

Çalışmalarım esnasında, fikir ve yardımlarını hiç esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Burak DERKUŞ'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı),

Tüm desteklerinden dolayı laboratuvar arkadaşlarım, Öğr. Gör. Hakan ESKİZENGİN'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı), Öğr. Gör. Fulya ÖZDEMİR'e (Ufuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu), Esra ÇAKMAK'a, Karakterizasyon çalışmalarında her zaman yardımcı olan sayın Dr. Serhat ODABAŞ'a ve her zaman yanımda olup beni destekleyen canım arkadaşım Melek İpek ERTUĞRUL'a,

Beni koşulsuz destekleyen ve sevgilerini her zaman hissettiğim canım aileme annem Yeşim KOCACIK ve babam Yahya KOCACIK'a

Son olarak, tüm enerjisi ve sevgisiyle beni hep yukarıda tutan ve desteğini hep hissettiğim çok kıymetli Emir ÇAKICI'ya teşekkür ederim. Bu tezi çalışmalarım sırasında aynı kolunu iki kere beş farklı yerinden kıran ve bunu 3 ay içerisinde başaran canım annemin koluna ithaf ediyorum.

Süveydanas KOCACIK
Ankara, Temmuz 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Kemik Doku Mühendisliği	3
2.2 Kemik Yüzeyinin Taklit Edilmesi	4
2.3 Yumuşak Litografi Tekniği.....	5
2.4 Hidrojeller.....	5
3. KAYNAK ÖZETLERİ	7
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....	10
4.1 Materyal	10
4.2 Yöntem	10
4.2.1 Zenogreft (sığır) kemik temizliği	10
4.2.2 Agar jeli ile kalıp hazırlanması.....	12
4.2.3 Sığır deri ve tendonun hücreleştirilmesi.....	13
4.2.4 Jelatinin ve hücreleştirilmiş sığır deri, tendon ECM'sinin metakrilatlanması.....	13
4.2.4.1 JelMA sentezi.....	14
4.2.4.2 JelMA hidrojel eldesi	15
4.2.4.3 Sığır dECM-MA ve tECM-MA sentezi	15
4.2.4.4 Sığır dECM-MA ve tECM-MA hidrojellerinin eldesi	15
4.2.5 Metakrilatlanmış hidrojellerin karakterizasyon çalışmaları.....	16
4.2.5.1 NMR	16
4.2.5.2 FTIR	16

4.2.6 Yumuşak litografi yöntemi ile kemik yüzey taklidinin hidrojelere aktarılması.....	16
4.2.7 Kemik yüzey taklitli hidrojellerin karakterizasyon çalışmaları	17
4.2.7.1 Profilometre ölçüm analizi ile hidrojellerin yüzey topografyasının belirlenmesi ve ışık mikroskopunda görüntülenmesi	17
4.2.7.2 Temas açısı ölçümü	18
4.2.7.3 Mekanik test (Basma)	19
4.2.7.4 Şişme testi.....	19
4.2.7.5 Biyobozunurluk çalışmaları	19
4.2.8 Hücre kültür çalışmaları	20
4.2.8.1 Sitotoksosite	20
4.2.8.2 Hücrelerin malzeme üzerindeki çoğalma davranışı.....	21
4.2.8.3 Alizarin red boyaması.....	22
4.2.8.4 SEM görüntüleri	22
4.2.8.5 Canlı-ölü hücre görüntüleri	22
5. BULGULAR.....	24
5.1 Hidrojellerin Kimyasal Karakterizasyon Çalışmaları	24
5.1.1 Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR)	24
5.1.2 NMR spektroskopisi.....	26
5.2 Zenogreft Kemik Temizlenmesi ve Agar Jeli ile Kalıp hazırlanması	27
5.3 Profilometre Ölçüm Analizi ile Hidrojellerin Yüzey Topografyasının Belirlenmesi	29
5.3.1 Işık mikroskop görüntüleri	29
5.4 Temas Açısı.....	33
5.5 Mekanik Analiz	34
5.6 Şişme Testi	37
5.7 Biyobozunurluk Çalışmaları	38
5.8 Sitotoksosite	39
5.9 Hücre Kültürü Çalışmaları	40
5.9.1 Hücrelerin malzeme üzerindeki çoğalma davranışı.....	40
5.9.2 Alizarin red boyaması.....	42
5.9.3 SEM görüntüleri	43
5.9.4 Canlı- ölü hücre görüntüleri	45

6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
KAYNAKLAR	52
EK 1	54
ÖZGEÇMİŞ.....	55



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde oranı
°C	Santigrat
mg	Miligram
mL	Mililitre

Kısaltmalar

CO ₂	Karbondioksit
CPC	Setilpiridinyum klorür
dECM-MA	Hücesizleştirilmiş Sığır Deri Hücre Dışı Matrisi Metakrilat
ECM	Hücre Dışı Matris
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
FTIR	Fourier dönüşümlü kızıl ötesi
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HA	Hidroksiapatit
JELMA	Jelatin Metakrilat
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PCL	Poli (ε-kaprolakton)
PDMS	poli(dimetilsiloksan)
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
T-dECM-MA	Kemik Yüzey Taklitli Hücesizleştirilmiş Sığır Deri Hücre Dışı Matrisi Metakrilat
tECM-MA	Hücesizleştirilmiş Sığır Tendon Hücre Dışı Matrisi Metakrilat
T-JelMA	Kemik Yüzey Taklitli Jelatin Metakrilat
T-tECM-MA	Kemik Yüzey Taklitli Hücesizleştirilmiş Sığır Tendon Hücre Dışı Matrisi Metakrilat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Seryum oksit nanoparçacıklı doku iskeleleri sentezi çalışması	7
Şekil 3.2 Kıkırdak ECM'sinin biyomürekkep haline getirilmesi ve 3D basım çalışması.....	9
Şekil 4.1 Zenogreft (sığır) kemik temizliği.....	11
Şekil 4.2 Negatif kemik yüzey taklitli agar kalıp hazırlanması	13
Şekil 4.3 Metakrilatlanmış hidrojellerin sentezi	14
Şekil 4.4 Yumuşak litografi tekniği ile negatif kemik yüzey taklitli agar kalıptan pozitif kemik yüzey taklitli hidrojel elde edilmesi	17
Şekil 5.1 Saf jelatin ve sentezlenen JelMA'nın FTIR spektrumları.....	24
Şekil 5.2 Hücesizleştirilmiş dECM ve sentezlenen dECM-MA'nın FTIR spektrumları.....	25
Şekil 5.3 Hücesizleştirilmiş tECM ve sentezlenen tECM-MA'nın FTIR spektrumları	26
Şekil 5.4 Saf jelatinin NMR spektrumu	26
Şekil 5.5 Sentezlenen JelMA'nın NMR spektrumu.....	27
Şekil 5.6 (A) Kemik zenogreft temizleme öncesi kesilmiş sığır femur kemikleri, (B) Kemik zenogreft temizleme sonrası sığır femur kemik görüntüleri.....	28
Şekil 5.7 (A) Negatif kemik yüzey taklitli agar kalıp, (B) T-JelMA, (C) T-tECM-MA, (D) T-dECM-MA hidrojellerin görüntüleri	28
Şekil 5.8 A) Agar, (B) T-Agar, (C) JelMA, (D) T-JelMA, (E) dECM-MA, (D) T-dECM -MA, (G) tECM-MA, (H) T-tECM-MA hidrojellerin profilometre analiz öncesi ışık mikroskobu altında çekilmiş görüntüleri	30
Şekil 5.9 (A) Agar, (B) T-Agar, (C) JelMA, (D) T-JelMA, (E) dECM-MA, (D) T-dECM- MA, (G) tECM-MA, (H) T-tECM-MA hidrojellerin profilometre analiz sırasında ışık mikroskobu altında çekilmiş görüntüleri	31
Şekil 5. 10 (A) Agar, (B) T-Agar, (C) JelMA, (D) T-JelMA, (E) dECM-MA, (D) T-dECM- MA, (G) tECM-MA, (H) T-tECM-MA hidrojellerin profilometre analiz yöntemi ile yüzey topografyasının belirlenmesi	32
Şekil 5.11 Hidrojellerin temas açısı ölçümü görüntüleri	33
Şekil 5.12 Hidrojellerin basma testi görüntüleri	35
Şekil 5.13 Kemik yüzey taklitli ve taklit olmayan hidrojellerin basma testi sonucunda elde edilen gerilim- gerinim eğrisi (kuru) (Stress-Strain Curve).....	35
Şekil 5.14 Kemik yüzey taklitli ve taklit olmayan hidrojellerin basma testi sonucunda elde edilen gerilim- gerinim eğrisi (ıslak) (Stress-Strain Curve).....	36
Şekil 5.15 Hidrojellerin Şişme Oranı (%)- Zaman(dk) grafiği	37
Şekil 5.16 Hidrojellerin Lizozim içerisinde biyobozunurluk çalışması Ağırlık (g)- Zaman (gün) grafiği	38
Şekil 5.17 Hidrojellerin PBS içerisinde biyobozunurluk çalışması Ağırlık (g)- Zaman (gün) grafiği	39

Şekil 5.18 %5, %7 ve %10 konsantrasyonlarda JelMA hidrojellerinin % canlılık grafiği (SaOS-2 hücreleri TCPS’de kontrol olarak kullanılmıştır.) (** p<0.05)	39
Şekil 5.19 %5, %7, %10 konsantrasyonlarda dECM-MA hidrojel ve %7, %10 konsantrasyonlarda tECM-MA hidrojellerinin % canlılık grafiği (SaOS-2 hücreleri TCPS’de kontrol olarak kullanılmıştır.) (** p<0.05)	40
Şekil 5.20 JelMA, T-JelMA, tECM-MA, T-tECM-MA, dECM-MA ve T-dECM-MA hidrojellerin üzerinde SaOs-2 hücrelerinin belirli zaman noktalarında (1.,3.,5. ve 7. gün) MTT reaktifi ile belirlenen hücre çoğalmasının absorbansa karşı grafiği	40
Şekil 5.21 Hidrojellerin kültür edildiği sürede çekilmiş mikroskop görüntüleri	41
Şekil 5.22 (A) Hücre ekimi yapılmadan boyanmış JelMA hidrojel ve hücreli T-JelMA, (B) Hücre ekimi yapılmadan boyanmış dECM-MA hidrojel ve hücreli T-dECM-MA, (C) Hücre ekimi yapılmadan boyanmış tECM-MA hidrojel ve hücreli T-tECM-MA hidrojel görüntüleri	42
Şekil 5.23 Hidrojellerin Alizarin red boyaması sonucunda belirli zaman noktalarında (3., 7. ve 14. Gün) kalsiyum birikiminin absorbans grafiği (** p<0.05)	43
Şekil 5.24 (A) JelMA 1. Gün, (B) T-JelMA 1. Gün, (C) JelMA 3. Gün, (D) T-JelMA 3. Gün SEM görüntüleri	44
Şekil 5.25 (E) tECM-MA 1. Gün, (F) T-tECM-MA 1. Gün, (G) tECM-MA 3. Gün, (H) T-tECM-MA 3. Gün SEM görüntüleri	44
Şekil 5.26 (I) dECM-MA 1. Gün, (J) T-dECM-MA 1. Gün, (K) dECM-MA 3. Gün, (L) T-dECM-MA 3. Gün SEM görüntüleri	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 5.1 Mekanik basma testi analizi grafiklerinden elde edilen Islak ve kuru grupların Young modul ve stres gerilim tablosu	36
--	----



1. GİRİŞ

Kemik, vasküler bir bağ doku olarak işlev gören ve hayati organları koruyan, aynı zamanda iskelet sisteminin mekanik desteğini sağlayan bir dokudur (Gautam vd., 2021). İskelet kemikleri, sadece yapısal bir destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda mineral homeostazının ve asit-baz dengesinin düzenlenmesine yardımcı olur ve büyüme faktörleri ile sitokinlerin kaynağı olarak görev yapar (Clarke, 2008).

Kemik, yapısı gereği kortikal ve süngerimsi olarak iki ana bölüme ayrılır. Kortikal kemik, yetişkin iskeletin büyük bir kısmını oluşturur ve süngerimsi kemiğin trabeküler plakalarını ve kemik iliği boşluğunu sarar. Kortikal kemik, yoğun ve sert yapısıyla dışarıdan gelen etkilere karşı dayanıklılık sağlar, mekanik yükleri dağıtarak kemiklerin kırılmasını engeller. Süngerimsi kemik ise trabeküler yapıları, kemik içindeki boşlukları ve kemik iliği boşluğunu içerir. Bu yapı, kemiklerin hafif ve esnek olmasını sağlar ve aynı zamanda kemik iliği üretimi ve depolaması gibi önemli işlevlere hizmet eder (Downey vd., 2006).

Kemik dokuda yaralanma, travma, hastalık veya yaşlanma gibi çeşitli etkilere nedeniyle dejenerasyon meydana gelir ve bu durum dokunun işlevini yerine getiremez hale gelir. Bu tür kemik doku defektlerinin tedavisi için farklı yöntemler kullanılmıştır. Bu tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve araştırılması, kemik doku mühendisliği kavramının ortaya çıkmasına yol açmıştır (Langer vd., 1993).

Kemik doku mühendisliği, canlı hücrelerin, biyomalzemelerin ve doku mühendislik tekniklerinin birleştirilmesini içeren, kemik rejenerasyonu ve restorasyonunu hedefleyen bir multidisipliner alan olarak tanımlanabilir. Bu alanda yapılan çalışmalar, mevcut tedavi yöntemlerinin sınırlamalarını aşmaya ve daha etkili, güvenli ve uzun süreli çözümler sağlamaya odaklanmaktadır. Kemik doku mühendisliği, kemik onarımı ve rejenerasyonunda umut verici sonuçlar sunan çeşitli yaklaşımları içerir.

Bu tez çalışması, kemik yüzey topografyasının aktarılması amacıyla yumuşak litografi tekniği kullanılarak agar jelinin kalıp olarak kullanılması üzerine odaklanmıştır. Bu teknik kullanılarak, metakrilatlanmış doğal ECM'ler ve jelatin malzemeleri üzerinde pozitif kemik yüzey taklitleri elde edilmiştir. Araştırmada, agar jeli kalıbının kullanımıyla kemik yüzeyinin özgün topografik özellikleri başarılı bir şekilde hidrojel yüzeyine aktarılmış ve incelenmiştir. Kemik yüzey taklitli hidrojellerin osteoblast hücreleri üzerindeki etkisini incelemeyi amaçlamaktadır. Osteoblastlar, kemik doku oluşumunda önemli bir rol oynayan hücrelerdir. Bu çalışmada, kemik yüzey taklitli hidrojellerin osteoblast hücrelerinin yapışma, çoğalma ve farklılaşma yetenekleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu sayede, kemik yüzey taklitli hidrojellerin osteoblast hücrelerinin biyolojik aktivitelerini nasıl etkilediği anlaşılmaya çalışılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kemik Doku Mühendisliği

Yaşlanma, kaza, kırık kaynaması ve kemik tümörleri gibi sebeplerle ortaya çıkan büyük kemik yaralanmaları durumunda, insan kemik dokusu belirli bir noktaya kadar kendini iyileştirebilme yeteneğine sahiptir. Bu durum, bireyin sağlığını ve yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Laurencin vd., 2006; Wang vd., 2016b).

Kemik doku mühendisliği, yukarıda bahsedilen bu sorunlara bir çözüm olarak önerilmektedir. (Yu vd., 2015). Biyouyumlu bir iskelet yapısı, uygun hücrelerin ve morfogenetik sinyal moleküllerinin 3D kompleks bir sistem içerisinde bir araya getirilmesiyle fonksiyonel kemik greftleri üretilebilmektedir. Bu özgün greftler, çeşitli kemik bozuklukları ve yaralanmalarının tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır (Laurencin vd., 1999; Langer ve Vacanti, 1993). Bu gelişme, gelecekte kemik rejenerasyonu ve doku mühendisliği alanlarında umut verici bir adım olarak değerlendirilebilir.

Doğal kemiklerin morfolojisi ve bileşenlerini bilmeden uygun bir iskelet oluşturmak mümkün değildir. Kemikler, uzunluk ve genişlik ölçeğine dayanan karmaşık hiyerarşik yapılarla oluşur. Bu yapılar arasında trabeküler ve kortikal kemik gibi makro yapılar, havers kanalları ve osteonlar gibi mikroyapılar, lameller gibi altmikroyapılar ve kollajen lifleri gibi nano yapılar yer alır. (Barth vd., 2011; Rho vd., 1998). Ayrıca, mineral, kollajen ve organik proteinler gibi alt-nano yapılar da bulunur. Bu bileşenler hiyerarşik bir düzen içinde düzensiz ancak optimal bir şekilde yerleştirilir ve yönlendirilir.

Doğal kemik bileşenlerini anlamadan uygun bir iskelet malzemesi seçmek mümkün değildir. Kollajen ve HA (hidroksiapatit), doğal kemikte yaklaşık olarak %95 oranında bulunur (Ma vd., 2018). Ayrıca, 200'den fazla farklı kollajen dışı matris proteini, hücre dışı sinyallerin düzenlenmesine katkıda bulunur (Stevens, 2008). Bu nedenle, doğal kemik yapısını anlamak, uygun bir iskelet malzemesi seçimi için oldukça önemlidir.

Hücre dışı matrisi taklit edebilen sentetik iskeletlerin tasarlanması ve üretimi, biyolojik bozuklukları ve defektleri aşmada umut verici bir perspektif ve uygulamalar sunar. Hücre dışı matrisi taklit edebilen sentetik iskelelerin tasarlanması, biyoloji, malzeme bilimi ve mühendislik yaklaşımlarının birleştiği çok disiplinli bir alan olan doku mühendisliğinde umut verici bir perspektif ve uygulama sunmaktadır. Bu tür iskeleler, geleneksel klinik yaklaşımlarla karşılaştırıldığında bazı avantajlar sunar. İlk olarak, donör kaynaklı hastalık riskini, immün reaksiyonları ve enfeksiyon riskini azaltma potansiyeline sahiptirler. Ayrıca, yapay iskelelerin tasarlanmasında birçok farklı biyomalzeme kullanılabilir ve bu malzemelerin değişiklikleri, hücre davranışının daha iyi kontrol edilmesine olanak sağlar (Porter, 2009).

2.2 Kemik Yüzeyinin Taklit Edilmesi

Osteoblastlar, yüzey pürüzlülüğü ve kimyasal özelliklere hassasiyet gösterir. Hücre zarına bağlı olan integrin proteinleri, yüzeyin topografik yapısı değiştiğinde sinyal iletimini etkilediği transkripsiyon ve protein sentezi sağladığı bilinmektedir. (Boyan, 1996).

Kemik dokusunun en dış tabakasında periost adı verilen kemik onarımı ve yenilenmesinde büyük rol oynayan tabaka vardır. Periostun altında ise kollajen ve hidroksiapatit gibi nano boyuttaki molekülleri içeren yüzeyin pürüzlü benzersiz bir topografisini oluşturan bileşenler bulunmaktadır. Bu topografinin hücre davranışı üzerinde etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Bu sebeple yüzey pürüzlülüğünün taklit edilmesi hücre davranışların düzenlenmesinde bir avantaja sahiptir (shi, 2014).

Shi vd., 2014 yılında, kemik yüzey taklidini poli(dimetilsiloksan) (PDMS) ile başarılı bir şekilde taklit edildiğini göstermişlerdir.

Bir başka çalışmada, polikaprolakton (PCL) iskeleler kalsiyum fosfat ve nano-hidroksiapatit (HA) kullanarak pürüzlü bir yüzeye sahip olacak şekilde doku iskelesi

tasarlanmıştır. Osteojenik farklılaşması değerlendirilmiş ve yüzey taklitli doku iskelesinin osteojenik gen ifadesinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (Lu, 2012).

2.3 Yumuşak Litografi Tekniği

Yumuşak litografi, yüzey yapılarının hassas bir şekilde replike edilmesine olanak tanıyan mikro mühendislik tekniğidir. Bu teknik, yüzey topografisinin başarılı bir şekilde taklit edilmesi ve karmaşık yüzey yapılarının yeniden üretilmesi için değerli bir araç olarak kullanılmaktadır. Yumuşak litografi, mikro ölçekte ince detayları koruyarak istenen yüzey desenlerinin oluşturulmasını sağlar. Bu sayede, yüzey etkileşimleri, hücre davranışı ve moleküler etkileşimler gibi önemli faktörlerin incelenmesi için kontrollü bir ortam sunar (Xia, 1998).

