

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KARACİĞER DOKUSU TEMELLİ HİDROJEL BİYOMALZEME
GELİŞTİRİLMESİ**

Can ERGÜN

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2021**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARACİĞER DOKUSU TEMELLİ HİDROJEL BİYOMALZEME GELİŞTİRİLMESİ

Can ERGÜN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yaşar Murat ELÇİN

Bu tez çalışmasında, sığır karaciğer hücre dışı matriksi (HDM), optimize edilen protokoller ile karaciğer doku mühendisliği uygulamalarında hepatik hidrojel ve üç boyutlu (3B) iskele olarak kullanılmak üzere hücrelerinden arındırıldı. Bu amaçla, çalışmanın ilk aşamasında karaciğer dokuları Triton X-100, perasetik asit (PAA), amonyum hidroksit (NH₄OH) veya sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanımını içeren farklı protokoller ile deselülerize edildi. Protokollerin etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla histokimyasal boyamalar ve DNA içeriği analizleri gerçekleştirildi. Ayrıca, deselülerize karaciğer HDM'leri, morfolojik özellikleri ve total protein, kollajen ve sülfatlanmış glikozaminoglikan (sGAG) gibi biyoaktif içerikleri bakımından karakterize edildi. Ardından, enzimatik sindirim ve fiziksel çapraz bağlama uygulamaları ile deselülerize hepatik HDM temelli hidrojel geliştirildi. Deselülerize HDM hidrojellerin türbidimetrik karakterizasyonu sonrasında kalıplama ve dondurup-kurutma tekniği ile 3B hepatik iskeleler üretildi ve karakterize edildi. 3B hepatik iskelelerin karakterizasyonları kapsamında, morfolojik (SEM), termal (TGA), mekanik (basma testi), kimyasal (FTIR), fiziksel (su tutma ve bozunma) ve biyolojik (*in vitro* sitotoksitesite) özellikleri incelendi. Sonuçlar, sığır karaciğer HDM'sinin doğal biyoaktif içeriğinin korunarak farklı konsantrasyonlarda SDS kullanımı ile etkin olarak hücrelerinden arındırılabilirdiğini gösterdi. Bulgular aynı zamanda, deselülerize karaciğer HDM'den, optimal biyomalzeme özelliklerine sahip biyoaktif hidrojel ve 3B doku iskelelerinin geliştirilebildiğini gösterdi. Bu tez çalışmasının bulguları, hücreleştirilmiş sığır karaciğer dokularının, karaciğer doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında biyoaktif hidrojel ve iskele malzemesi olarak kullanılabileceği görüşünü desteklemektedir.

Ocak 2021, 120 sayfa

Anahtar Kelimeler: biyomalzeme, doku mühendisliği, yenileyici tıp, deselülerizasyon, karaciğer, hidrojel

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT OF HYDROGEL BIOMATERIALS DERIVED FROM LIVER TISSUE

Can ERGÜN

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

Supervisor: Prof. Dr. Yaşar Murat ELÇİN

In this study, bovine liver extracellular matrix (ECM) was decellularized using an optimized protocol for use as a hepatic hydrogel and three-dimensional (3D) scaffold in liver tissue engineering applications. To reach this aim, in the first part of this study, liver tissues were decellularized with different protocols including Triton X-100, peracetic acid (PAA), ammonium hydroxide (NH₄OH) or sodium dodecyl sulfate (SDS) treatments. Histochemical staining and DNA content analysis were performed to evaluate the efficiency of protocols. Also, decellularized liver ECMs were characterized for their morphological properties and bioactive contents such as total protein, collagen and sulfated glycosaminoglycans (sGAG). Then, decellularized hepatic ECM based hydrogel was produced by enzymatic digestion and physical crosslinking approaches. Following the turbidimetric characterization of decellularized ECM hydrogels, 3D hepatic scaffolds were fabricated by molding and freeze-drying technique and then characterized. Morphological (SEM), thermal (TGA), mechanical (compression test), chemical (FTIR), physical (swelling and degradation) and biological (*in vitro* cytotoxicity) properties of the 3D hepatic scaffolds were examined within the scope of characterizations. Results showed that, bovine liver ECM could be effectively decellularized by using different concentrations of SDS by maintaining substantially natural bioactive components. Furthermore, findings showed that bioactive hydrogel and 3D tissue scaffolds with optimal biomaterial properties can be fabricated from this decellularized liver ECM. Finding of this thesis study support the notion that, decellularized bovine liver tissues can be used as a bioactive hydrogel and a scaffold material in hepatic tissue engineering and regenerative medicine applications.