Poly(dimethylsiloxane) (PDMS), yumuşak litografi için yaygın olarak kullanılan bir elastomerik malzemedir. Bu malzeme, esnekliği, yüksek termal ve kimyasal direnci ve kolay işlenebilirliği nedeniyle yumuşak litografi uygulamalarında popülerdir. PDMS, basit bir kalıplama işlemiyle mikrokannallar, mikroporlar, mikroçukurlar ve diğer karmaşık yüzey yapıları oluşturmak için kullanılabilir. Ayrıca, PDMS'nin uygun optik ve mekanik özellikleri, biyomedikal araştırmalar, mikroakışkan sistemler, biyosensörler ve diğer mikro ölçekli cihazların geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Whiteside, 2001).

2.4 Hidrojeller

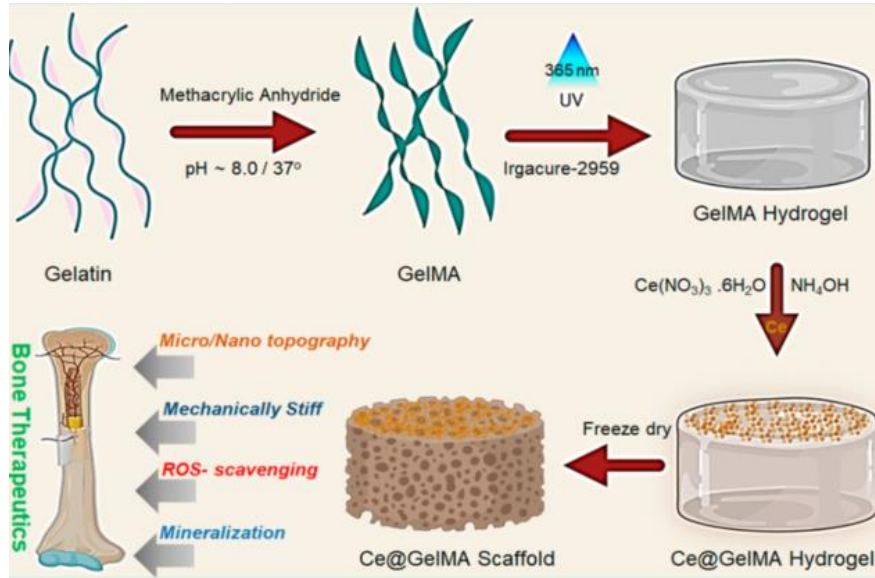
Hidrojeller, polimer zincirlerinin kimyasal veya fiziksel yöntemlerle çapraz bağlanması sonucu oluşan üç boyutlu homo veya kopolimerik sistemlerdir. Bu polimerik ağlar su ile etkileşime girdiklerinde çözünmeyen yapıya sahip olup, şişme yeteneği sergilemektedirler. Bu karakteristik özellik, hidrojelleri biyomedikal uygulamalar için önemli kılmaktadır (Mahinroosta vd., 2018).

Hidrojel ortamında kültüre edilen hücreler, aralarındaki etkileşimi daha iyi sağlayabildikleri ve potansiyel fenotiplerini doğal ortamlarına daha yakın bir şekilde ifade edebildikleri için, hidrojeller doku mühendisliği iskeleleri için en uygun biyomalzemelerdir (Lee vd., 2018). Bu  zellikleri, hidrojellerin hücre büyümesi, farklılaşma ve doku rejenerasyonu gibi süreçlerde etkili bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır.



3. KAYNAK ÖZETLERİ

Kurian vd. 2022 yılında yapmış oldukları çalışmada, foto çapraz bağlama yöntemiyle elde edilen JelMA hidrojelinin nanoseryum oksit ile kaplandığı gösterilmektedir. Bu çalışmada, elde edilen hibrit hidrojel in çözünabilir jelatin biyopolimeri yanı sıra çözünmeyen nanoseryum oksiti içerdiği ortaya konulmaktadır. Araştırmacılar, bu hibrit hidrojel in gözenekli mikroyapı ve biyoarayüzey özellikleri sunduğunu iddia etmektedirler. Doku iskelesinin yüzey morfolojisi ve elementel kompozisyonu, alan emisyonlu taramalı elektron mikroskopisi (FE-SEM) kullanılarak incelenmiş ve nanoseryum oksit nanoparçacıklarının dağılımı enerji dağılım spektroskopisi (EDS) ile gösterilmiştir. Modifiye edilmiş JelMA hidrojel doku iskelesinin yüzey nanopürüzlülüğü atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ile karakterize edilirken, kimyasal yapısı X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile analiz edilmiştir. Seryum oksit nanoparçacıklarının varlığı, doku iskelesinin mekanik özelliklerini artırdığını doğrulamıştır. Şekil 3.1’de yapılan çalışma gösterilmiştir.



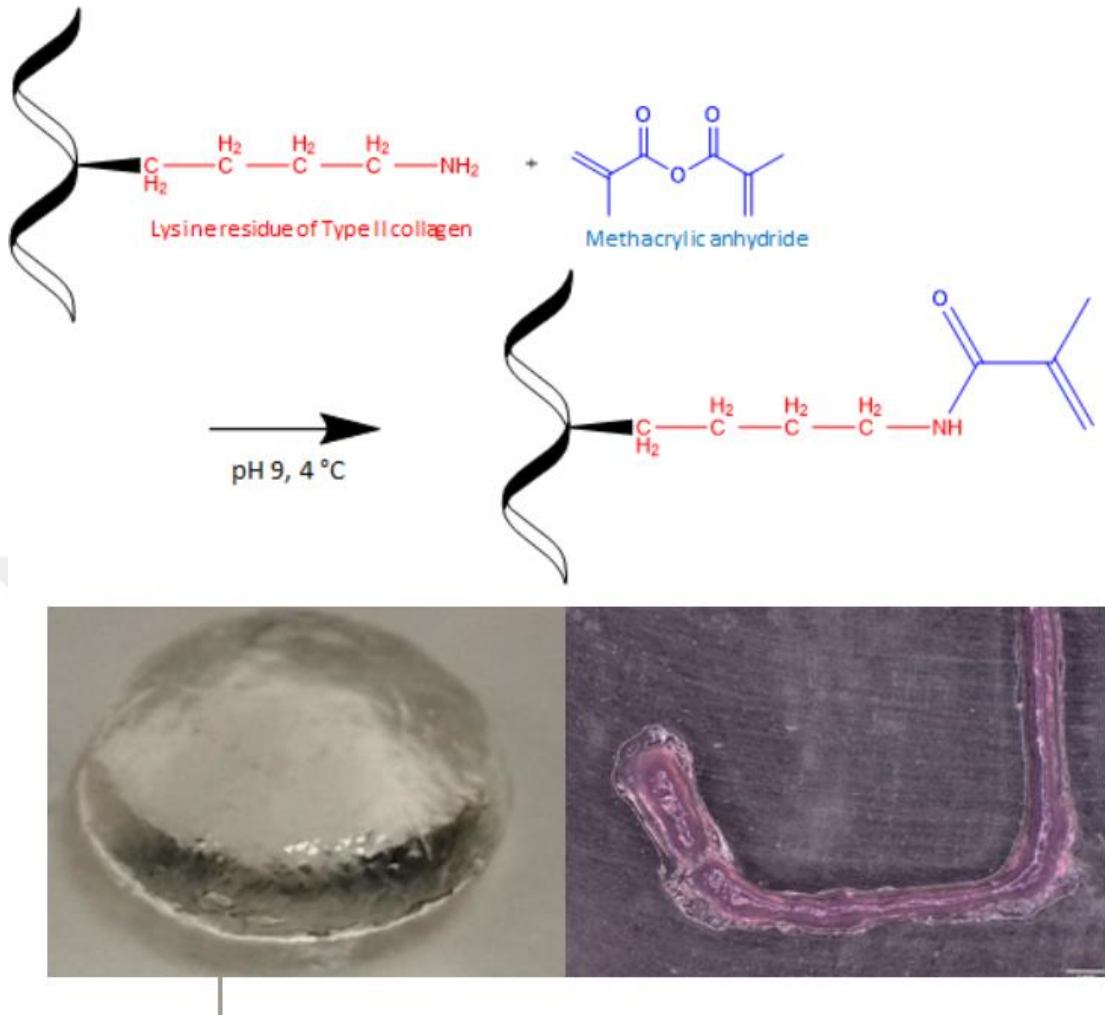
Şekil 3.1 Seryum oksit nanoparçacıklı doku iskeleleri sentezi çalışması (Kurian vd. 2022)

Ayrıca, doku iskeleleri simüle edilmiş vücut sıvısı (SBF) içerisinde bekletilmiş ve doku iskelesi üzerinde kemik benzeri nanometre ölçeğinde hidroksiapatit oluşumunun taramalı elektron mikroskopisi (SEM), X-ışını kırınımı (XRD) ve Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) kullanılarak kanıtlanmıştır.

Araştırmada, nanoseryum oksit parçacıklarının doku iskelesine antioksidan özelliği kazandırdığı 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) testi ile savunulmuştur. Ayrıca, fare kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin (rMSCs) doku iskelesi üzerinde gün boyunca kültürlenmesi sonucunda hücre çoğalma davranışı incelenmiş ve doku iskelesinin biyoyoumlu bir malzeme olduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, elde edilen hibrit doku iskelesi, gerçekleştirilen kapsamlı analizler ve hücre kültürü çalışmaları sonucunda, doku rejenerasyonunu teşvik edebilme yeteneği, implant edilebilir özellikleri ve antioksidan özellikleri ile ön plana çıkan, aynı zamanda sert dokunun bileşimini başarılı bir şekilde taklit edebilen bir malzeme olduğu öne sürülmüştür.

Behan vd. 2022 yılında yayınlanmış olan çalışmalarında, artiküler kıkırdak dokusunu yeniden oluşturmayı hedefleyen klinik stratejilerin zorluğunu; tamamen işlevsel, yük taşıyabilen dokunun yeniden oluşturulmasının zorluğunu ele alarak buna karşı bir malzeme öne sürmüşlerdir. Kıkırdak ECM'sini kıkırdaktan izole ederek biyomürekkep haline getirmişlerdir. Çalışmada Artiküler kıkırdağından elde edilen ECM ana bileşeni olan tip II kollajen içermektedir. Ve izole edilen bu ECM metakrilatlanarak vücut sıcaklığında jel oluşturmeyen ana bileşen olan tip II kollajenin dayanıklı jel oluşturması sağlanmıştır. Elde edilen hidrojel biyobozunurluk, reoloji, mekanik testi, basılabilirliği incelenmiştir. Hücre kültür çalışmalarında kemik iliği mezenkimal kök hücreleri kullanılmıştır ve hücre canlılığı analizleri yapılarak kollajen açısından zengin dokular oluştuğu kanıtlanmıştır. Sonuç olarak elde edilen metakrilatlanmış kıkırdak ECM'si 3D biyobasımla kıkırdak doku iskelesi olarak kıkırdak rejenerasyonu için kullanılabileceği savunulmuştur.



Şekil 3.2 Kıkırdak ECM'sinin biyomürekkep haline getirilmesi ve 3D basım çalışması (Behan vd. 2022)

Jaiswal ve arkadaşlarının (2015) yayınladıkları bir çalışmada, kemik dokunun bileşenlerini taklit etmek amacıyla kemik rejenerasyonu için JelMA hidrojeline düşük konsantrasyonlarda inorganik nanopartiküller eklenerek kompozit bir hidrojel tasarlanmışlardır. Bu tasarımda, JelMA hidrojeline çapraz bağlama işlemi sırasında (Fe_3O_3) manyetik nanopartiküller kapsüllenmiştir. Nanopartikül eklenmesi sonucunda hidrojin mekanik sertliğinin 10 kat arttığı ve dayanıklılığının 20 kat arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, nanopartiküllerin JelMA polimer zincirleriyle etkileşime geçerek çift kimyasal çapraz bağlanma sağladığı ve bu durumun kemik rejenerasyonunu artırdığı öne sürülmüştür.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1 Materyal

Sığır deri ve tendon kasaptan temin edilerek laboratuvar ortamına getirilmiştir. Dokular dikkatlice çıkarılmış temizlenmiş ve kimyasal ve enzimatik hücresizleştirme yöntemlerinin kombinasyonu kullanılarak hücresizleştirme işlemi gerçekleştirilmiş toz haline getirilmiştir. hücresizleştirme işleminde Tripsin-EDTA (Merck, Almanya), Triton X-100 (Merck, Almanya), sodyum azid (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

Biyopolimerlerin metakrilatlanması ve hidrojel oluşması için Metakrilik Anhidrit (Sigma, Almanya), 2-Hidroksi-4'-(2-hidroksietoksi)-2-metilpropiyofenon (Irgacure 2959) (Sigma, Almanya) kullanılmıştır. Kemik yüzey taklidini hidrojele aktarmak için hazırlanan kalıp Agar- Agar (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

Hidrojellerin kimyasal yapılarını analiz etmek amacıyla Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre cihazı (FTIR) cihazı kullanılmıştır. Hidrojellerin karakterizasyonu için mekanik basma testi (SHIMADZU, AG-X 50kN) kullanılmıştır.

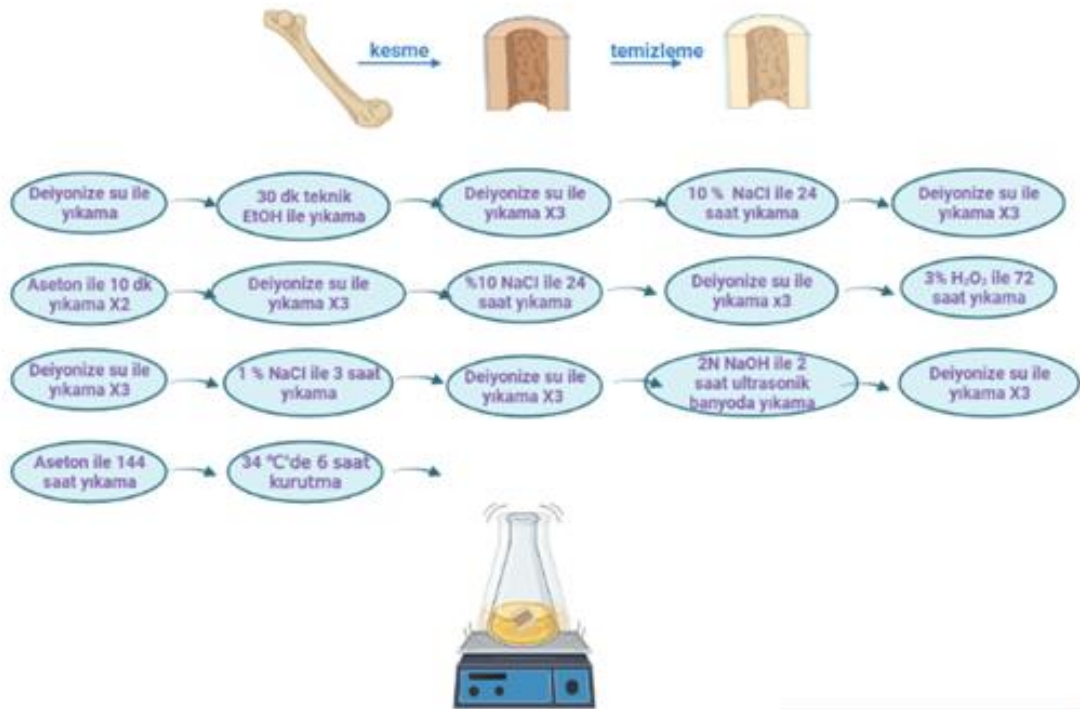
Hücre kültür çalışmaları, 37°C sıcaklık, %5 CO₂ ve %95 nem sağlayan inkübatör (Panasonic) ve laminer akış kabini kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Besiyeri olarak DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) (Gibco, ABD), antibiyotik-antimikotik ve fetal sığır serumu (FBS) kullanılmıştır. Hücrelerin ayrıştırılması için Tripsin/EDTA çözeltisi kullanılmıştır.

4.2 Yöntem

4.2.1 Zenogreft (sığır) kemik temizliği

Kemik dokuları, sığır femur kemiklerinden elde edilmiş olup istenilen boyutlarda kesilerek kimyasal yolla temizleme işlemi olan zenogreft temizleme işlemine tabi

tutulmuştur (Erenay B. 2015). Uygun boyutlarda kesilmiş kemik dokuları ön yıkama olarak distile su ile yıkanmış ve teknik etanol içerisinde 30 dk boyunca karıştırılmıştır. Kemik üzerinde kalan dokuların ve hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla %10 NaCl çözeltisinde oda sıcaklığında 24 saat boyunca bekletilmiştir. Distile su ile yıkama sonrasında dokularda bulunan lipid gruplarının uzaklaştırılması amacıyla aseton içerisinde ultrasonik banyoda 10 dk 2 tekrarlı yıkanmıştır. Ardından %10'luk NaCl çözeltisi içerisinde 24 saat bekletilmiştir. Distile su ile yıkama sonrasında dokuda bulunan organizmaların uzaklaştırılması için %3 H₂O₂ ile 72 saat yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. %1 NaCl içerisinde 3 saat bekletilmiş distile su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve 2N NaOH içerisinde ultrasonik banyoda 2 saat boyunca bekletilmiştir. Distile su ile yıkanmış ve aseton içerisinde 144 saat bekletilmiştir. Sığır femur kemiklerinden zenograft temizleme yöntemiyle elde edilmiş olan bu kemik dokuları, 34°C'de 6 saat kurutulmuştur. Zenograft temizleme yönteminin akış şeması şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Zenograft (sığır) kemik temizliği

4.2.2 Agar jeli ile kalıp hazırlanması

Daha önceki çalışmalarda PDMS polimeri kemik yüzey topografyasının yumuşak litografi tekniği ile taklit edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında da PDMS polimeri kemik yüzeyinin topografyasını çıkararak hidrojel yüzeyine aktarımı sağlanması amaçlanmıştır. Baskı yöntemi ile hidrojel yüzeyine kemik topografyası aktarılmaya çalışılmış ancak kontrollü baskı yapılamaması nedeniyle hidrojeller parçalanarak bütünlüğü bozulmuştur. Basınçla gerçekleştirilemeyen yüzey topografya aktarımı üzerine PDMS'in kalıp olarak kullanılabilirliği denenmiştir elde edilen negatif kemik yüzey taklit PDMS üzerine hidrojeller eklenerek çapraz bağlanması amaçlanmış ancak hidrofilik hidrofobik etkileşimlerden kalıplanamamış ve çapraz bağlanamamıştır. Bunun üzerine alternatif düşünülmüş ve agar jelinden negatif kemik yüzey taklitli kalıplar yapılması amaçlanmıştır. Agar doğal polimerin termal jelleşme mekanizmasından faydalanılarak, kemik yüzeyinin agar jel ile kaplanması gerçekleştirilmiştir. Agar jelinin konsantrasyonu arttıkça, mekanik olarak daha dayanıklı bir yapı elde edilmiştir. Agar jel, yumuşak litografi tekniği kullanılarak, kemik yüzeyinin negatif topografyasını başarıyla taklit etmektedir.

%5 oranında agar çözeltisi tamamen homojen hale getirildikten sonra, hazırlanan kalıba dökülmüştür. Jelleşme işlemi sırasında, kademeli bir yaklaşım benimsenerek gaz kabarcıklarının etkili bir şekilde uzaklaştırılması sağlanmış ve kemik agar çözeltisine daldırılmıştır. Bu aşama, +4 °C'de gerçekleştirilmiş ve jelleşme süreci tamamlanıncaya kadar beklenmiştir. Sonrasında, kalıptan dikkatlice çıkarılan kemik yüzey taklitli agar kalıbı, yumuşak litografi adı verilen yöntemle elde edilen negatif kemik yüzey taklidini oluşturmuştur.



Şekil 4.2 Negatif kemik yüzey taklitli agar kalıp hazırlanması

4.2.3 Sığır deri ve tendonun hücresizleştirilmesi

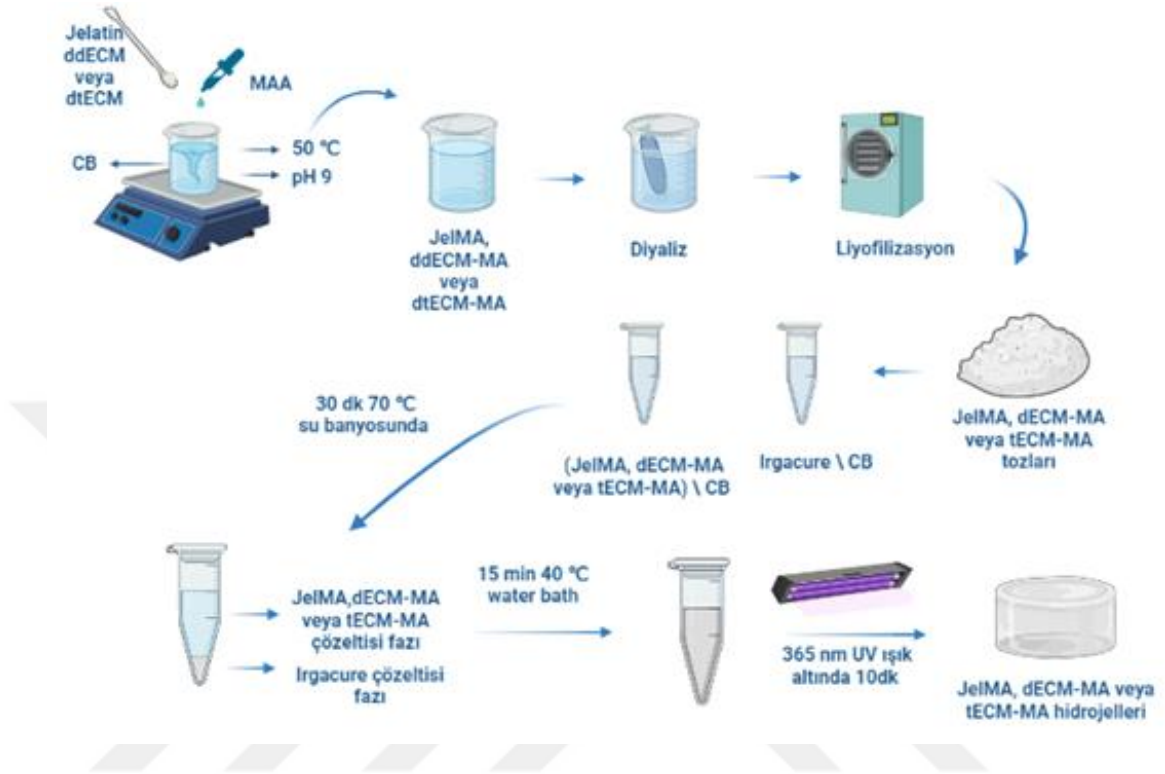
Sığır deri ve tendonundan alınan kesitler ayrı beherlerde olacak şekilde deiyonize su ile yıkanarak hücresizleştirme işlemine tabi tutulmuştur. İlk olarak deri ve tendon hücresel bileşenlerinden ayırmak için oda sıcaklığında % 0.25 tripsin çözeltisine 0.5 mM EDTA eklenerek 48 saat boyunca manyetik karıştırıcı içerisinde inkübe edilmiştir. Bakteri üremesini engellemek amacıyla çözeltiliye %0.02 (a/h) sodyum azid eklenmiştir. Ardından birkaç kez deiyonize su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Deri ve tendon dokuları oda sıcaklığında sürekli karıştırılan %0.5 Triton X-100 deterjanı içerisinde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Deterjanın uzaklaştırılması amacıyla dokular ikişer defa 30 dakika boyunca deiyonize suyla yıkanmıştır.

Hücresizleştirme işlemi tamamlandıktan sonra, dokular -80°C 'ye kadar soğutulmuş ve liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi, dokuların suyunun dondurulup ardından vakum altında buharlaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Liyofilize edilen dokular öğütücü yardımıyla toz formuna getirilerek doku stabilitesini korumak ve bozulmalarını önlemek amacıyla $+4^{\circ}\text{C}$ 'de depolanmıştır.

4.2.4 Jelatinin ve hücresizleştirilmiş sığır deri, tendon ECM'sinin metakrilatlanması

Ayrı ayrı hücresizleştirilmiş ve toz haline getirilmiş sığır deri ve tendon ECM'leri jelatin metakrilatlama protokolüne tabi tutulmuştur (Shirahama, 2016). Şekilde ayrı ayrı JelMA,

dECM-MA ve tECM-MA sentez ve çapraz bağlanma protokolü şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Metakrilatlanmış hidrojenlerin sentezi

4.2.4.1 JelMA sentezi

Ticari sığır jelatini %10'lık çözelti olacak şekilde karbonat-bikarbonat tamponunda 55°C sıcaklıkta manyetik karıştırıcı altında özünene kadar homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Tam çözünme sağlandıktan sonra pH değeri 9'a ayarlanmış ve sıcaklık 60°C'ye çıkarılarak her 1 gram jelatin başına 0,1 ml metakrilik anhidrit damla damla eklenmiştir. Metakrilik anhidrit, fotosensitif bir özelliğe sahip olduğu için reaksiyon karanlık bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, pH ve ısı kontrollü bir şekilde 3 saat boyunca karıştırılarak tamamlanmıştır. Reaksiyon, pH 7'ye getirilerek durdurulmuştur. Daha sonra, diyaliz membranına alınmış ve 5 gün boyunca distile suya karşı diyaliz edilmiştir. Ardından, liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuş ve toz formuna getirilerek +4°C'de depolanmıştır.

4.2.4.2 JelMA hidrojel eldesi

JelMA , fotoçapraz bağlayıcı ajan kullanılarak UV çapraz bağlama yöntemiyle hidrojel elde edilmiştir (Cellink).

%10'luk jelatin çözeltisi hazırlanması için ayrı falkon tüplerinde jelatin tozu (1 gr) karbonat-bikarbonat tamponu (8 ml) içerisine eklenir ve 70°C'de belirli aralıklarla vortexlenerek homojen bir şekilde çözünmesi sağlanır. Aynı şekilde ırgacure (0,1 gr) karbonat-bikarbonat tamponu (2 ml) içerisinde çözündürülür. Çözünme sağlandıktan sonra ırgacure falkon tüpü, jelatin falkon tüpü ile birleştirilir ve 45°C'de çalkalayıcılı su banyosunda 15 dk boyunca karışması sağlanır. Hazırlanan çözeltiler, bir sonraki kullanıma kadar +4°C'de depolanır.

4.2.4.3 Sığır dECM-MA ve tECM-MA sentezi

Hücreleştirilmiş sığır deri ECM ve sığır tendon ECM, JelMA metakrilatlama yöntemindeki gibi metakrilatlanmıştır.

Hücreleştirilmiş deri/ tendon ekstraselüler matrisi (ECM), karbonat-bikarbonat tamponunda %10 çözelti oranında 60 °C sıcaklıkta çözünene kadar karıştırılmıştır. Tam çözünme sağlandıktan sonra pH değeri 9'a ayarlanmış ve her 1 gram deri/ tendon ECM başına 0,2 ml metakrilik anhidrit damla damla eklenmiştir. Reaksiyon 3 saat boyunca devam ettirilmiş ve 3 saat sonunda pH 7'ye getirilerek reaksiyon durdurulmuştur. Daha sonra, diyaliz membranına alınarak 5 gün boyunca distile suya karşı diyaliz edilmiştir. Sonrasında, liyofilize edilerek toz formuna getirilmiş ve +4°C'de depolanmıştır.

4.2.4.4 Sığır dECM-MA ve tECM-MA hidrojellerinin eldesi

%10'luk Sığır dECM-MA/ tECM-MA çözeltisi hazırlanması için ayrı falkon tüplerinde Sığır dECM-MA/ tECM-MA tozu (1 gr) karbonat-bikarbonat tamponu (8 ml) içerisine eklenir ve 70°C'de belirli aralıklarla vortexlenerek homojen bir şekilde çözünmesi

sağlanır. Aynı şekilde ırgacure (0,1 gr) karbonat-bikarbonat tamponu (2 ml) içerisinde çözündürülür. Çözünme sağlandıktan sonra ırgacure falkon tüpü, Sığır dECM-MA/ tECM-MA falkon tüpü ile birleştirilir ve 45°C'de çalkalayıcılı su banyosunda 15 dk boyunca karışması sağlanır. Hazırlanan çözeltiler, bir sonraki kullanıma kadar +4°C'de depolanır.

4.2.5 Metakrilatlanmış hidrojellerin karakterizasyon çalışmaları

4.2.5.1 NMR

H1-NMR analizi için 10-20 mg saf jelatin tozu, hücresizleştirilmiş sığır deri ECM'i, hücresizleştirilmiş sığır tendon ECM'i, liyofilize edilen JelMA, Sığır dECM-MA ve tECM-MA örnekleri, 1 mL döteryum oksit içinde çözündürülmüştür. Çözeltilerden elde edilen NMR spektrumları, 0-10 ppm aralığında kaydedilmiştir.

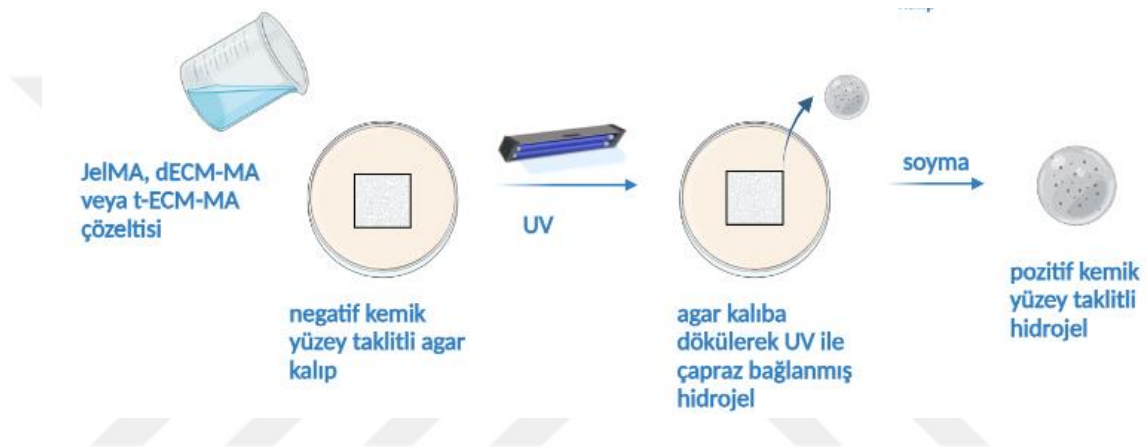
4.2.5.2 FTIR

Saf jelatin tozu, hücresizleştirilmiş sığır deri ECM'i, hücresizleştirilmiş sığır tendon ECM'i ve liyofilize edilen JelMA, sığır dECM-MA ve tECM-MA'nın FTIR spektrumları, 450-4000 cm⁻¹ spektral aralığında elde edilmiştir.

4.2.6 Yumuşak litografi yöntemi ile kemik yüzey taklidinin hidrojellere aktarılması

Negatif kemik yüzey taklitli agar jeli kalıp kullanılarak, pozitif kemik yüzey taklitli hidrojeller yumuşak litografi yöntemiyle başarıyla üretilmiştir. Bu yöntemde, agar jeli kalıp, kemik yüzeyin ayrıntılarını hassas bir şekilde yakalamak için kullanılmıştır. Ardından, hidrojel formülasyonu kullanılarak pozitif kemik yüzeyin taklit edildiği hidrojeller elde edilmiştir. Bu inovatif yaklaşım, kemik dokusunun kompleks topografisini ve yapısal özelliklerini hassas bir şekilde taklit etmeyi amaçlamaktadır.

Negatif yüzey taklitli agar jeli kalıbına, oda sıcaklığında sıvı hale gelen fotoçapraz bağlama ajanı içeren hidrojel çözeltileri (JelMA, sığır dECM-MA ve tECM-MA) eklenmiştir. Bu çözeltiler, hidrojel oluşumu için gerekli bileşenleri içermekte ve agar jelin negatif yüzeyinin ayrıntılarını taklit etmiştir. 365 nm dalga boyunda UV kaynağı kullanılarak 10 dakika boyunca çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemle hidrojel, çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlanan hidrojel, spatül yardımıyla dikkatlice agar kalıptan soyularak çıkarılmıştır. Bu adımlar sonucunda, negatif yüzey taklitli hidrojel yapısı başarılı bir şekilde elde edilmiştir.



Şekil 4.4 Yumuşak litografi tekniği ile negatif kemik yüzey taklitli agar kalıptan pozitif kemik yüzey taklitli hidrojel elde edilmesi

4.2.7 Kemik yüzey taklitli hidrojellerin karakterizasyon çalışmaları

4.2.7.1 Profilometre ölçüm analizi ile hidrojellerin yüzey topografyasının belirlenmesi ve ışık mikroskopunda görüntülenmesi

JelMA, sığır dECM-MA ve tECM-MA hidrojel örnekleri ile agar jeli örnekleri ve bu örneklerin pozitif kemik yüzey taklitli hidrojel örnekleri yüzey morfolojilerini incelemek amacıyla mikroskop altında incelenmiştir.

Profilometri, bir yüzeyin topografik özelliklerini ölçmek için kullanılan bir teknik olup yüzey yüksekliğini değişikliklerini tespit etmek amacıyla ve yüzey morfolojisini analiz etmek amacıyla kullanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında, örnekler (Agar jeli, JelMA, sıgır dECM-MA ve tECM-MA), yüzey pürüzlülüğü ölçümleri için profilometre cihazına düz ve taklitli olacak şekilde gruplara ayrılarak hazırlanmıştır. Profilometre cihazının kalibrasyonu tamamlandıktan sonra, belirli bir bölgede 0,2 mm kesim limiti ve 2 mm izleme yolu uygulanarak örnek üzerinde ölçüm yapılmıştır. Bu yöntem sayesinde örneğin yüzey pürüzlülüğü tespit edilmiştir.

4.2.7.2 Temas açısı ölçümü

Temas açısı ölçümü , malzemenin hidrofobik veya hidrofilik özelliği hakkında bilgi sağlayan bir yöntemdir. Bu ölçüm sıvının bir malzemenin yüzeyi üzerinde yayılma yeteneğini değerlendirerek gerçekleştirilir. Temas açısı, sıvının malzeme yüzeyiyle temas ettiği noktada oluşan bir açıdır ve bu açı, sıvının hidrofobik veya hidrofilik karakterini belirlemeye yardımcı olur.

Tez çalışması kapsamında, metakrilatlanmış hidrojeller ve kemik yüzey taklitli hidrojeller üzerinde temas açısı ölçümü gerçekleştirilmiştir. Ancak, hidrojellerin yüksek su tutma kapasiteleri nedeniyle su ile gerçekleştirilen yüzey temas açısı ölçümü mümkün olmamıştır. Yüzeye damlatılan su damlacığı, hidrojel tarafından hızla emilerek açı ölçümü yapılamamıştır. Bu durum, hidrojellerin suyu emme yeteneklerinin ölçüm sürecini etkilediğini göstermektedir. Bu nedenle, hidrojel yüzeylerin temas açısı ölçümü için alternatif yöntemler veya modifikasyonlar düşünülmelidir.

Hidrojellerin su ile gerçekleştirilen temas açısı ölçümünde yaşanan zorlukları aşmak için alternatif bir yaklaşım olarak, hidrojel yüzeylerin üzerine renklendirilmiş su damlacıkları yerleştirilmiştir. Bu su damlacıkları, gıda boyası kullanılarak renklendirilmiştir. Ardından, su damlacığı hidrojel yüzeye temas ettiği anı yansıtan bir görüntü, ağır çekim modunda çekilmiştir. Bu görüntüde, damlacığın temas anındaki şekli ve yayılımı belirginleşmiştir. Daha sonra, bu görüntü üzerinden temas açısı ($\cos \theta$) ölçümü yapılmış ve ilgili hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Ancak, renklendirilmiş su damlacığı yönteminin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği konusunda daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

4.2.7.3 Mekanik test (Basma)

JelMA, dECM-MA ve tECM-MA hidrojel örnekleri (düz ve taklit olacak şekilde) 1 dk suda bekletilmiş ve bekletilmemiş olarak iki grupta incelenmek üzere 8mm çapta ve 3mm yükseklikte kesitler alınarak hazırlanmıştır. 10N kapasitedeki test cihazına yerleştirilen hidrojeller oda sıcaklığında (25°C) 1.1mm/dk hızda sıkıştırılmıştır. Deforme olan hidrojellerin basma kuvvetleri not edilmiştir. Elde edilen verilerle gerilim-gerinim grafikleri çizilerek iki grup malzeme karşılaştırılmak üzere değerlendirilmiştir.

4.2.7.4 Şişme testi

JelMA, sığır dECM-MA ve t-ECM-MA hidrojellerinin su emme kapasitelerinin değerlendirilmesi amacıyla hidrojel ve hidrojellerin liyofilize edilmiş halleri olmak üzere iki ayrı grup altında (n=2) şişme testi gerçekleştirilmiştir. Numuneler, çapraz bağlama işleminden sonra başlangıç ağırlıkları (W_0) belirlenmiştir, ardından belirli süreler (1 dk, 3 dk, 5 dk) boyunca distile su içinde bekletilmiştir. Suyu absorbe eden numuneler hemen tartılarak (W_s) kaydedilmiş ve şişme derecesi;

$$\% \text{ Şişme Derecesi} = [(W_s - W_0) / W_0] \times 100$$

denklemine dayanarak hesaplanmıştır.

4.2.7.5 Biyobozunurluk çalışmaları

JelMA, sığır dECM-MA ve t-ECM-MA hidrojellerinin biyobozunma hızları, düz ve kemik yüzey taklitli gruplar oluşturularak (n=3) hidrolitik (PBS) ve enzimatik (Lizozim) bozunma testleriyle incelenmiştir. Başlangıç ağırlıkları ölçülen hidrojeller, ardından ayrı ayrı PBS ve Lizozim çözeltileri içinde 1., 3., 5., 7., 10., 15., 20. ve 30. günler boyunca 37°C sıcaklıkta ve 75 rpm çalkalama hızında bozunmaya bırakılmıştır. Belirlenen zaman noktalarında hidrojeller çözeltilerden alınarak kurutulmuş ve ağırlıkları hassas bir şekilde yeniden ölçülmüştür.

4.2.8 Hücre kültür çalışmaları

Hücre kültür çalışmaları, insan osteosarkoma (SaOs-2) ve fare fibroblast (L929) hücre hatlarıyla gerçekleştirilmiştir. Her iki hücre hattı da 37 °C'de çözündürülmüş ve DMEM-F12 (%10 fetal sığır serumu, FBS, ve %1 antibiyotik-antimikotik ile hazırlanmış) besiyeriyle süspansiyon haline getirilmiştir. Süspansiyon, 1200 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek süpernatant atılmıştır. Hücre pelleti, DMEM-F12 besiyeriyle yeniden süspansiyon haline getirilmiş ve kültür kaplarına aktarılmıştır. Kültür kaplarındaki hücreler, %5 CO₂ içeren bir inkübatörde 37 °C'de kültürlenmiştir.

4.2.8.1 Sitotoksosite

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) testi, sitotoksosite veya hücre canlılığını değerlendirmek için kullanılan bir kolorimetrik testtir. Bu test, hücrelerin mitokondriyal fonksiyonunu belirlemek amacıyla süksinat dehidrogenaz gibi mitokondriyal enzimlerin aktivitesini ölçer. MTT testi, hücreler tarafından alınan ve mitokondriyal enzimler tarafından indirgenen MTT bileşiğinin formazan ürününün oluşumuyla çalışır. Formazan ürünü, renksiz olan MTT bileşiğinden farklı bir mor renge sahiptir ve bu renk spektrofotometrik olarak ölçülerek hücre canlılığı hakkında bilgi sağlar. Bu yöntem, hücrelerin metabolik aktivitesi ve hücre proliferasyonunu belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Tez çalışması kapsamında, MTT testi insan osteosarkoma (SaOs-2) ve fare fibroblast (L929) hücre hatlarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, JelMA, sığır dECM-MA ve tECM-MA hidrojelleri farklı konsantrasyonlarda (%5, %7 ve %10) hazırlanmıştır. Hidrojeller sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Hidrojeller, hücre kabinine yerleştirildikten sonra 30 dakika boyunca UV sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra %70 EtOH içinde 1 saat bekletilmiş ve %1 antibiyotik-antimikotik içeren PBS ile yıkanmıştır. Ardından, DMEM-F12 besiyeri içinde yıkanmış ve besiyerinde 37°C'lik bir inkübatörde 1 gün boyunca bekletilmiştir. Bu adımlar, hücrelerin hidrojel yüzeyinde uygun bir ortamda kültüre edilmesini sağlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Sterilizasyonu tamamlanan hidrojeller, n=3 olarak belirlenen gruplar halinde 15 ml'lik falkon tüplere aktarılmış ve besiyerine daldırılarak inkübatöre yerleştirilmiştir. Aynı anda, 48 kuyucuklu plakalara 10×10^4 hücre ekimi yapılmıştır. MTT testi, 24 ve 48 saat süresince gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerden önce belirlenen günlerde, kuyucuklardaki besiyerleri malzeme içerikli besiyerleriyle değiştirilerek inkübe edilmiştir. MTT reaktifi, 1:15 oranında besiyeriyle birlikte eklenerek 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. 4 saatlik inkübasyon süresinin sonunda, kuyucuklara izopropil alkol-HCl çözelti karışımı eklenmiş ve 96 kuyucuklu plakalara transfer edilerek mikroparka okuyucusunda 570 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır. Bu adımlar, hücrelerin metabolik aktivitesini değerlendirmek amacıyla MTT testinin gerçekleştirildiği süreci yansıtmaktadır.