January 2021, 120 pages

Key Words: biomaterials, tissue engineering, regenerative medicine, decellularization, liver, hydrogel

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans serüvenime başladığım günden itibaren engin bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, bu tez çalışması kapsamındaki araştırmalarımın destek veren, bana rehberlik eden ve yolumu aydınlatan danışman hocam sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı),

Çalışmalarım süresince histokimyasal ve biyolojik analizlerin yanı sıra verdiği değerli bilgiler ve fikirlerle bana destek olan hocam sayın Prof. Dr. Ayşe Eser ELÇİN'e (Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü),

Tüm tez çalışmam boyunca yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Dr. Mahmut PARMAKSIZ'a (Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü), araştırmalarım süresince çalışmalarımın her fırsatta destek olan Y. Kim. Murat Taner VURAT'a ve tüm bu süreçte desteklerini eksik etmeyen tüm laboratuvar üyelerine,

Beni her konuda destekleyen, aldığım her kararda, attığım her adımda düşünmeden, sorgulamadan, yargılamadan yanımda olan ve daima yanımda olacaklarını bildiğim, hayallerimin peşindeyken her duygusal ve rasyonel adımda arkamda duran, maddi ve manevi sağladıkları destek, yaptıkları her türlü fedakarlıklardan dolayı canım AİLEME...

Teşekkürlerimi sunarım.

Can ERGÜN
Ankara, Ocak 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 Tarih ve Etimoloji	5
2.2 Karaciğer Anatomisi.....	6
2.2.1 Hepatik damar ağı	7
2.2.2 Arteriyel damar ağı.....	7
2.3 Karaciğerin Histolojisi.....	9
2.3.1 Karaciğer lobülleri.....	9
2.4 Karaciğer Hücreleri.....	14
2.4.1 Hepatositler.....	14
2.4.2 Endotel hücreleri.....	16
2.4.3 Kupffer hücreleri	17
2.4.4 Ito hücreleri	17
2.4.5 Pit hücreleri	18
2.4.6 Safra epitel hücreleri	18
2.4.7 Hücre iskeleti.....	19
2.5 Karaciğer Hücre Dışı Matriksi	20
2.6 Doku Mühendisliği.....	23
2.6.1 Karaciğer doku mühendisliği.....	26
2.6.2 Karaciğer doku mühendisliğinde biyomalzemeler	28
2.6.3 Karaciğer doku mühendisliğinde kök hücreler.....	29
2.6.4 Biyolojik bir iskele olarak hücre dışı matriks	31
2.6.5 Hücre dışı matriks iskelelerine ilk yanıt	33
2.6.6 Hücre dışı matriksin biyobozunması.....	34
2.7 Deselülerizasyon	34
2.7.1 Deselülerizasyon ajanları	39

2.7.1.1 Kimyasal ajanlar	39
2.7.1.2 Biyolojik ajanlar.....	40
2.7.1.3 Fiziksel ajanlar	41
2.7.2 Karaciğer deselülerizasyonu	45
2.8 Hidrojeller.....	46
2.8.1 Deselülerize doku kaynaklı hidrojeller	48
2.8.2 Deselülerize doku kaynaklı hidrojellerden elde edilen sünger iskeleler	49
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	50
3.1 Materyal.....	50
3.2 Yöntem	51
3.2.1 Karaciğer dokularının izolasyonu ve deselülerizasyonu	51
3.2.2 Deselülerize karaciğer dokularının karakterizasyonu	54
3.2.2.1 DNA içeriği analizleri	54
3.2.2.2 Histokimyasal analizler	54
3.2.2.3 Sülfatlanmış glikozaminoglikan (sGAG) içeriği analizleri.....	55
3.2.2.4 Toplam protein içeriğinin belirlenmesi.....	56
3.2.2.5 Kollajen içeriğinin belirlenmesi.....	56
3.2.2.6 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizleri.....	57
3.2.3 Deselülerize karaciğer temelli biyoaktif hidrojel üretimi ve karakterizasyonu	57
3.2.3.1 Hepatik doku temelli hidrojel üretimi	57
3.2.3.2 Türbidimetrik analizler	58
3.2.4 Deselülerize karaciğer 3B doku iskelesi üretim ve karakterizasyonu	58
3.2.4.1 Hepatik doku temelli 3B doku iskelesi üretimi	58
3.2.4.2 Morfolojik analizler (SEM).....	59
3.2.4.3 Kimyasal analizler (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi, FT-IR)	59
3.2.4.4 Mekanik analizler	59
3.2.4.5 Su tutma ve bozunma analizleri.....	60
3.2.4.6 Termal analizler (TGA).....	61
3.2.4.7 Biyolojik analizler (<i>In Vitro</i> sitotoksitesite testi)	61
3.2.5 İstatistiksel Analizler	62
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	63
4.1 Deselülerize Karaciğer Dokularının Karakterizasyonuna Ait Bulgular	63
4.1.1 DNA içeriği analizleri bulguları	66
4.1.2 Histokimyasal analiz bulguları.....	67

4.1.3 Sülfatlanmış glikozaminoglikan (sGAG) içeriği analiz bulguları	69
4.1.4 Toplam protein içeriği analiz bulguları.....	71
4.1.5 Kollajen içeriği analiz bulguları.....	72
4.1.6 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analiz bulguları	73
4.2 Deselülerize Karaciğer Temelli Biyoaktif Hidrojel Üretim ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular.....	75
4.2.1 Hepatik doku temelli hidrojellerin karakterizasyonuna ait bulgular	75
4.2.1.1 Makroskopik bulgular.....	75
4.2.1.2 Turbidimetrik analiz bulguları.....	76
4.2.2 Deselülerize karaciğer 3B doku iskelesi üretim ve karakterizasyonuna ait bulgular.....	79
4.2.2.1 Morfolojik analiz (SEM) bulguları.....	79
4.2.2.2 Kimyasal analiz (FT-IR) bulguları.....	81
4.2.2.3 Mekanik analiz (Basma testleri) bulguları	83
4.2.2.4 Fiziksel analiz (Su tutma/bozunma) bulguları	85
4.2.2.5 Termal analiz (TGA) bulguları.....	87
4.2.2.6 <i>In Vitro</i> sitotoksikite testi analiz bulguları	88
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	91
KAYNAKLAR	106
ÖZGEÇMİŞ.....	120