4.2.8.2 Hücrelerin malzeme üzerindeki çoğalma davranışı

Sitotoksosite testi sonuçları dikkate alınarak, JelMA, sığır dECM-MA ve tECM-MA hidrojelleri için optimal taklit yeteneği elde etmek amacıyla %10 konsantrasyon seçilmiştir. Bu konsantrasyondaki hidrojeller üzerinde deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu seçim, sitotoksosite testi sonuçlarına dayanarak ve istenen taklit yeteneğini elde etmek için yapılan titiz değerlendirmeler sonucunda belirlenmiştir.

Tez kapsamında JelMA, sığır dECM-MA ve tECM-MA hidrojelleri ile yumuşak litografi tekniği kullanılarak elde edilen kemik yüzey taklitli T-JelMA, T-dECM-MA ve T-tECM-MA hidrojelleri ikili gruplar halinde (n=3) incelenmiştir. İnsan osteosarkoma hücreleri (SaOs-2), bu hidrojeller üzerindeki hücre çoğalma davranışı MTT reaktifi kullanılarak 1., 3., 5. ve 7. günlerde değerlendirilmiştir. Hidrojeller, 48 kuyucuklu plakalara yerleştirilerek her birine 10×10^4 hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücre yapışmasını sağlamak amacıyla inkübatörde, 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra besiyeri eklenmiştir. Belirlenen günlerde kültür ortamı aspire edilerek MTT reaktifi, DMEM-F12 besiyeri ile 1:15 oranında seyreltilerek kültür ortamına eklenmiştir ve 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. 4 saatlik inkübasyon süresi sonunda çözeltiler, 96 kuyucuklu plakalara aktararak mikroparka okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır.

4.2.8.3 Alizarin red boyaması

Bu yöntem, kalsiyum birikimlerinin değerlendirilmesi için Alizarin Red boyamasının kullanıldığı ve setilpiridinyum klorür (CPC) ekstraksiyon yöntemine duyarlı olduğu bir hücre kültürü çalışmasıdır.

Tez çalışması kapsamında, JelMA, sığır dECM-MA ve tECM-MA hidrojenleri ile kemik yüzey taklitli T-JelMA, T-dECM-MA ve T-tECM-MA hidrojenleri, ikili gruplar halinde (n=3) incelenmiştir. İnsan osteosarkoma hücreleri (SaOs-2), 48 kuyucuklu plakalara yerleştirilen hidrojenlerin üzerine 10×10^4 hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Kültür süresi boyunca (3., 7. ve 14. günler), kültür ortamı aspirasyonu gerçekleştirilerek, PBS ile yıkama işlemi yapılmış ve ardından %70 EtOH içerisinde 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra, deiyonize su ile yıkanan örnekler Alizarin Red boyası ile oda sıcaklığında 10 dakika boyanmıştır. Boyama işleminden sonra, örnekler iyice yıkanarak PBS içerisinde 15 dakika bekletilmiş ve %10 CPC (setilpiridinyum klorür) çözeltisinde 15 dakika bekletilmiştir. Son olarak, 200 µl örnek alınarak 96 kuyucuklu plakalara transfer edilerek 562 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır.

4.2.8.4 SEM görüntüleri

Bu tez çalışması, düz ve taklit hidrojel olmak üzere iki gruba ayrılan hidrojenler üzerinde insan osteosarkoma hücreleri (SaOs-2) ile 10×10^4 hücre ekimi gerçekleştirilerek yapılmıştır. Belirli günlerde (1. ve 3. gün) hidrojel örnekleri fiksasyon sonrası SEM analizi kullanılarak görüntülenmiştir.

4.2.8.5 Canlı-ölü hücre görüntüleri

Bu tez çalışması, düz ve taklit hidrojel olmak üzere iki gruba ayrılan hidrojenler üzerinde insan osteosarkoma hücreleri (SaOs-2) ile 10×10^4 hücre ekimi gerçekleştirilerek yapılmıştır. Belirli zaman noktalarında (1. ve 3. gün), hidrojel örneklerinin hücre-malzeme etkileşimini değerlendirmek amacıyla Akridin Orange Propidyum iyodid

boyaması gerçekleştirilmiştir. Ancak, jellerin kendisi de boyandığı için sağlıklı görüntüler elde edilememiştir. Bu nedenle, daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen JelMA ve tECM-MA hidrojel malzemelerinin hücre etkileşimini göstermek amacıyla farklı bir deneyde insan dermal fibroblast hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen Kalsein temelli canlı hücre boyama sonuçları Ek 1’de sunulmuştur.



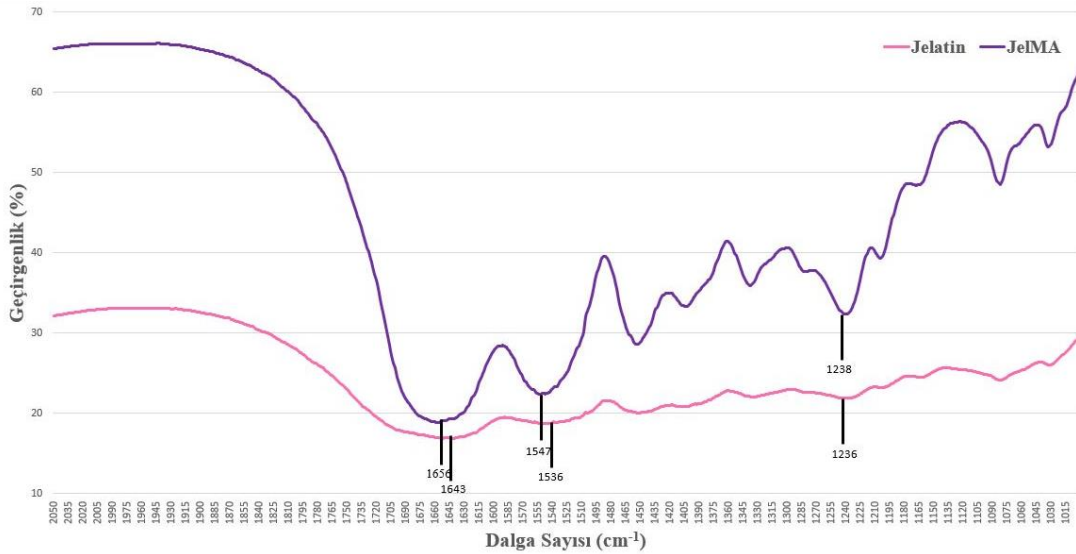
5. BULGULAR

Kemik doku mühendisliği alanında, dokunun kendi bileşenlerini içeren hidrojeller sentezlenerek kemik yüzey taklitli hidrojel dokunun üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu hidrojellerin karakterizasyonu ve hücre çalışmalarıyla elde edilen bulgular aşağıda yer almaktadır.

5.1 Hidrojellerin Kimyasal Karakterizasyon Çalışmaları

5.1.1 Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

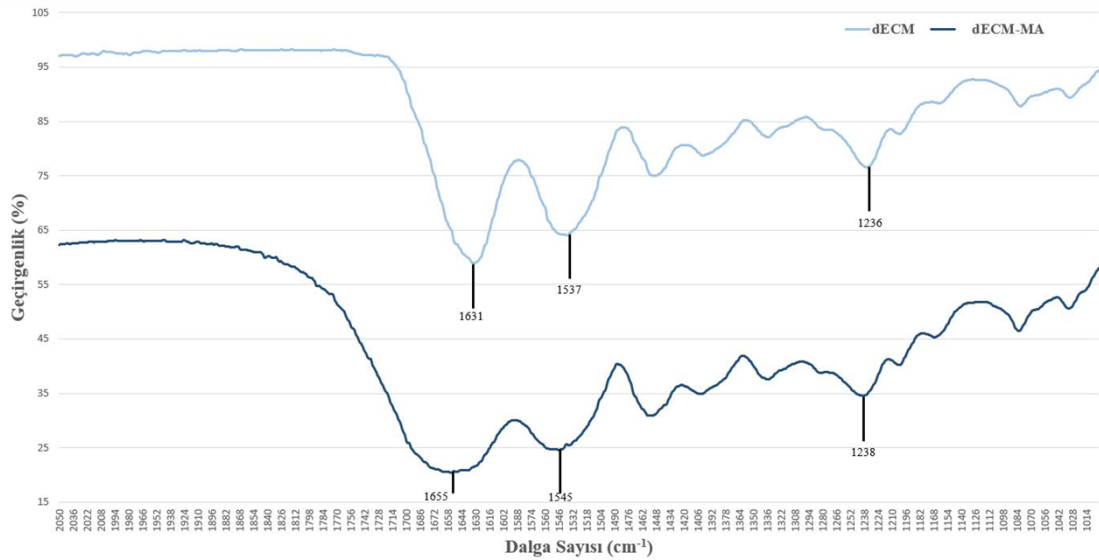
Jelatin ve modifiye edilmiş JelMA (Jelatin Metakrilat), ddECM (hücresizleştirilmiş sıgır deri ECM'si) ve dECM-MA, dtECM (hücresizleştirilmiş sıgır tendon ECM'si) ve tECM-MA moleküllerinin yapısal ve fonksiyonel gruplarını doğrulamak için FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) spektrumları karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma, moleküller arasındaki kimyasal bağları belirlemeyi amaçlamaktadır. Şekil 5.1'de jelatin ve JelMA'nın FTIR spektrumlarının grafiği verilmiştir.



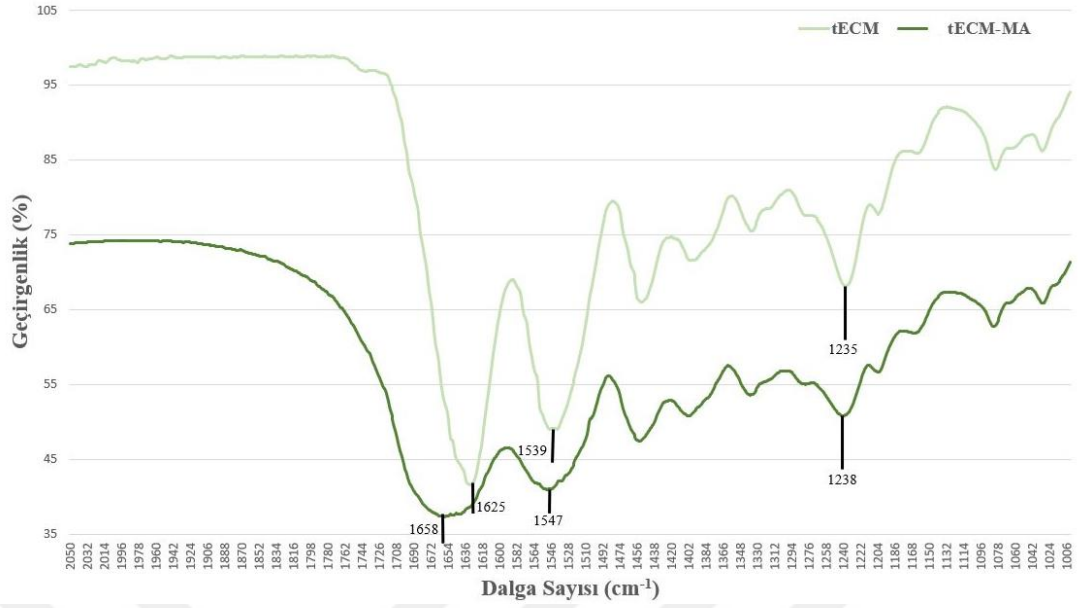
Şekil 5.1 Saf jelatin ve sentezlenen JelMA'nın FTIR spektrumları

Tez çalışması kapsamında sentezlenen JelMA, dECM-MA ve tECM-MA hidrojellerinin FTIR spektrumları, başlangıç materyalleri olan saf jelatin, ddECM ve dtECM ile karşılaştırılmıştır. Genel olarak, jelatin, dECM ve tECM hidrojellerinin benzer bileşime sahip olduğu göz önüne alındığında, gözlemlenen pikler oldukça yakın konumlanmaktadır. Detaylı bir analiz gerçekleştirildiğinde, jelatin ve JelMA hidrojellerinin spektrumlarının absorbans değerleri karşılaştırıldığında, sırasıyla (Jelatin, JelMA) 1643 cm^{-1} ve 1656 cm^{-1} 'lik pikler, amid I bağının C=O gerilme gruplarını yansıtmaktadır. Amid II bağının N-H bükülmesini gösteren karakteristik pikler ise 1536 cm^{-1} ve 1547 cm^{-1} olarak gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra, 1236 cm^{-1} ve 1238 cm^{-1} pikleri, amid III bağının C-N gerilmesini ve N-H bükülmesini ifade etmektedir. Son olarak, 3412 cm^{-1} ve 3328 cm^{-1} 'lik karakteristik pikler, peptit bağlarının N-H gerilmesini ve -OH fonksiyonlu grupların varlığını işaret etmektedir.

ddECM- dECM-MA ve dtECM- tECM-MA kendi içlerinde ve jelatin- JelMA değerleriyle kıyaslandığında çok benzer sonuçlar verdiği görülmektedir.



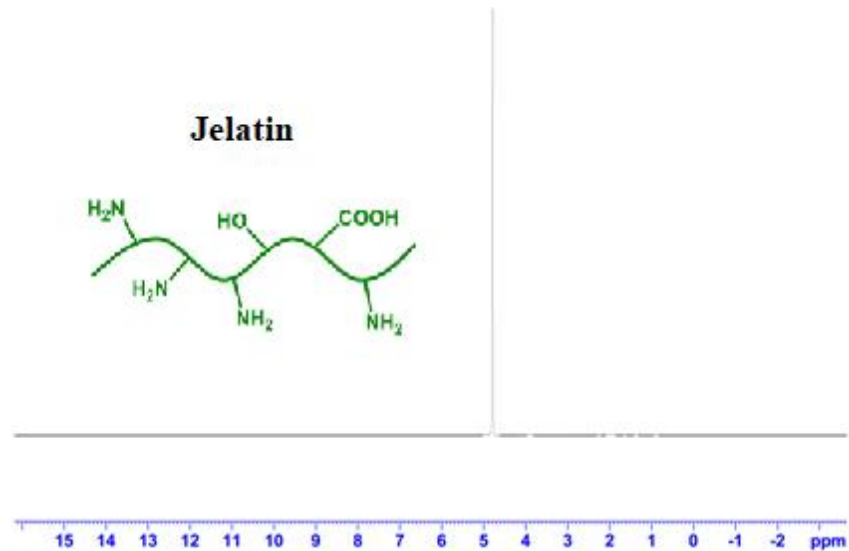
Şekil 5.2 Hüresizleştirilmiş dECM ve sentezlenen dECM-MA'nın FTIR spektrumları



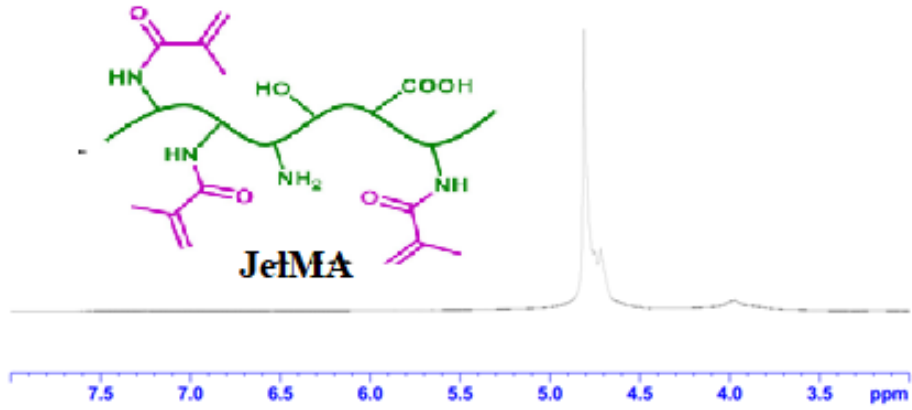
Şekil 5.3 Hüresizleştirilmiş tECM ve sentezlenen tECM-MA'nın FTIR spektrumları

5.1.2 NMR spektroskopisi

Jelatin ve JelMA tozlarından 10 mg tartılarak döteryum oksit içinde çözündürülmüş ve NMR spektroskopisi analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.4 Saf jelatinin NMR spektrumu



Şekil 5.5 Sentezlenen JelMA'nın NMR spektrumu

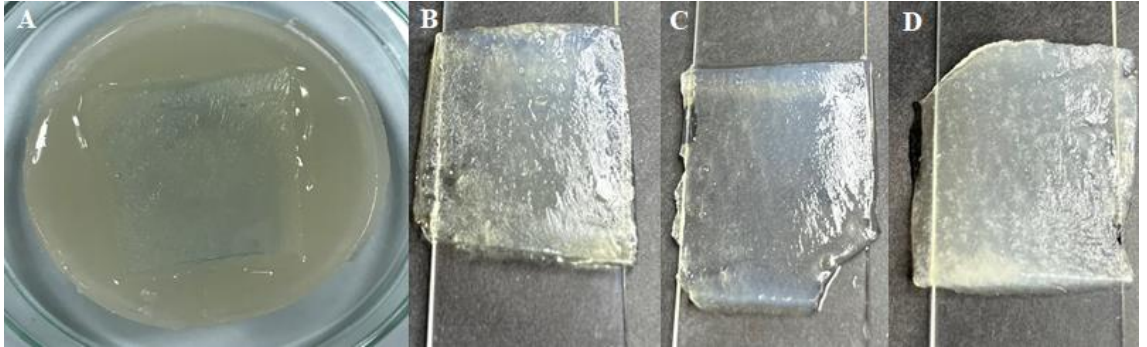
5.2 Zenogreft Kemik Temizlenmesi ve Agar Jeli ile Kalıp hazırlanması

Çalışmada, sığır femur kemiğinden özenle seçilen küçük parçalar kullanılmıştır. Bu kemik parçaları, yağ ve ilik kısımları temizlenerek önceden belirlenmiş bir protokol olan zenogreft kimyasal temizliği işlemine tabi tutulmuştur. Zenogreft kimyasal temizliği, kemik yüzeyinin belirginleşmesini sağlayarak temizlenmiş kemiklerin elde edilmesini sağlamıştır. Kemiğin zenogreft işlemi öncesi ve sonrası görüntüleri Şekil 5.6'da sunulmuştur. Zenogreft işlemi öncesi görüntüde, kemiğin doğal yapısı ve yüzeyi görülebilirken, zenogreft işlemi sonrası görüntüde kemik yüzeyinin belirgin bir şekilde değiştiği ve düzenli bir topografiye sahip olduğu gözlenmektedir.



Şekil 5.6 (A) Kemik zenogreft temizleme öncesi kesilmiş sığır femur kemikleri, (B) Kemik zenogreft temizleme sonrası sığır femur kemik görüntüleri

Kemik yüzeyinin topografyasını taklit etmek amacıyla agar doğal polimerine aktarılmış ve yumuşak litografi tekniği kullanılmıştır.



Şekil 5.7 (A) Negatif kemik yüzey taklitli agar kalıp, (B) T-JelMA, (C) T-tECM-MA, (D) T-dECM-MA hidrojenlerin görüntüleri

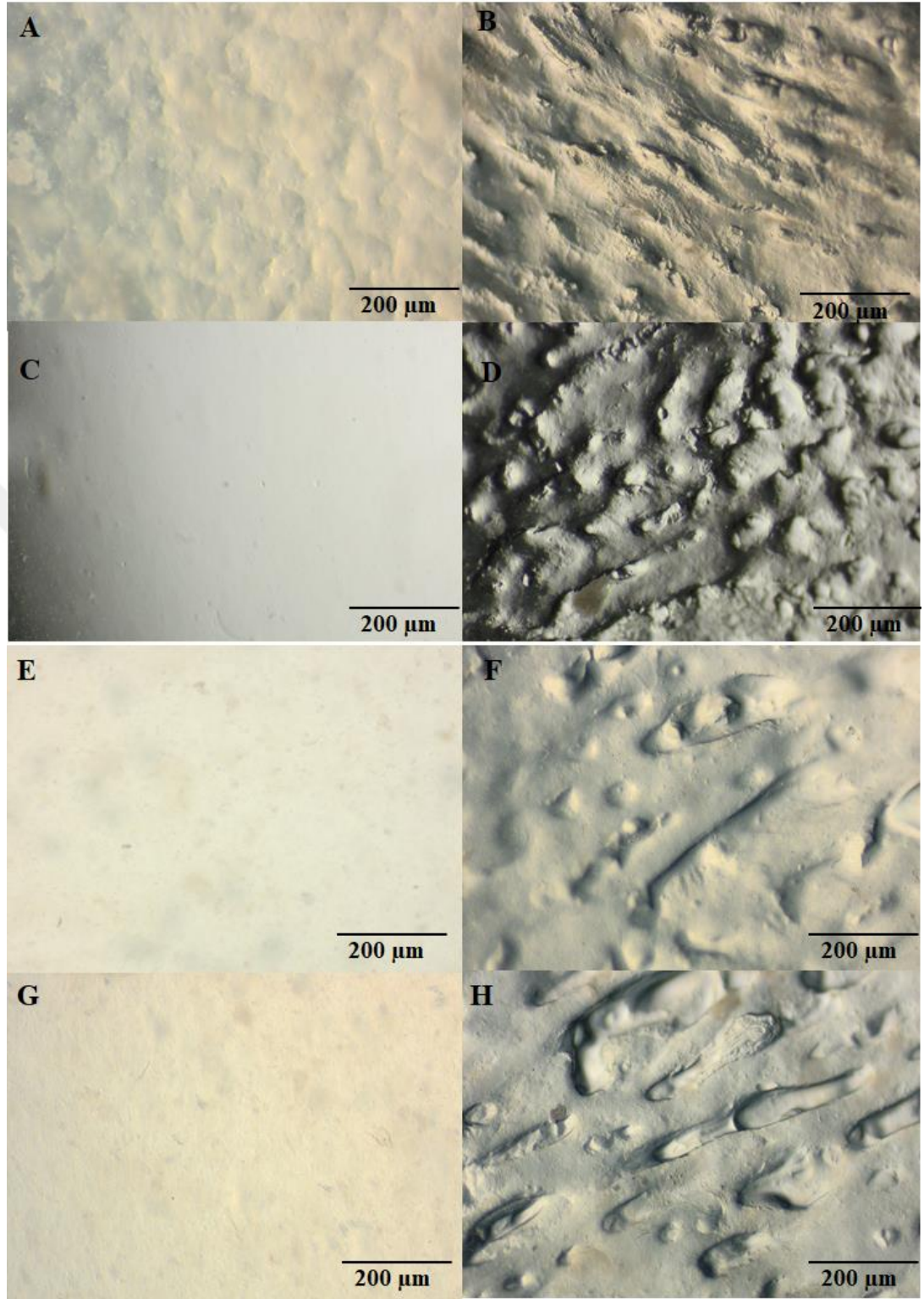
Daha önce yapılan çalışmada, kemik yüzey taklidi için PDMS polimeri kullanılmıştır (Erenay vd., 2022). Ancak PDMS polimerinin hidrofobik özelliğinden hidrojenler PDMS kalıba dökülememiş ve istenen kemik yüzey taklitli hidrojenler elde edilememiştir. Bu sorunu çözmek amacıyla, agar jel kalıp olarak kullanılması önerilmiş ve uygulanmıştır. %5 agar çözeltisi hazırlanmış ve karıştırılarak çözünmesi sağlanmıştır. Ardından kemik

daldırılabilir bir kalıba dökülmüş, kademeli olarak soğutulmuş ve gaz kabarcıklarının oluşmamasına özen gösterilerek jelleştirilmiştir. Jelleşme tamamlandıktan sonra +4°C’de 5 dakika bekletilerek agar jel kalıptan çıkarılmış ve yumuşak litografi tekniği kullanılarak kemik agar jelinden dikkatlice soyulmuştur. Böylelikle, kemiğin pozitif kemik yüzeyi negatif kemik yüzeyi olarak agar kalıbına aktarılmıştır. Agar jel, hidrojelere kemik yüzeyinin aktarılmasını sağlayan bir kalıp olarak kullanılmıştır. Yumuşak litografi tekniği kullanılarak elde edilen negatif kemik yüzey taklitli agar kalıbı, metakrilatlanmış ve fotoçapraz bağlayıcı içeren çözeltilerin dikkatle kalıba dökülmesi ve ardından UV ışığıyla çapraz bağlanması sağlanır. Bu adımdan sonra pozitif kemik yüzey taklitli hidrojel agar kalıptan soyularak çıkarılmıştır ve pozitif kemik yüzey taklitli hidrojeller şekil 5.7’de gösterildiği gibi elde edilmiştir.

5.3 Profilometre Ölçüm Analizi ile Hidrojellerin Yüzey Topografyasının Belirlenmesi

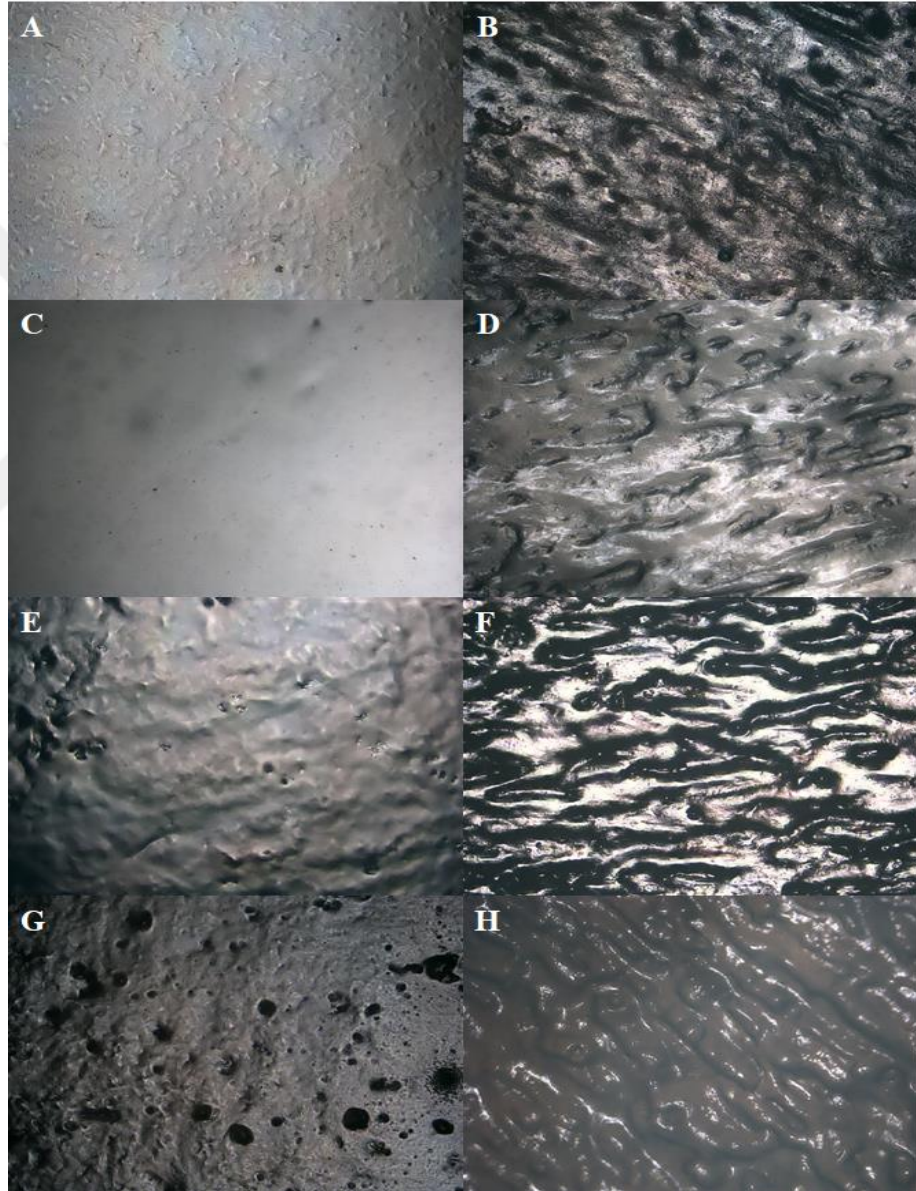
5.3.1 Işık mikroskop görüntüleri

JelMA, dECM-MA ve tECM-MA hidrojellerinin kemik yüzey taklitsiz ve kemik yüzey taklitli hidrojeller mikroskop altında karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Gözle görünür bir değişiklik, şekil 5.8’de kemik yüzey topografyasının başarılı bir şekilde aktarılabildiğini göstermek adına gerçekleştirilmiştir.

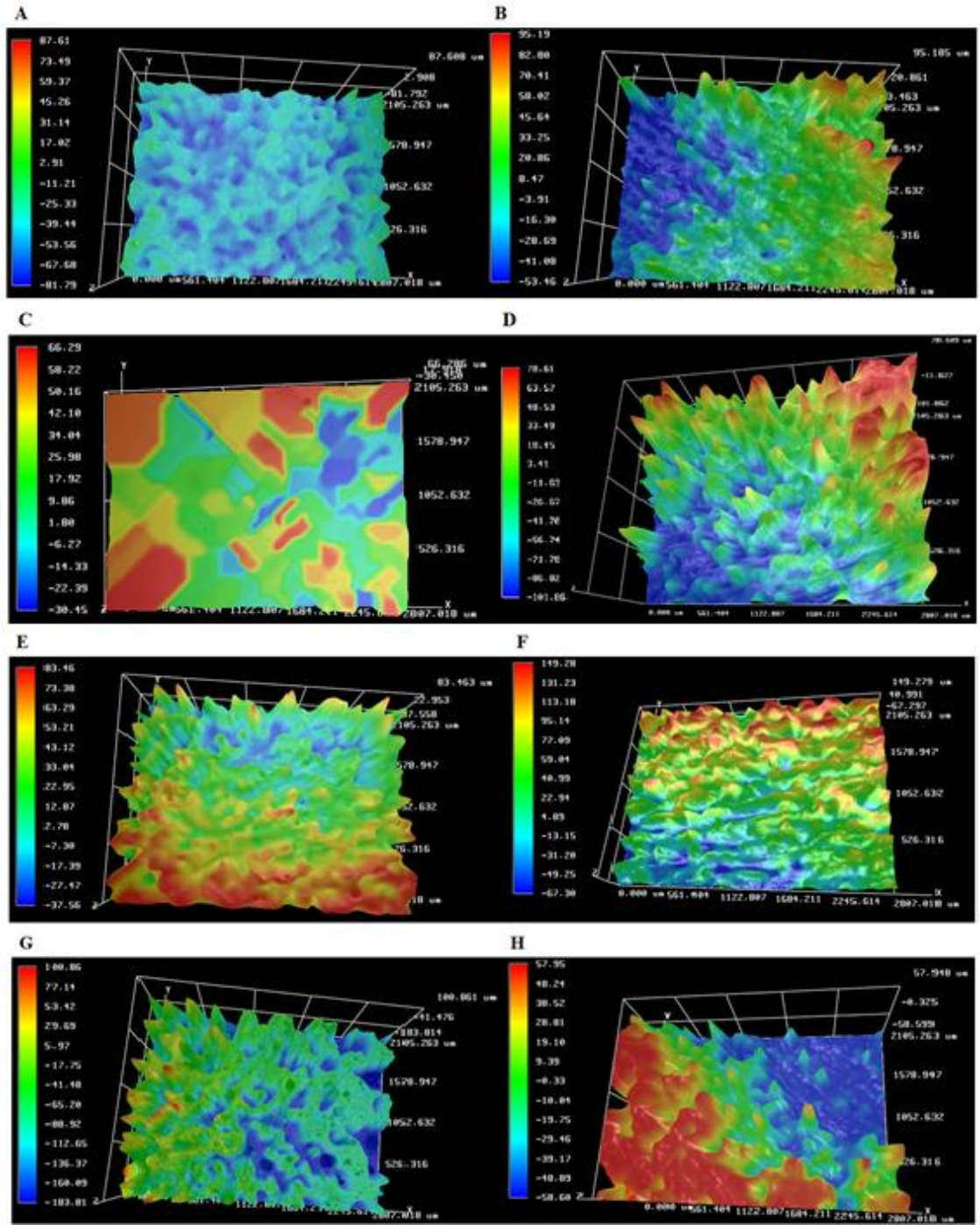


Şekil 5.8 A) Agar, (B) T-Agar, (C) JelMA, (D) T-JelMA, (E) dECM-MA, (F) T-dECM-MA, (G) tECM-MA, (H) T-tECM-MA hidrojenlerin profilometre analiz öncesi ışık mikroskobu altında çekilmiş görüntüleri

Kalıp olarak kullanılan agar ile hidrojeller, düz ve kemik yüzey taklitli olacak şekilde hazırlanmış ve hidrojeller JelMA, T-JelMA, dECM-MA, T-ECM-MA, tECM-MA ve T-tECM-MA şeklinde hazırlanarak analize tabi tutulmuştur. Optik profilometri tekniği kullanılarak profilometri cihazında, yüzeye yönlendirilen ışığın yüzeyden yansıtılarak veya saçılarak toplandığı ve algılayıcılar tarafından bu ışık verilerinin analiz edilerek yüzey profilinin oluşturulduğu analiz yöntemidir.



Şekil 5. 9 (A) Agar, (B) T-Agar, (C) JelMA, (D) T-JelMA, (E) dECM-MA, (D) T-dECM-MA, (G) tECM-MA, (H) T-tECM-MA hidrojellerin profilometre analiz sırasında ışık mikroskobu altında çekilmiş görüntüleri

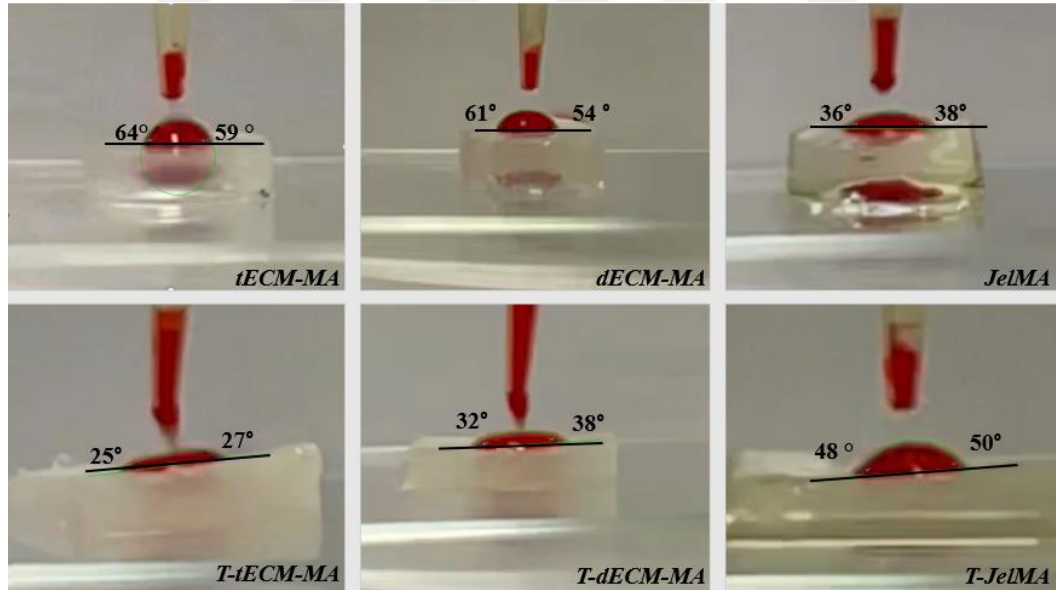


Şekil 5.10 (A) Agar, (B) T-Agar, (C) JelMA, (D) T-JelMA, (E) dECM-MA, (F) T-dECM-MA, (G) tECM-MA, (H) T-tECM-MA hidrojellerin profilometre analiz yöntemi ile yüzey topografyasının belirlenmesi

5.4 Temas Açısı

Temas açısı ölçümü, malzeme yüzeyinin yüzey enerjisi, polar ve apolar bileşenleri, yüzey pürüzlülüğü gibi faktörlerin analizinde önemli bir araçtır. Hidrofobik yüzeyler genellikle büyük bir temas açısı (>90 derece) sergilerken, hidrofilik yüzeyler ise küçük bir temas açısı (<90 derece) gösterir. Bu ölçüm, malzeme tasarımı, kaplamaların performansı, yüzey işleme işlemleri ve sıvı madde arayüzünde meydana gelen etkileşimlerin anlaşılması gibi birçok alanda kullanılır.

Temas açısı ölçümü, malzeme yüzeyinin ıslatılabilirlik özelliklerini değerlendirirken aynı zamanda hidrofobik veya hidrofilik kaplamaların karakterizasyonunda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ölçüm, malzeme bilimi, kimya, biyomedikal araştırmalar ve yüzey mühendisliği gibi disiplinlerde önemli bir analiz tekniğidir.