KISALTMALAR DİZİNİ

2B	İki boyutlu
3B	Üç Boyutlu
BMP-2	Kemik Morfogenetik Protein-2
BYK	Biyoyapay Karaciğer
dkHDM	Deselülerize Karaciğer Hücre Dışı Matriksi
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FGF-4	Fibroblast Büyüme Faktörü-4
GelMa	Jelatin Metakroil
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler
HDM	Hücre Dışı Matriks
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
iAKMHK	İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreleri
iEKH	İnsan Embriyonik Kök Hücreleri
iPKH	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler
iUKMK	İnsan Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücreleri
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
MKH	Mezenkimal Kök Hücreler
PEG	Polietilen Glikol
RGD	Arginin-Glisin-Aspartik Asit
sGAG	Sülfatlanmış Glikozaminoglikan
TGF- α	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Alfa
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Tityus (1549), Titian, Museo del Prado, Madrit, İspanya. Yırtıcı bir kuş tarafından cezalandırılan Tityus'un resmi.....	6
Şekil 2.2 Gastrointestinal sistemin anatomik gösterimine ait şematik gösterim (https://en.wikipedia.org , Remesz 2013'ten değiştirilerek alınmıştır).....	8
Şekil 2.3 Karaciğerin histolojik olarak şematize edilmesi	13
Şekil 2.4 Hücreler arası etkileşime yardımcı farklı hücre bağlantı türleri	16
Şekil 2.5 Kişiselleştirilmiş tıbbın uygulanma şekline dair temsili şema.....	25
Şekil 3.1 Sığır karaciğer dokusunun deselülerizasyonuna ilişkin şematik gösterim	52
Şekil 3.2 Sığır karaciğer dokusunun jelleştirilme aşamalarına ait şematik gösterim.....	58
Şekil 4.1 Sığır kesimin ardından, bütün haldeki karaciğerin muhafazası ve kullanımına ait görseller	64
Şekil 4.2 Temsili olarak seçilen Protokol 9'a ait makroskopik görseller	65
Şekil 4.3 Uygulanan deselülerizasyon protokolleri sonrasında DNA içeriğinin birbirleri arasında karşılaştırılması (Protokol 1 - 5 arası)	66
Şekil 4.4 Uygulanan deselülerizasyon protokolleri sonrasında DNA içeriğinin birbirleri arasında karşılaştırılması (Protokol 6 - 11 arası)	67
Şekil 4.5 Deselülerize karaciğer dokularının H&E boyama sonuçları.	68
Şekil 4.6 Deselülerize karaciğer dokularının H&E boyamasına ait görüntüler.	69
Şekil 4.7 Uygulanan deselülerizasyon protokolleri sonrasında sGAG içeriğinin birbirleri arasında ve doğal karaciğer ile karşılaştırılması	70
Şekil 4.8 Uygulanan deselülerizasyon protokolleri sonrasında toplam protein miktarının doğal karaciğer ile karşılaştırılması ($\mu\text{g/mL}$)	71
Şekil 4.9 Farklı protokoller ile deselülerize edilen karaciğer HDM'lerine ait toplam kollajen içeriği bulguları (Kontrol=Doğal karaciğer)	73
Şekil 4.10 Liyofilize edilmiş dkHDM'lerine ait farklı büyütmelelerdeki elektron mikroskobu görüntüleri.....	74
Şekil 4.11 Hepatik doku temelli hidrojel üretiminde vizkozitelerin karşılaştırılmasına ilişkin makroskopik görseller.....	76
Şekil 4.12 Protokol 5, 7, 9 ve 11'e ait dkHDM'nin 4°C-37°C türbidimetrik jelleşme kinetiği grafiği (10mg/mL olarak hazırlanmıştır)	77
Şekil 4.13 dkHDM'nin 4°C-37°C türbidimetrik jelleşme kinetiği grafiği.....	78
Şekil 4.14 3B hepatik doku iskelelerine ait makroskopik görüntüler	79
Şekil 4.15 Protokol 9'dan elde edilen deselülerize karaciğer 3B doku iskelesine ait elektron mikroskobu görüntüleri.....	80
Şekil 4.16 Protokol 11'den elde edilen deselülerize karaciğer 3B doku iskelesine ait elektron mikroskobu görüntüleri.....	81
Şekil 4.17 Kontrol grubu, protokol 9 ve 11'e ait ATR-FTIR analizi grafiği	82
Şekil 4.18 Numunelere ilişkin yapılan basma testine ait veriler	84
Şekil 4.19 Su tutma (%) analizine ait bulgular	85
Şekil 4.20 Protokol 9 ve Protokol 11 ile hazırlanmış 3B hepatik doku iskelelerinin 7. güne ait (%) kütle kaybı grafiği	86