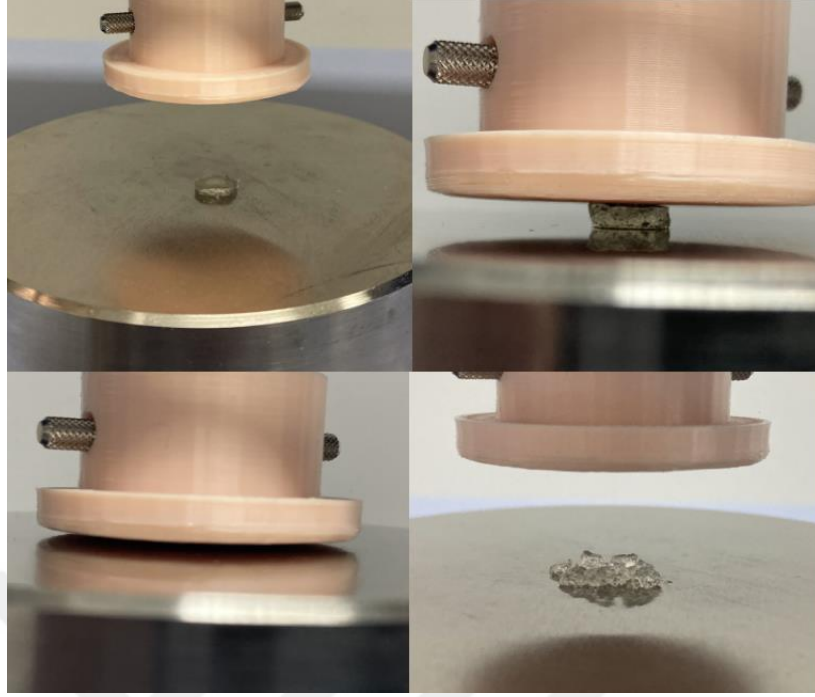
Şekil 5.11 Hidrojellerin temas açısı ölçümü görüntüleri

Tez çalışması kapsamında, malzeme yüzeyine renkli bir su damlası damlatılarak ağır çekim modunda damlacığın malzeme yüzeyine temas ettiği anın görüntüsü kaydedilmiştir. Video içerisindeki her bir frame tek tek incelenmiş ve bu frame

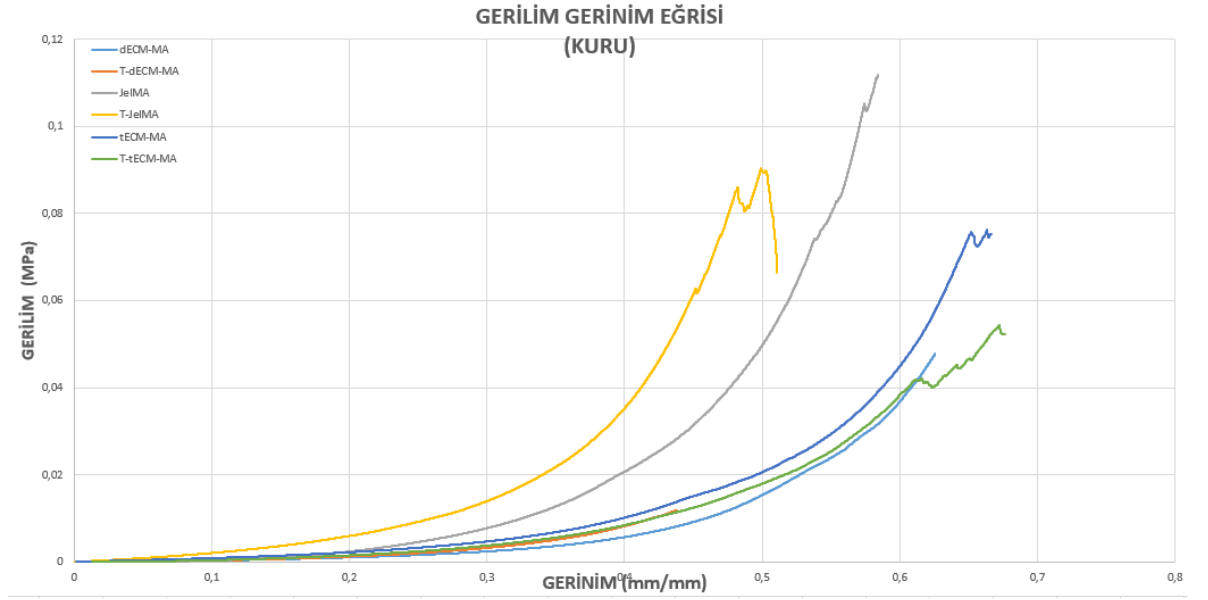
arasından damlacığın malzemeye temas ettiği ilk an görüntü olarak alınmıştır. Daha sonra ImageJ programı kullanılarak açı ölçümü yapılmıştır. Şekil 5.10'da gösterilmiştir. Karşılaştırma yapıldığında, tECM-MA hidrojel için açı değeri 59-64° aralığında, T-tECM-MA hidrojel için ise 25-27° aralığındadır. Bu sonuçlar, 90° altında bir açı değeri göstermesi, malzemenin hidrofilik özelliklere sahip olduğunun bir kanıtıdır. dECM-MA hidrojel ile T-dECM-MA hidrojel arasında yapılan kıyaslama sonucunda, kemik yüzey taklidi olmayan hidrojelin temas açısı 54-61° aralığında olduğu, buna karşılık kemik yüzey taklitli hidrojelin temas açısının ise 32-38° aralığında olduğu tespit edilmiştir. JelMA ve T-JelMA hidrojelleri arasında yapılan kıyaslama ise, yüzey taklidi olmayan hidrojelin temas açısının 36-38° aralığında olduğunu, ancak kemik yüzey taklitli hidrojelin temas açısının 48-50° aralığında olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, hidrojellerin hidrofilik özelliklere sahip olduğunun kanıtıdır.

5.5 Mekanik Analiz

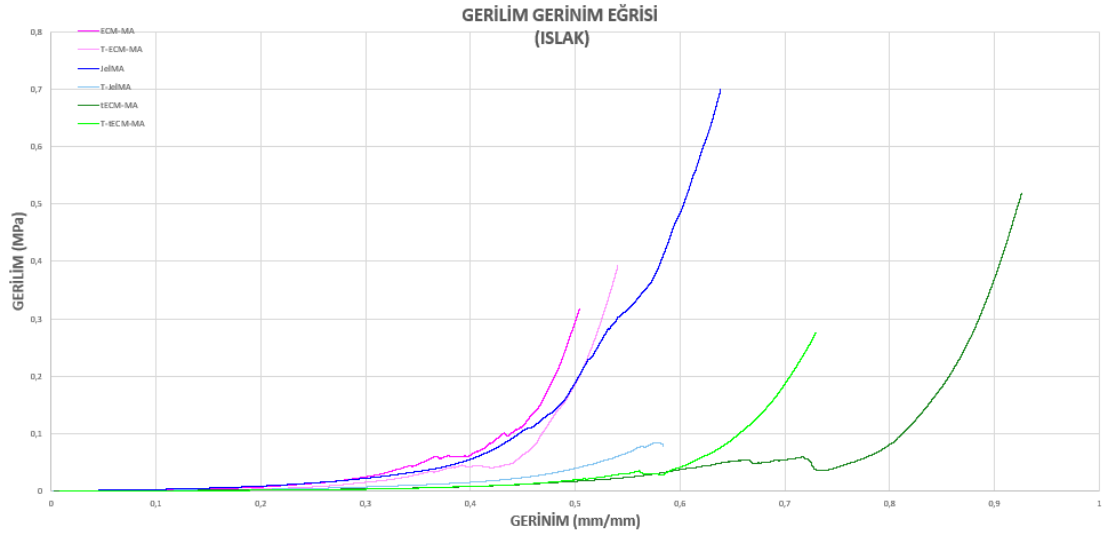
Bu tez çalışması, düz hidrojel ve kemik yüzey taklitli hidrojeller olmak üzere iki farklı grup (n=3) üzerinde yapılmıştır. Mekanik basma testi, hidrojellerin çapraz bağlama işleminden sonra doğrudan ölçüm alınarak ve 1 dakika boyunca distile su içinde bekletildikten sonra ölçüm alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu iki farklı grubun ölçümleri alınarak gerekli hesaplamalar yapılarak gelime karşı gerinim grafiği şekil 5.12 ve şekil 5.13'de ıslak ve kuru olarak gösterildiği gibi çizilmiştir.



Şekil 5.12 Hidrojellerin basma testi görüntüleri



Şekil 5.13 Kemik yüzey taklitli ve taklit olmayan hidrojellerin basma testi sonucunda elde edilen gerilim- gerinim eğrisi (kuru) (Stress-Strain Curve)



Şekil 5.14 Kemik yüzey taklitli ve taklit olmayan hidrojellerin basma testi sonucunda elde edilen gerilim- gerinim eğrisi (ıslak) (Stress-Strain Curve)

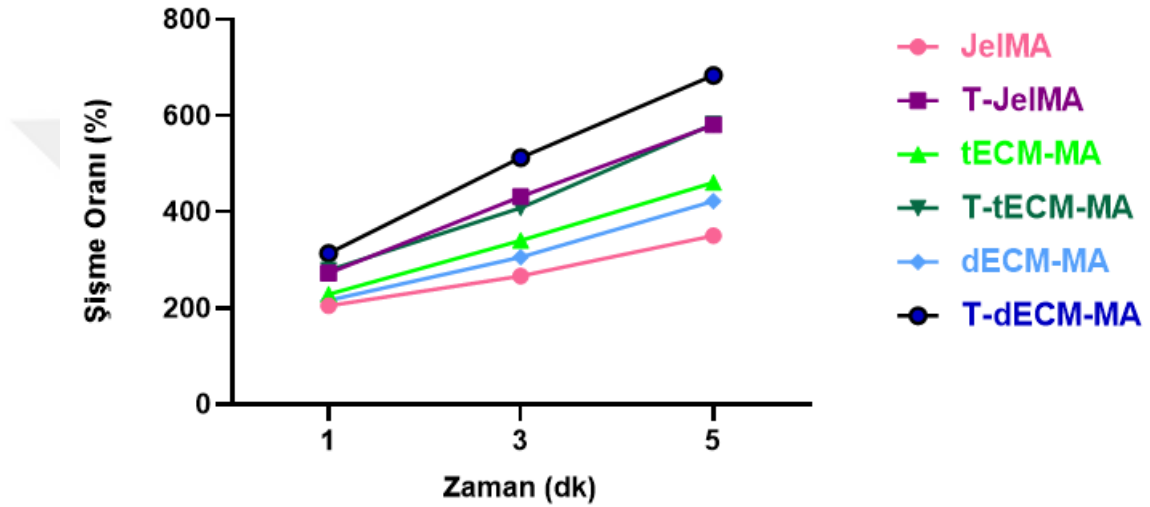
Çizelge 5.1 Mekanik basma testi analizi grafiklerinden elde edilen Islak ve kuru grupların Young modul ve stres gerilim tablosu

ISLAK	Young Modulus (Mpa)	UTS (Mpa)
T-tECM-MA	0.0015	0,456431632
tECM-MA	0.0037	0,925659644
T-JelMA	0.0028	0,084072897
JelMA	0.0202	0,758373721
T-dECM-MA	0.0026	0,392813764
dECM-MA	0.0036	0,317928649

KURU	Young Modulus (Mpa)	UTS (Mpa)
T-tECM-MA	0.0018	0,456431632
tECM-MA	0.0079	0,925659644
T-JelMA	0.0163	0,084072897
JelMA	0.0009	0,758373721
T-dECM-MA	0.0019	0,392813764
dECM-MA	0.002	0,317928649

5.6 Şişme Testi

Tez çalışması kapsamında, kemik yüzey taklitli ve düz olarak gruplanan JelMA, dECM-MA ve tECM-MA hidrojel örneklerinin şişme davranışı distile su ortamında zamanla değişimine göre (1., 3. ve 5. dakika) değerlendirilmiştir. Hidrojellerin ağırlık değişimi, % şişme oranı olarak hesaplanmıştır. Bu şekilde, hidrojellerin su emme kapasiteleri ve şişme özellikleri zamana bağlı olarak incelenmiştir.



Şekil 5.15 Hidrojellerin Şişme Oranı (%) - Zaman(dk) grafiği

Şişme testi grafiğinin incelenmesi sonucunda, her bir grup için zamana bağlı olarak artan şişme dereceleri tespit edilmiştir. % şişme-zaman grafiği (şekil 5.16) her bir malzemenin farklı bir artış oranına sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Örneğin, JelMA ve T-JelMA arasındaki oran dikkate alındığında, JelMA'nın başlangıçta %200 civarında bir şişme oranından %350'lere kadar yükseldiği, T-JelMA'nın ise yaklaşık %275'ten %580'lere çıktığı gözlemlenmiştir. Bu durum, JelMA'nın artış oranının yaklaşık %80 olduğunu, ancak T-JelMA'nın artış oranının %100'ün üzerinde olduğunu göstermektedir.

tECM-MA ve T-tECM-MA hidrojelleri arasındaki şişme artış oranı incelendiğinde, tECM-MA'nın başlangıçta daha düşük bir şişme oranına sahip olduğu, T-tECM-MA hidrojelinin ise birinci dakikada daha yüksek bir şişme oranıyla başladığı gözlenmektedir. Bununla birlikte, dikkate değer bir husus, T-tECM-MA hidrojelinin lineer bir artış

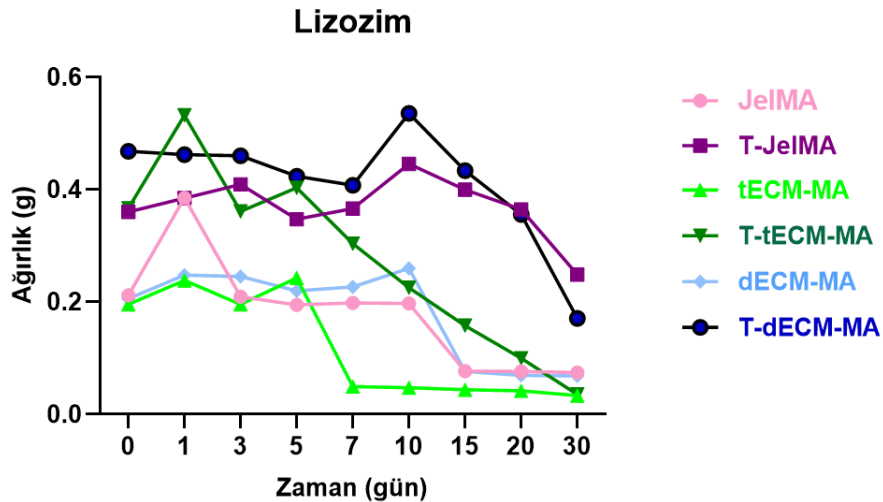
göstermemesidir. İlk ve üçüncü dakikalar arasındaki şişme oranı, üçüncü ve beşinci dakikalar arasındaki şişme oranına kıyasla daha düşüktür. Bu gözlem, başlangıçta şişme oranının yavaş bir şekilde arttığını, ancak daha sonra önceden toplanan suların varlığıyla birlikte şişme oranının arttığını göstermektedir.

dECM-MA ve T-dECM-MA hidrojelleri arasındaki şişme artış oranı incelendiğinde, başlangıç ve bitiş yüzdelerinin neredeyse aynı olduğu gözlemlenmektedir.

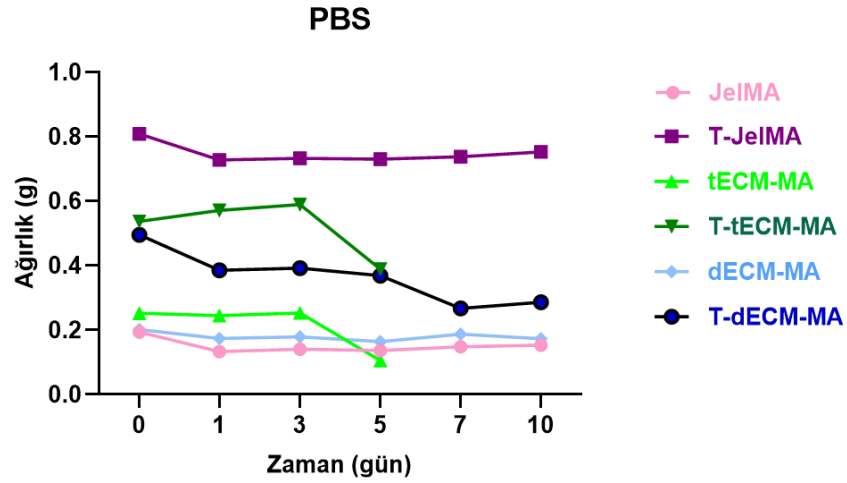
5.7 Biyobozunurluk Çalışmaları

Hidrojellerin bozunma özelliklerinin incelenmesi hücre yayılması, hücre göçü ve invazyon gibi biyolojik davranışları açısından önemli değişikliklere yol açtığı için oldukça önemlidir. Yüksek bozunma hızına sahip hidrojeller, yapının sağlamlığının zayıflaması anlamına gelmektedir.

Bu tez kapsamında elde edilen hidrojellerin lizozim ve PBS içerisinde ayrı ayrı bozunma analizleri gerçekleştirilmiştir ve zamana bağlı kütle kaybını gösteren grafik şekil 5.17 ve şekil 5.18’de sunulmuştur.



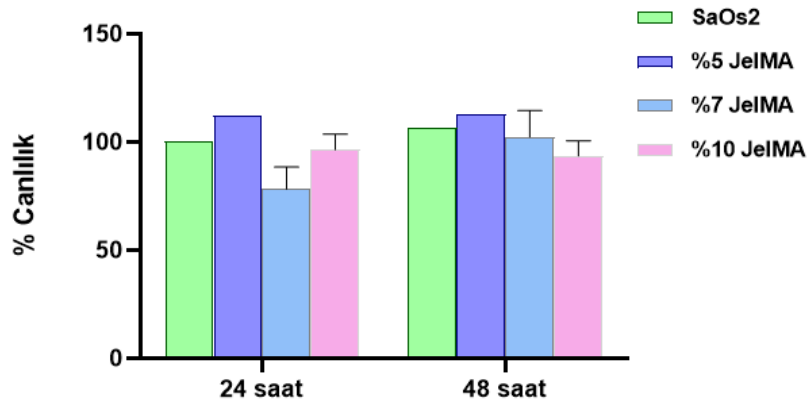
Şekil 5.16 Hidrojellerin Lizozim içerisinde biyobozunurluk çalışması Ağırlık (g)- Zaman (gün) grafiği



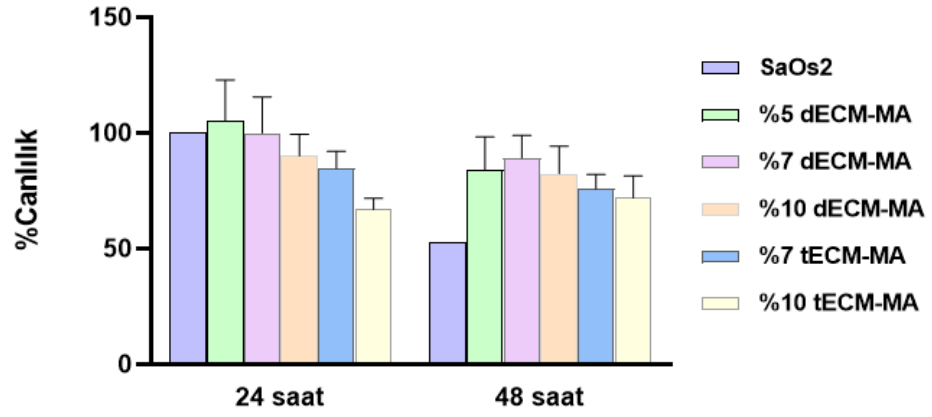
Şekil 5.17 Hidrojellerin PBS içerisinde biyobozunurluk çalışması Ağırlık (g)- Zaman (gün) grafiği

5.8 Sitotoksisite

Bu testte, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan hidrojellerin besiyerinde inkübe edilmesi ayn zamanda, 48 kuyucuklu plakalara eş zamanlı ekimi gerçekleştirilmiştir. 24 saat ve 48 saatlerde 565 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, malzemelerin sitotoksik etki yaratmadığı ve aralarında anlamlı bir fark olmadığı ($p < 0.05$) gözlenmiştir.