Şekil 4.21 TGA analizine ait grafikler	88
Şekil 4.22 Protokol 9 (15 mg/mL) ve Protokol 11 (15mg/mL) ve kontrol gruplarının MTT analizine ait grafik	89
Şekil 4.23 3B hepatik iskelelerin, insan dermal fibroblast hücreleri kullanılarak sitotoksitesinin belirlenmesi (tetrazolyum tuzunun formazan kristaline (mor) dönüşümü)	90



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Karaciğerdeki hepatositlere ait sayısal veriler	14
Çizelge 2.2 Karaciğer hücre dışı matriks elemanları	21
Çizelge 2.3 Ticari olarak kullanılan cerrahi yamalar	33
Çizelge 2.4 Çeşitli biyolojik kaynaklardan elde edilen biyomalzemeler ve özellikleri.....	37
Çizelge 2.5 Hücresizleştirme yöntemleri ve bunların doku bileşenlerinin uzaklaştırılmasına yönelik sınıflandırılması	42
Çizelge 3.1 Sığır karaciğerinin deselülerizasyonu için uygulanan protokoller.....	53
Çizelge 4.1 Su tutma analizine ait sayısal veriler (% Ortalama değer).....	86



1. GİRİŞ

Karaciğer, ortalama vücut ağırlığının yaklaşık %2-3'ünü oluşturan en büyük iç organdır. Protein sentezi ve sindirim için gerekli biyomoleküllerin ve çeşitli metabolitlerin sentezi başta olmak üzere glikojenin depolanması, bağırsaktan gelen sayısız yabancı antijenin ve mikroorganizmanın nötralize edilmesi ve detoksifikasyondaki gibi kritik görevleri üstlenmektedir. Karaciğer, bu görevlerini yerine getirmesi bakımından, ayrı lobları olan ve iki ayrı afferent kan akışı bulunan büyük parenkimal bir organ olarak tanımlanabilir (Grisham 2009).

Hücrel bileşenler bakımından karaciğerde, başta hepatositler olmak üzere, safra kesesi öncül epitel hücreleri, sinüzoidal epitel hücreler, Kupffer hücreleri, vasküler endotel hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, lökositler ve birçok farklı fenotipteki dentritik hücreler ve stellat hücreler yer almaktadır. Hepatositler, karaciğerin kütleye %70-85'ini, sayıca %60-70'ini meydana getirmekte olup, bu anlamda karaciğerin parenkimal dokusunun temel hücresidir. Bu hücreler, protein sentezi (albümin, α , β globülinler, protrombin fibrinojen vb.) ve depolanması, karbonhidrat dönüşümü, kolesterol, safra tuzu, fosfolipit sentezi, detoksifikasyon, modifikasyon işlemleri gibi görevleri yerine getirirler. Ayrıca vitamin B12, folik asit ve demirin depolanmasını sağlarlar. Hücrelere ev sahipliği yapan karaciğer hücre dışı matriksi (HDM) mevcut kan damarlarının duvarlarında, perivasküler ve safra kanalı alanlarında, ven duvarlarında, perisinüzoidal alanlarda yer alır. Yoğun olarak bulundukları bu bölgelerde antijenlerin yayılmasını önlemekle birlikte karaciğer yapısındaki hücrelerin farklılaşması ve fonksiyon göstermesi için yapısal destek ve aktif mikroçevre sağlarlar (Hay 1991, Gressner ve Weiskirchen 2006). Karaciğer HDM, toplam organ hacminin yaklaşık %15'ini meydana getirmektedir. Bileşenleri bakımından incelendiğinde, HDM'nin çoğunlukla kollajen tip I, III ve IV'den meydana geldiği görülmektedir. Bunun yanı sıra her biri kritik görevler üstlenen matriks glikoproteinleri, laminin, fibronektin ve proteoglikanlar gibi aktif moleküller de karaciğer HDM içeriğinde mevcuttur (Shoulders ve Raines 2009, Mao vd. 2015). Bu bileşenlerden özellikle kollajen ve laminin karaciğerdeki sinir, kan ve lenf damarlarının gelişmesine ve düzenlenmesine olanak sağlayan temel bileşenlerdir. Karaciğeri meydana getiren özelleşmiş hepatositler ile karaciğer HDM'si, bir arada iken