Şekil 5.18 %5, %7 ve %10 konsantrasyonlarda JelMA hidrojellerinin % canlılık grafiği (SaOS-2 hücreleri TCPS’de kontrol olarak kullanılmıştır.) (** $p < 0.05$)

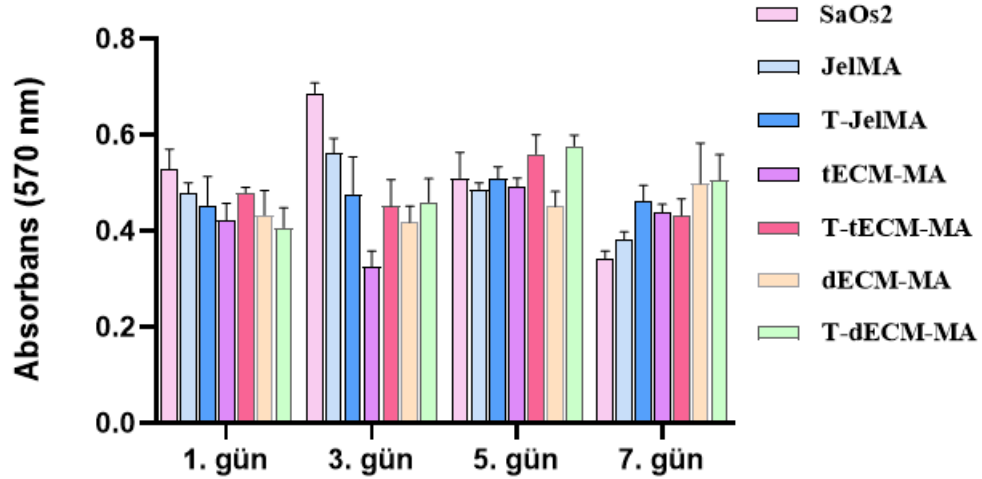


Şekil 5.19 %5, %7, %10 konsantrasyonlarda dECM-MA hidrojel ve %7, %10 konsantrasyonlarda tECM-MA hidrojellerinin % canlılık grafiği (SaOS-2 hücreleri TCPS’de kontrol olarak kullanılmıştır.) (** p<0.05)

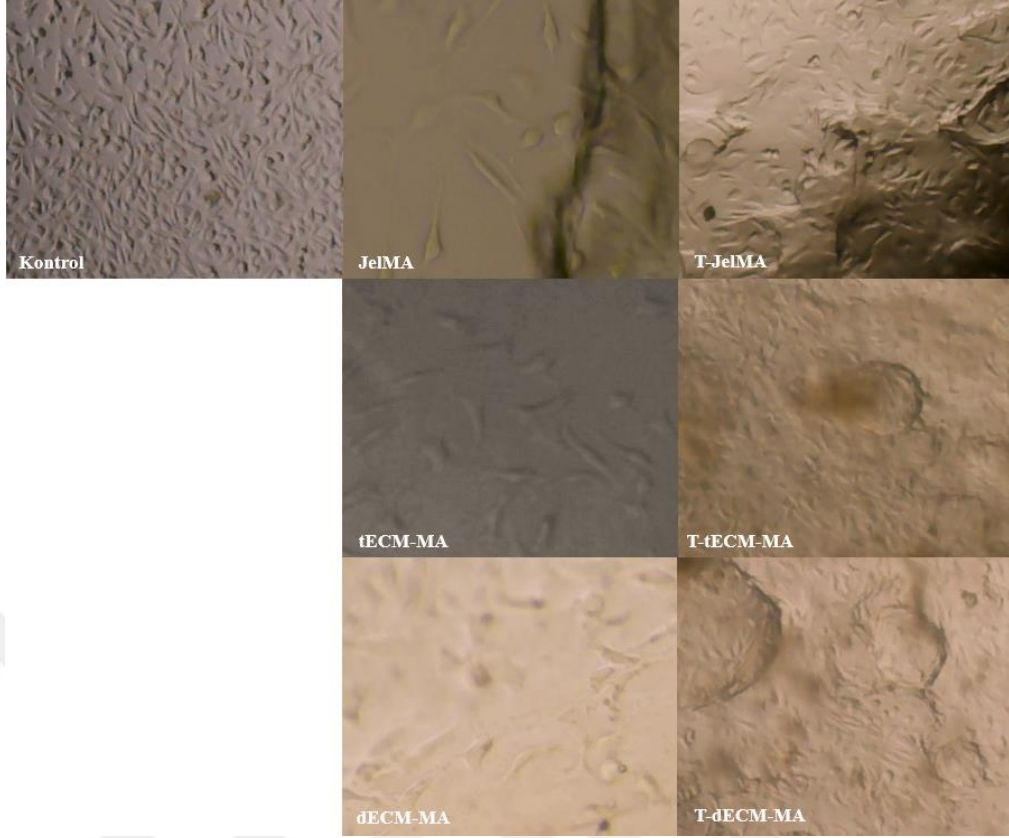
5.9 Hücre Kültürü Çalışmaları

5.9.1 Hücrelerin malzeme üzerindeki çoğalma davranışı

Bu tez çalışması çerçevesinde, pozitif kemik yüzey taklitli hidrojeller (T-JelMA, T-dECM-MA, T-tECM-MA) ve kemik yüzey taklidi olmayan hidrojeller (JelMA, dECM-MA, tECM-MA) kullanılarak hücrelerin malzeme üzerindeki çoğalma davranışı, 1., 3., 5. ve 7. günlerde n=3 örnek üzerinde MTT reaktifi ile değerlendirilmiştir.



Şekil 5.20 JelMA, T-JelMA, tECM-MA, T-tECM-MA, dECM-MA ve T-dECM-MA hidrojellerin üzerinde SaOs-2 hücrelerinin belirli zaman noktalarında (1.,3.,5. ve 7. gün) MTT reaktifi ile belirlenen hücre çoğalmasının absorbansa karşı grafiği



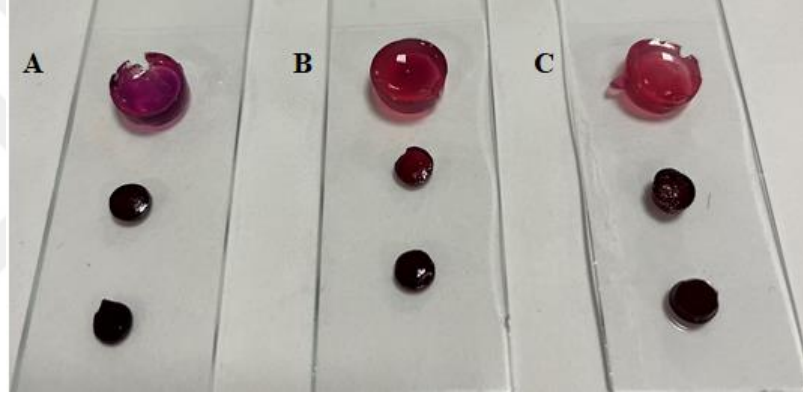
Şekil 5.21 Hidrojellerin kültür edildiği sürede çekilmiş mikroskop görüntüleri

Aynı zamanda hücrelerin malzeme yüzeyine yapışma davranışı mikroskop altında incelenmiştir (Şekil 5. 21). Grafiklerin incelenmesi sonucunda, T-JelMA hidrojelinin, JelMA hidrojeline kıyasla hücre çoğalmasının 5. güne kadar artış gösterdiği gözlenmiştir. JelMA hidrojeli ise 1. ve 3. günlerde artış göstermiş ancak 5. günde azalma gözlenmiş ve 7. günde hücre varlığı 1. güne kıyasla daha az olmuştur.

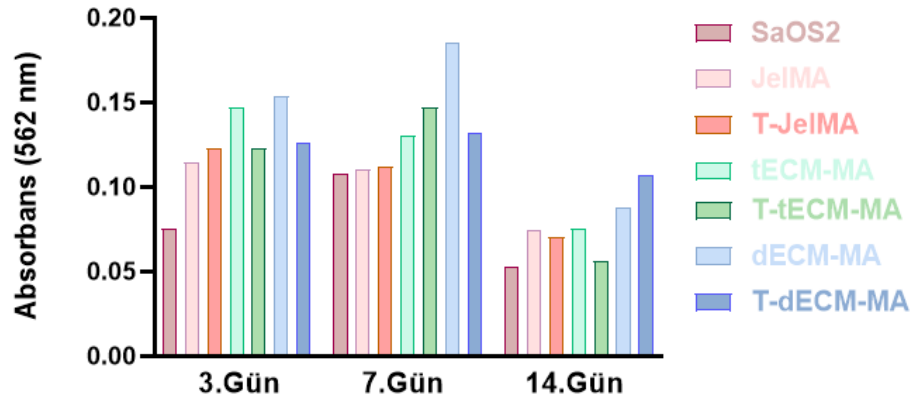
T-tECM-MA hidrojeli ile tECM-MA hidrojelleri arasında gün bazında yapılan karşılaştırmada benzer azalma ve artışlar gözlemlenmiştir. Ancak yüzey taklitli hidrojin hücre tutunması düz hidrojele kıyasla daha fazladır. Özellikle dikkat çeken nokta, 5. ve 7. günlerde kontrol grubu olan SaOs-2 grubuna kıyasla daha fazla artışın olduğudur.

5.9.2 Alizarin red boyaması

Alizarin Red boyaması, kemik yüzey taklitli hidrojel ve kemik yüzey taklidi olmayan hidrojel üzerinde n=3 örnekle çalışılarak gerçekleştirilmiştir. Hidrojel üzerine hücre ekimi yapıldıktan sonra 3., 7. ve 14. günlerde besi ortamı uzaklaştırılmış ve Alizarin Red özel boyası ile jeller boyanmıştır. Bu test, kalsiyum birikimini kantitatif olarak değerlendirmek için kullanılan bir analiz yöntemidir. Deney gruplarının boyama sonrasında absorbans değerlerinin ölçülmesiyle kalsiyum birikimi düzeyleri belirlenmiştir.



Şekil 5.22 (A) Hücre ekimi yapılmadan boyanmış JelMA hidrojel ve hücreli T-JelMA, (B) Hücre ekimi yapılmadan boyanmış dECM-MA hidrojel ve hücreli T-dECM-MA, (C) Hücre ekimi yapılmadan boyanmış tECM-MA hidrojel ve hücreli T-tECM-MA hidrojel görüntüleri

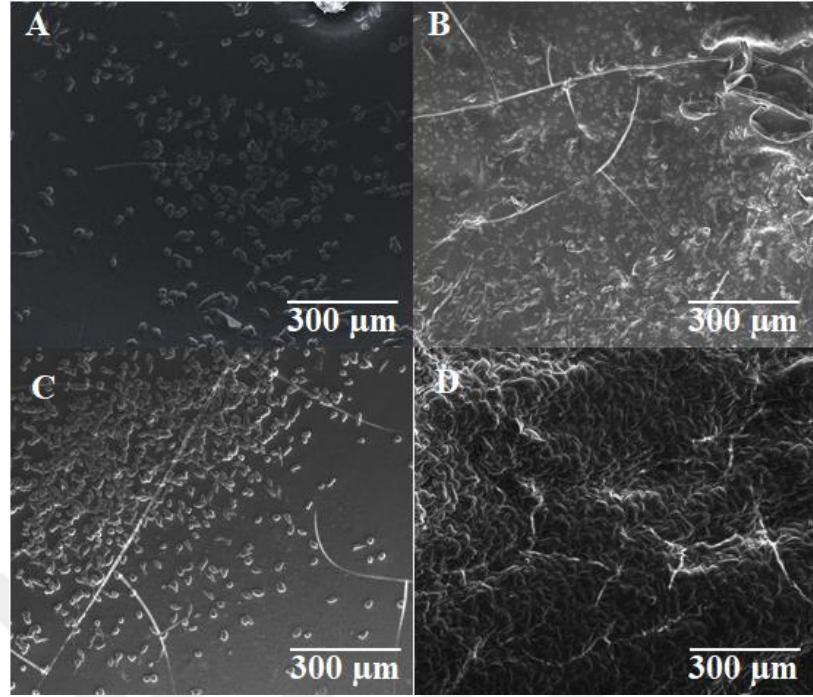


Şekil 5. 23 Hidrojellerin Alizarin red boyaması sonucunda belirli zaman noktalarında (3., 7. ve 14. Gün) kalsiyum birikiminin absorbans grafiği (** p<0.05)

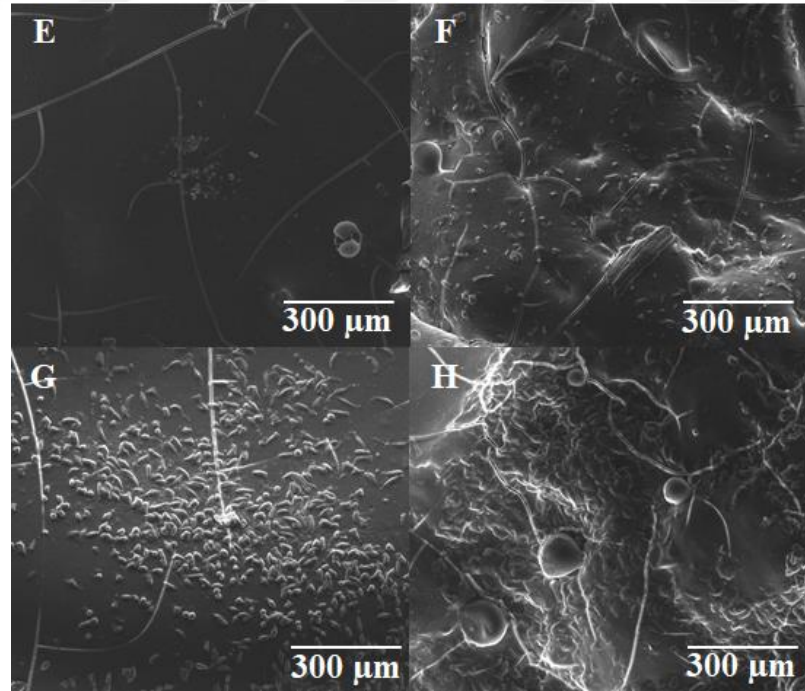
Kalsiyum birikimini ölçmek için yapılan bu yöntemde, kontrol grubuna karşı hep bir artış gözlenmektedir.

5.9.3 SEM görüntüleri

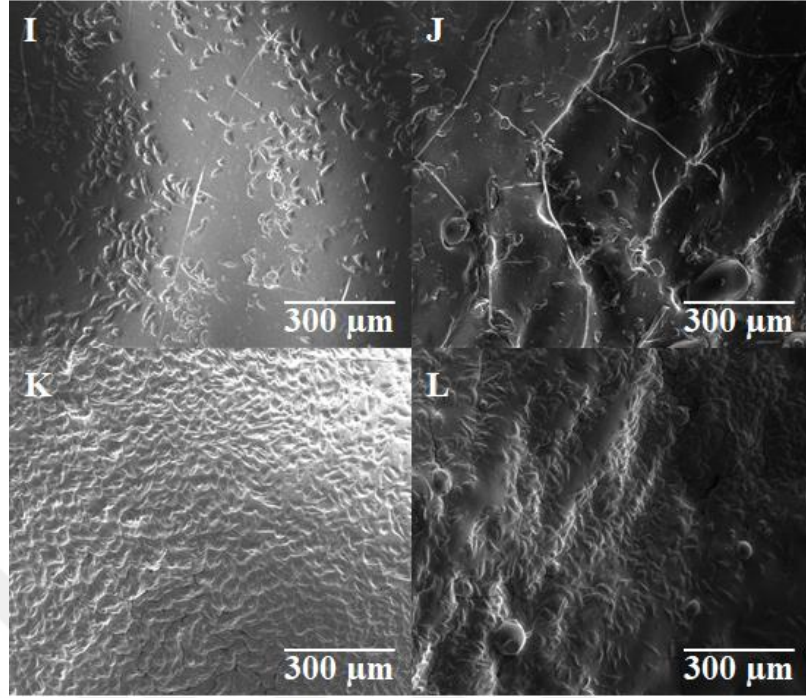
Tüm hidrojel örnekleri, n=3 tekrarlamayla gerçekleştirilen 10×10^4 hücre ekimi sonrasında 1. ve 3. günlerde hücre kültürü ortamından alınarak 2 kere PBS ile yıkandıktan sonra % 3 Gluteraldehit çözeltisinde 30 dk bekletilerek fikse edilmiştir. Daha sonra SEM görüntüleri alınmadan önce farklı konsantrasyonlarda EtOH banyosunda (%30, %50, % 70, % 90 ve %100) 2’şer dakika bekletilmiş ve hidrojeller, Hekzametildisilazan (HMDS) çözeltisine daldırılıp çıkarılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Örnekler (15 nM) altın-paladyum tabakasıyla kaplanarak elektron mikroskobu altında görüntülenmiştir.



Şekil 5.24 (A) JelMA 1. Gün, (B) T-JelMA 1. Gün, (C) JelMA 3. Gün, (D) T-JelMA 3. Gün SEM görüntüleri



Şekil 5.25 (E) tECM-MA 1. Gün, (F) T-tECM-MA 1. Gün, (G) tECM-MA 3. Gün, (H) T-tECM-MA 3. Gün SEM görüntüleri



Şekil 5.26 (I) dECM-MA 1. Gün, (J) T-dECM-MA 1. Gün, (K) dECM-MA 3. Gün, (L) T-dECM-MA 3. Gün SEM görüntüleri

5.9.4 Canlı- ölü hücre görüntüleri

Tüm hidrojel örnekleri, $n=3$ tekrarlamayla gerçekleştirilen 10×10^4 hücre ekimi sonrasında 1. ve 3. günlerde hücre kültürü ortamından alınmıştır. Örnekler, %4 paraformaldehit çözeltisi (300µl) ile 45 dakika boyunca oda sıcaklığında fiks edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra PBS ile yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra örnekler boyama işlemi için hazır hale getirilmiştir. Hidrojel örneklerinin hücre-malzeme etkileşimini değerlendirmek amacıyla Akridin Orange Propidyum iyodid boyaması gerçekleştirilmiştir. Ancak, jellerin kendisi de boyandığı için sağlıklı görüntüler elde edilememiştir. Bu nedenle, daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen JelMA ve tECM-MA hidrojel malzemelerinin hücre etkileşimini göstermek amacıyla farklı bir deneyde insan dermal fibroblast hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen Kalsein temelli canlı hücre boyama sonuçları Ek 1’de sunulmuştur.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışması, kemik doku mühendisliği yaklaşımıyla, metakrilatlanmış doğal polimerlerin yumuşak litografi tekniği kullanılarak elde edilen kemik yüzey topografyasının hidrojel matrisine aktarılması ve bu kemik yüzey taklitli hidrojin osteoblast hücreleri üzerindeki etkisinin incelenmesini amaçlamaktadır.

Tez çalışması kapsamında, öncelikle sığır dana ECM'si ve sığır tendon ECM'si, hücresizleştirme işlemiyle kimyasal yolla hücresizleştirilmiştir. Bu işlem, ECM bileşiminin yapısına zarar vermeden, biyolojik aktivitesini ve mekanik bütünlüğünü koruyarak DNA'nın uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır. Elde edilen sığır deri ECM'si, sığır tendon ECM'si ve ticari jelatin için literatür araştırması yapılmış ve metakrilatlama protokolüne tabi tutulmuştur. Literatürden elde edilen karbonat-bikarbonat tamponu protokolü, jelatin için kullanılmıştır. Ancak ECM'ler için optimizasyon gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, ECM'ler için metakrilik anhidrit miktarı iki kat artırılarak optimizasyon sağlanmıştır. Bu yöntemle doğal polimerler metakrilatlanmıştır. Metakrilatlanan ECM'ler ve jelatin, toz haline getirilmiş ve çapraz bağlama protokolüne tabi tutularak fotoçapraz bağlanabilir çözeltiler elde edilmiştir.

Hidrojellerin yumuşak litografi yöntemiyle negatif yüzey taklitli bir kalıba dökülerek fotoçapraz bağlanmalarından sonra soyularak çıkarılacak olması, konsantrasyonun önemli bir parametre olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle, soyarak çıkarma işlemi ve yüzey taklit derecesinin artması için yüksek konsantrasyonda çalışma tercih edilmiştir. Ancak bu amaçla, ön çalışma olarak sitotoksisite testi gerçekleştirilmiştir. %5-%7 ve %10 konsantrasyonlarda hidrojeller hazırlanmış ve 24 saat ve 48 saat boyunca malzemeli besiyeri inkübe edilerek sitotoksisite testi yapılmıştır. Sonuçlara göre, JelMA, dECM-MA ve tECM-MA hidrojellerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak herhangi bir toksisite durumu gözlenmemiştir. Bu çalışmanın sonucunda, hidrojeller için çalışılacak uygun konsantrasyon belirlenerek %10 konsantrasyonda hidrojellerle çalışılacağı belirlenmiştir.

Kemik yüzeyinin hidrojele aktarılması için negatif bir kemik yüzey taklitli kalıp gerekmektedir. Literatür taraması, bu amaçla PDMS polimerinin yumuşak litografi yöntemiyle sıkça kullanıldığını göstermiştir. Bu bağlamda, kemiğin negatif yüzey taklidi PDMS polimerine yumuşak litografi yöntemiyle aktarılacak ve elde edilen negatif kemik yüzey taklitli PDMS kalıp kullanılarak metakrilatlanmış doğal polimerlerin fotobaşlatıcı içeren çözeltileri UV ile çapraz bağlanacaktır. Ardından, yumuşak litografi yöntemiyle PDMS kalıptan soyularak pozitif kemik yüzeyi, metakrilatlanmış polimerlerin yüzeyine aktarılmış olacaktır. Ancak çalışmamızda, PDMS polimerinin hidrofobik etkisi nedeniyle metakrilatlanmış ve foto başlatıcı içeren doğal polimer çözeltilerinin istenilen şekilde kalıplanamadığı ve hidrofobik-hidrofilik etkileşimlerden kaynaklanan istenmeyen sonuçlarla çapraz bağlanamadığı gözlenmiştir. Bu sorunu çözmek için alternatif yöntemlere başvurulmuştur. Çalışmada, agar-agar jelinin termal jelleşme özelliğinden faydalanılarak kalıp olarak kullanılması öngörülmüştür. Agar-agar jel, ısıtıldığında sıvı hale geçen ve soğudukça tekrar jelleşen bir özelliğe sahiptir. Agar-agar jelinin sıvı hale getirilip istenilen şekilde dökülmesi ve ardından zenogreft temizleme yöntemi ile temizlenmiş kemik dokunun daldırılmasıyla ve ardından soğutulmasıyla birlikte jelleşmesiyle negatif kemik yüzey taklitli bir kalıp elde edilmiştir. Bu kalıp, daha sonra metakrilatlanmış polimer çözeltileri ile doldurularak çapraz bağlanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Yumuşak litografi yöntemiyle hidrojel soyularak kalıptan çıkarılmıştır. Pozitif kemik yüzey taklitli hidrojeller elde edilmiştir.