fonksiyon gösteren bir nişin temel bileşenleri olarak kabul edilebilir. Bu oldukça karmaşık doğal HDM bileşenleri, karaciğer vaskülerizasyonu ve intrahepatik safra kanallarının gelişimi ile eş zamanlı olarak çalışır (Hyysalo vd. 2017, Jović vd. 2018).

Metabolik ve salgılama özelliğinin yanı sıra karaciğerin en önemli özelliği karaciğerin temel hücresi olan hepatositlerin yüksek rejenerasyon kabiliyetidir. Öte yandan rejenerasyon kapasitesi bu denli yüksek olduğu bilinen karaciğer dokusunun bu özelliği çeşitli hasar veya hastalıklar sonrası sekteye uğramaktadır. Öyle ki, günümüzde karaciğer hastalıkları, diğer hastalıklar arasında ciddi ölüm oranlarına sahip hastalıklardan biri olarak dikkat çekmektedirler. Dünya genelinde karaciğer hastalıklarının yaklaşık 2 milyon hastanın ölümüne yol açtığı bildirilmiştir. Bunların 1 milyonu siroz komplikasyonlarından ve geriye kalanının ise viral hepatit ve hepatoselüler karsinom kaynaklı ölümler olduğu bilinmektedir. Dünya sıralamasında siroz en sık görülen 11'inci ve karaciğer kanseri ise 16'ncı ölüm nedenidir ve dünya çapındaki tüm ölümlerin %3,5'ini oluşturmaktadır (Asrani vd. 2019). Bu durumlarda karaciğer, fonksiyonel parenkimde bir kayıp tespit edildiğinde ve karaciğer fonksiyonunun sürdürülmesi gerektiğinde esas olarak hepatositlerin çoğalmasına dayanan olağanüstü bir rejeneratif kapasite geliştirmiştir. Bu durumlarda hasarın boyutuna bağlı olarak geleneksel tedavi yaklaşımları mevcut olmakla birlikte ilerlemiş karaciğer hastalıklarının veya karaciğer yetmezliğinin etkin tedavisi bulunmamaktadır. Bu hastalıkların tedavisi için günümüzde yapılan başlıca çalışmalar hem ilaç ve aşı uygulamalarında hem de yenileyici tıp alanında çalışmalar göze çarpmaktadır. Alternatif etkin tedavi yaklaşımı olarak öne çıkan seçenek artık rutin uygulanan parsiyel karaciğer transplantasyonudur. Öte yandan, donör yetersizliği nedeniyle birçok hasta verici bekleme listelerinde geçen süreye bağlı olarak hastaların ~%20'si nakil olamadan yaşamlarını kaybetmektedirler (NHS Raporu 2017/2018).

Birçok hastalığın tedavisinde olduğu gibi karaciğer hasarlarına yönelik hücresel tedavi seçeneği ilgi uyandırmakta ise de, tedavi etkinliğini sağlamak için gerekli sayıda fonksiyonel hepatosit elde edilmesine yönelik günümüzde halen aşılamamış *in vitro* ekspansiyon zorlukları mevcuttur. Primer hepatositlerin canlılıklarını ve karaciğer onarımı için kritik olan fonksiyonlarını, *in vitro* kültür sırasında veya transplantasyon