JelMA, dECM-MA ve tECM-MA hidrojellerin kimyasal karakterizasyon çalışmalarına bakıldığında, FTIR analizi sonuçlarına göre, ddECM, dtECM-MA ve jelatinin çıkış maddesi olarak kullanıldığı başlangıç materyallerinin spektrumları ile metakrilatlama reaksiyonu sonucunda elde edilen dECM-MA, tECM-MA ve JelMA tozlarının spektrumları arasında belirgin bir benzerlik gözlenmiştir. Bu benzerlik, metakrilatlama reaksiyonu sonucunda doğal polimerlerin yapısının istenen ürünün elde edilmesiyle bozulmadan korunduğunu göstermektedir. Ayrıca, çıkış maddesi ve son ürün arasında literatüre uygun pik değerlerinin görülmesi de yapısal bütünlüğün korunduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, doğal polimerlerin metakrilatlama reaksiyonu ile istenen ürünün elde edildiğinin güçlü bir kanıtıdır.

Rejeneratif tıp alanında, hücreleştirilmiş ekstrasellüler matris tabanlı biyomalzemelerin geliştirilmesi ve uygulanması oldukça önemlidir. Bu tür biyomalzemeler, hücrelerin etkileşime girebileceği üç boyutlu bir yapıya sahiptir ve hücreler için optimal bir mikroçevre sunar. Hücrelerin bu materyallere yapışması ve büyümesi için uygun bir yüzey sağlanır. Ekstrasellüler matris içerisinde bulunan biyoaktif bileşenlerin, hücre yaşamını, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklediği bilimsel olarak kanıtlanmıştır (Jiang vd. 2023). Bu bağlamda, hücreleştirilmiş ekstrasellüler matris tabanlı biyomalzemeler, doku rejenerasyonu ve hücre tabanlı tedavi yöntemlerinde umut verici bir potansiyele sahiptir. Bu tez çalışması kapsamında, hücreleştirilmiş sığır tendon ve deri temelli biyomalzemelerin doku onarımını destekleyebileceği ve bu etkinin malzemenin yüzey topografyasıyla birleştirilerek daha da artırılabilirliği hipotezi üzerine odaklanılmıştır. Yapılan hücre çalışmalarıyla bu hipotez kanıtlanmıştır. Hücre çalışmaları, hücreleştirilmiş biyomalzemelerin doku hücreleriyle etkileşime girdiğinde hücre büyümesini, yayılmasını ve doku farklılaşmasını desteklediğini göstermiştir. Malzeme yüzeyinin topografik özellikleri, hücrelerin uygun bir mikroçevrede yerleşmesine ve doku onarımına katkıda bulunmasına yardımcı olmuştur.

Profilometre analizi, kemik yüzey taklitli hidrojel ile düz hidrojel arasında karşılaştırma yapmak için kullanılmıştır. Bu analizde, kemik yüzeyinin topografyasının hidrojele başarılı bir şekilde aktarılabilirliği gösterilmiştir. Karşılaştırma sonuçlarına göre, kemik yüzey taklitli hidrojellerin düz hidrojellere göre belirgin bir topografik benzerlik sergilediği tespit edilmiştir. Bu bulgular, hidrojellerin kemik yüzeyinin doğal topografisini başarılı bir şekilde taklit edebildiğini ve bu yöntemin kemik rejenerasyonu uygulamalarında kullanılabilirliğini desteklemektedir.

Temas açısı analizinde ölçülen açı değerlerinin 90°'den daha küçük olması, hidrojellerin hidrofilik karakterde olduğuna işaret etmektedir. Sonuçlar daha ayrıntılı incelendiğinde, kemik yüzey taklidi yapılan ve yapılmayan hidrojellerin temas açılarının karşılaştırılması sonucunda, kemik yüzey taklidi yapılan hidrojellerin (JelMA hariç) daha düşük açı değerlerine sahip olduğu gözlenmektedir. Bu durum, kemik yüzey taklidi yapılan hidrojellerin yüzey morfolojisinin düzensiz ve pürüzlü olmasından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla, elde edilen bulgular, kemik yüzey taklidi yapılan hidrojellerin su emme

kapasitelerinin, taklit edilmeyen hidrojelere göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ve hidrojellerin hidrofilik karakterde olduğunun bir kanıtıdır. Temas açısı ölçümü malzemenin sadece hidrofilik hidrofobik karakterini belirlemek için yapılan bir yöntem değildir. Yüzey modifikasyonunu incelemek adına da gerçekleştirilen bir yöntemdir. Bu çalışmada da görüldüğü gibi yüzey topografyasının değişmesiyle temas açısı ölçümleri değişmektedir (Schneider vd. 2016). Yüzey pürüzlüğü arttıkça malzemenin suyu emdiği literatür destekli olarak gözlenmiştir.

Hidrojellerin mekanik basma analizlerinde, kuru ve ıslak olarak iki farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Kuru grafiğe bakıldığında %50 gerinimde T-JelMA'nın JelMA'ya oranla 2 kat daha fazla dayanıklı olduğu fakat gerinim arttıkça JelMA'nın dayanıklılığının arttığı gözlenmiştir. Deri için ise %50 gerinime ulaşmadan T-dECM-MA'nın parçalandığı gözlenmiştir. tECM-MA ve T-tECM-MA için ise birbirine çok yakın değerler gösterdiği gözlenmiştir. Genel olarak tüm gruplara bakıldığında ise maksimum gerinime dayanabilen hidrojel ise T-tECM-MA hidrojelidir. İkinci grup olarak yapılan suda bekletilerek ölçüm alınan ve gerilime karşı gerinim grafiği çizilen bu grup hidrojeller kıyaslandığında, %50 gerinimde dECM-MA'nın TdECM-MA hidrojeline kıyasla daha dayanıklı olduğu fakat taklit hidrojelin yüksek gerinime çıkıldığında daha dayanıklı olduğu görülmektedir. Yine %50 gerinimde JelMA'nın T-JelMA'ya kıyasla 4 kat daha dayanıklı olduğu sonucu gözlenmiştir. tECM-MA ve T-tECM-MA hidrojellerine bakıldığında ise %50 gerinimde iki malzemenin aynı sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Kuru ve ıslak olarak farklı gruplarda ölçüm alınıp ıslak grubun kuru gruba kıyasla daha dayanıklı olmasının nedenini tartışacak olursak, suda bekleyen malzemelerin su ile hidrojen bağı gerçekleştirerek yapısının suda beklemeyen hidrojelere göre daha dayanıklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Mikroskop görüntüleri incelendiğinde, hidrojellerin kemik yüzey taklitli ve taklitsiz olarak değerlendirildiği ve gözle görülür bir taklit etkisinin meydana geldiği gözlenmektedir.

Şişme testi analizi, hidrojellerin su tutma yeteneklerini değerlendirmek için kullanılmış ve bu analiz sonuçları hidrojellerin su tutma kapasitesinin kanıtı olarak

sunulabilmektedir. Her bir grup içindeki kıyaslamalar sonucunda, 1. ve 3. dakika aralığında hidrojellerin şişme oranının %100'ün üzerinde olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, 3. ve 5. dakika aralığındaki zaman diliminde hidrojellerin şişme oranının %100'den daha fazla artış gösterdiği tespit edilmiştir. Kemik yüzey taklitli hidrojellerin şişme oranlarına bakıldığında, taklit edilmeyen hidrojellere kıyasla daha fazla suyu tuttukları sonucuna varılmıştır. Bu bulgular, kemik yüzey taklitli hidrojellerin yüzey topografyasının oluşturulmasıyla birlikte su tutma kapasitelerinin arttığını göstermektedir.

Biyobozunurluk testi sonuçlarına bakıldığında, lizozim çözeltisinde bekleyen hidrojellere bakıldığında JelMA ve T-JelMA 3. ve 5. günlerde benzer azalma göstermektedir. Düz JelMA bozunmayı 15. günde tamamlamaya yakınken T-JelMA 30. güne kadar bozunmadan kalmıştır. T-JelMA hariç tüm jellerde düz hidrojellere kıyasla taklit hidrojellerin bozunması daha yavaş ve dengeli gittiği görülmüştür. PBS içerisinde malzemeler lizozime kıyasla daha çabuk bozunmuştur. tECM-MA ve T-tECM-MA hidrojelleri 5. günde tamamen bozunmuş diğer jeller ise 10. güne kadar yavaş yavaş azalarak bozunmaları gerçekleşmiştir.

Kalsiyum miktarını ölçmek için gerçekleştirilen alizarin red boyaması sonuçlarında, kontrol gruba kıyasla 3., 7. ve 14. günlerde alınan ölçümlere bakıldığında artış gözlenmektedir. T-tECM-MA, dECM-MA ve T-dECM-MA hidrojelleri 7. günde 3. güne göre artış göstermektedir. Bu sonuçlara bakıldığında 7. güne kadar absorbands değerlerinde bir artış görülmektedir ve bu mineralizasyonun gerçekleştiğinin bir göstergesidir. 14. güne bakıldığında kontrol grubuna kıyasla bir artış vardır ancak 7. güne kıyasla 14. gün örneklerinde absorbands değerleri düşmektedir ancak anlamlı bir fark bulunmadığı için bu sonuç hücrelerin bağıl bolluğa ulaşip apoptoza yöneldiğinden kaynaklanabileceği çıkarılabilir.

Hidrojellerin morfolojik özelliklerini incelemek amacıyla SEM analizi gerçekleştirildi. Literatürde matrisin mekanik özelliklerinin ayarlanmasıyla değişen gözenek boyutunun, hücre yapışmasındaki önemine dair çeşitli çalışmalar mevcuttur (Ji vd. 2011, Anguiano vd., 2017). SEM bulguları, kemik yüzey taklitli hidrojellerde hücre yapışması gibi hücre davranışlarının incelendiği durumlarda, taklit hidrojellerin daha uygun olduğunu

göstermektedir. Malzemelerin üzerine hücre ekiminden sonra 1. ve 3. Günlerde alınan SEM görüntülerinde ise mikrodeseanlı yüzeylerde çukurlar ve oluklar gibi şekil faktörlerinin hücre morfolojisini kontrol edebildiğini ve bu bağlamda hücre çoğalma hızı, hareketlilik, farklılaşma ve ekstraselüler matris üretimi üzerinde etkileri olduğunu ortaya koymaktadır. Kemik yüzey taklit hidrojellerin 1. gün görüntülerinde hücre yapışmasının gerçekleştiği 3. Günde ise kemikn yüzey taklitli hidrojellerin düz hidrojellere göre hücre ektileşiminde ve çoğalmasında ciddi bir artış gözlenmiştir. Bu bulgular, yüzey topografyası bulunan hidrojellerin hücre yapışmasını daha etkili bir şekilde desteklediğini göstermektedir. Bu çalışmalar, doğal biyolojik sistemlerin yapı ve fonksiyonlarını taklit ederek, hücre davranışı ve dokusal yanıtları kontrol etme potansiyelini vurgulamaktadır. Hücreli malzemelerin SEM görüntülerinin, biyomimetik yaklaşımlarda daha etkili ve sağlıklı doku rejenerasyonu ve tedavisi için umut verici bir yol olduğu literatür çalışmalarıyla da desteklenmiştir (Puza vd., 2023).

Hücrelerin malzeme üzerindeki çoğalma davranışları, 1., 3., 5. ve 7. günlerde incelenmiştir. Hücrelerin malzeme üzerindeki yapışma davranışı, ekim sonrasında mikroskop altında gözlemlenmiş ve hücrelerin doku iskelesi üzerinde tutunduğu tespit edilmiştir. Tez çalışması sonuçlarına dayanarak, 5. güne kadar tECM-MA hariç diğer tüm örneklerde çoğalma olduğu gözlenmiş, 7. günde ise tüm gruplarda bir azalma eğilimi gerçekleşmiştir. Bu azalma davranışının malzemelerin boyutlarının küçük olmasından ve hücrelerin bağıl bolluğa ulaşp apoptoza yöneldiğinden kaynaklı olabileceği söylenebilir. Bu bulgular, kemik doku mühendisliği alanında kullanılabilecek taklit hidrojellerin kemik rejenerasyonunda umut vadettiğini göstermektedir. Ayrıca, bu hidrojellerin şekil ve boyut açısından kalıplanabilir olması, kemik defektlerinin gereksinimlerine uygun olarak üretilebileceği avantajını sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

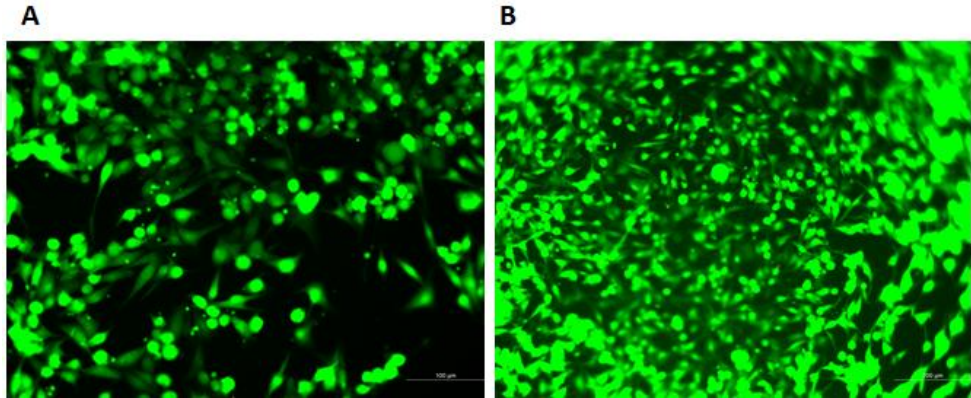
- Ambrosio, A.M.A., Sahota, J.S., Khan, Y. & Laurencin, C.T. (2001). A novel amorphous calcium phosphate polymer ceramic for bone repair: I. Synthesis and characterization. *J. Biomed. Mater. Res.*, 58: 295-301
- Anguiano, M., Castilla, C., Maška, M., Ederra, C., Peláez, R., Morales, X., MuñozArrieta, G., Mujika, M., Kozubek, M., Muñoz-Barrutia, A., Rouzaut, A., Arana, S., Garcia-Aznar, J. M., Ortiz-de-Solorzano, C. 2017. Characterization of threedimensional cancer cell migration in mixed collagen-Matrigel scaffolds using microfluidics and image analysis. *PLoS One*, 12(2).
- Barth, H.D., Zimmermann, E.A., Schaible, E., Tang, S.Y., Alliston, T. & Ritchie, R.O. (2011). Characterization of the effects of x-ray irradiation on the hierarchical structure and mechanical properties of human cortical bone. *Biomaterials*; 32(34):8892-904
- Boyan, B. D., T. W. Hummert, D. D. Dean, and Z. Schwartz, "Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response," *Biomaterials*, Vol. 17, no. 2, pp. 137–146, 1996
- Clarke, B. 2008. Normal Bone Anatomy and Physiology, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3; (Suppl 3) S131-S139.
- Downey, P. A., Siegel M. I. 2006. Bone Biology and the Clinical, *Journal of Physical Therapy*, 86; S 77–91.
- Erenay, B. 2019. The Effect of Bone Surface Mimicked Magnetic Particle Embedded PDMS membrans on Human Osteoblast Cell Behavior, Submitted to the Institute of Biomedical Engineering in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Biomedical Engineering.
- Gautam, S., Sharma, C., Purohit, D.S., Singh, H., Dinda, K.A., Potdar, D.P., Chou, C., Mishra, M.C. 2021. Gelatin-Polycaprolactone-Nanohydroxyapatite Electrospun Nanocomposite Scaffold for Bone Tissue Engineering, *Materials Science & Engineering C*, 119.
- Jaiswal M.K., Xavier R.J., Carrow K.J., Desai P., Alge D., and Gaharwar K.A. (2015). "Mechanically Stiff Nanocomposite Hydrogels at Ultralow Nanoparticle Content" *ACS Paragon Plus Environment*.
- Ji, C., Khademhosseini, A., Dehghani, F. 2011. Enhancing cell penetration and proliferation in chitosan hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 32(36); 9719-9729
- Jiang, S., Zhuang, Y., Cai, M., Wang, X., Lin, K., "Decellularized extracellular matrix: A promising strategy for skin repair and regeneration" *Engineered Regeneration*. Volume 4, Issue 4, 357-374. 2023.
- Kolind ,K., Leong, W. K., Besenbacher, F., Foss, M. 2012. Guidance of stem cell fate on 2D patterned surfaces, *Biomaterials*, volume 33,issue 28, (6626-6633).
- Langer, R., Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* (New York, N.Y.). 1993, 260(5110), 920–926

- Laurencin, C.T., Ambrosio, A.M., Borden, M.D. & Cooper, J.A. Jr. (1999). Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng.*; 1:19-46
- Lee, D., Heo, D. N., Nah, H. R., Lee, S. J., Ko, W. K., Lee, J. S., Moon, H. J., Bang, J. B., Hwang, Y. S., Reis, R. L., Kwon, I. K. 2018. Injectable hydrogel composite containing modified gold nanoparticles: implication in bone tissue regeneration. *International journal of nanomedicine*, 13; 7019–7031.
- Lu, Z., S. I. Roohani-Esfahani, G. Wang, and H. Zreiqat, “Bone biomimetic microenvironment induces osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells,” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, Vol. 8, no. 4, pp. 507–515, 2012
- Ma, H., Feng, C., Chang, J. & Wu, C. (2018). 3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy. *Acta Biomater.*; 79:37-59
- Mahinroosta, M., Farsangi, Z. J., Allahverdi, A. and Shakoori, Z. 2018. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications, *Materials Today Chemistry*, 8; 42-55.
- Porter, J. R., T. T. Ruckh, and K. C. Popat, “Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies,” *Biotechnology Progress*, Vol. 25, no. 6, pp. 1539–1560, 2009.
- Puza, F., Rostami, S., Aslan, Ö. B., Odabas, S., Jandt, D. K. and Garipcan, B. “Anisotropic Bone Surface Topography Mimicked Chitosan/Graphene Oxide Membranes “ *Advanced Engineering Materials*, 25, 2200777 (1 of 10). 2023.
- Schneider, L., M. Laustsen, N. Mandsberg, and R. Taboryski, “The Influence of Structure Heights and Opening Angles of Micro-and Nanocones on the Macroscopic Surface Wetting Properties,” *Scientific Reports*, Vol. 6, no. September 2015, pp. 1–9, 2016.
- Shi, X., T. Fujie, A. Saito, S. Takeoka, Y. Hou, Y. Shu, M. Chen, H. Wu, and A. Khademhosseini, “Periosteum-mimetic structures made from freestanding microgrooved nanosheets,” *Advanced Materials*, Vol. 26, no. 20, pp. 3290–3296, 2014
- Shirahama, H., Lee, B.H., Tan, L, P., Cho, N,J. 2016. Precise Tuning of Facile One-Pot Gelatin Methacryloyl (GelMA) Synthesis, *Scientific Reports*,6;31036.
- Stevens, M. M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*, Volume 11, Issue 5, Pages 18-25, ISSN 1369-7021
- Whitesides, G. M., E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, and D. E. Ingber, “Soft lithography in biology and biochemistry.,” *Annual review of biomedical engineering*, Vol. 3, pp. 335–73, 2001.
- Xia, Y., and G. M. Whitesides, “Soft Lithography,” *Annual Review of Materials Science*, Vol. 28, no. 1, pp. 153–184, 1998
- Yu, X., Tang, X., Gohil, S.V. & Laurencin, C.T. Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Adv Healthc Mater.* 4(9):1268-85. 2015.

EK 1

Canlı-Ölü hücre görüntüleri

JelMA ve tECM-MA hidrojelleri dermal fibroblast hücreleriyle 1 gün boyunca kültür edildikten sonra, Kalsein-AM kullanılarak gerçekleştirilen boyama yöntemiyle hücrelerin morfolojisi incelenmiştir. Kalsein-AM, asetoksimetil ester grubunu içeren floresan olmayan bir bileşiktir ve canlı hücrelerde esterase enzimleri tarafından hidrolize uğrar. Bu hidroliz süreci sonucunda asetoksimetil ester grubu uzaklaştırılır ve kalsein adı verilen yeşil floresan bir bileşik oluşur. Bu floresan özelliği, canlı hücrelerin tespiti için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Mikroskop altında yapılan incelemede, canlı hücrelerin yeşil floresan gösterdiği gözlemlenmiştir.



(A) JelMA, (B) tECM-MA hidrojeli Kalsein-AM boyaması mikroskop görüntüleri