sonrasında kaybediyor olmaları önemli kısıtlamalardır (Zhang vd. 2010, Lee vd. 2014). Bu durumun temel nedeni hücrelerin *in vitro* şartlarda hücre-HDM ve hücre-hücre etkileşimlerini kaybetmeleri ve doğal fizyolojik dinamik etkilerin ortadan kalkmasıdır. Bir diğer alternatif yaklaşım, hücrelerin, biyomalzemelerin ve biyoaktif moleküllerin birlikte veya çeşitli kombinasyonlar ile kullanılarak hedef doku veya organın onarımını amaçlayan doku mühendisliği uygulamalarıdır. Bu uygulamanın temel amacı, hastalıklı veya kaybedilmiş dokuların/organların onarılması ya da değiştirilmesi amacıyla biyolojik eşdeğerde yeni doku/organların *in vitro* şartlarda geliştirilmesidir. Bu amaç doğrultusunda HDM görevini yapan ve hücrelerin (otolog veya allojenik) doku gelişimi için şablon görevini üstlenen gözenekli iskelelerle birleştirilmesi ve özel şartlar altında hücrelerin farklılaştırılarak çoğaltılmasıyla geliştirilmesini ana hedeftir (Elçin 2015). Doku mühendisliği çerçevesinde geliştirilecek üç boyutlu (3B) hücre-iskele yapılarının *in vitro* kültürü, kendi HDM bileşimlerini oluşturabilmeleri, sitokin ve diğer sinyal moleküllerini salgılayabilmeleri ve komşu hücrelerle etkileşimi için uygun biyomalzemenin geliştirilmesinde en önemli adımdır (Butler 2000). Bu zamana kadar hedef karaciğer dokusuna yönelik farklı sentetik veya doğal polimerler biyomalzeme geliştirme çalışmalarında kullanılmış olsa da doğal karaciğer HDM'sini bileşenleri bakımından taklit edebilme açısından oldukça yetersiz kalmaktadırlar.

Bu ve benzer problemleri aşmak adına ortaya çıkmış ve deselülerizasyon teknolojisi olarak adlandırılan doku mühendisliği yöntemi, seçilen doku ve/veya organın özelliklerine uygun spesifik kimyasal, fiziksel ve/veya enzimatik yöntemler kullanılarak hücrelerinden arındırılması sonucunda biyoyumlu biyomalzeme iskele yapılarının elde edilmesi mümkündür. Yöntemin başarısı büyük ölçüde hücrelerin ve nükleik asit bileşenlerinin uzaklaştırılması aşamasında HDM'nin mevcut doğal biyoaktif içeriğinin yapıda korunabilmesine bağlıdır. Daha sonra elde edilecek doğal HDM özellikteki biyomalzeme doğrudan kullanılabileceği gibi izole edilmiş hücreler ile kombine edilerek de (reselülerizasyon) kullanılabilmektedir. Bu özellikleri ile bu teknolojisi sayesinde klinikte farklı alanlarda kullanılabilen çeşitli doku ve organ temelli ürünler geliştirilebilmiştir (Parmaksiz vd. 2016).

Nitekim karaciğer dokusu temelli deselülerizasyon çalışmalarına da literatürde sıkça rastlamak mümkündür. Hayvanlardan elde edilen karaciğer dokusunun deselülerizasyonu ile üretilen doku mühendisliği iskeleleri farklı çalışmalarda rapor edilmiştir (Lin vd. 2004, Gilbert vd. 2006, Shupe vd. 2010, Uygun vd. 2010, Baptista vd. 2011, Mazza vd. 2015). Yapılan araştırmalar, 3B HDM iskelelerinin karaciğer fonksiyonlarının sürdürülmesi için *in vitro* ortamda uygun mikroçevreyi sağladığını göstermektedir (Mazza vd. 2015). Hücre-hücre ve hücre-HDM etkileşimleri bu mikroçevreyi iyi şekilde taklit edebilmek amacıyla karaciğere özgü olan rejenerasyon kapasitesini yüksek verimle koruma ve sürdürülebilirliğini sağlaması, deselülerizasyonu, HDM'nin doğal yapılanması ve biyoaktif moleküllerin varlığı doku mühendisliğinin temel amacına hizmet etmesi açısından bu yaklaşımı eşsiz kılmaktadır. Karaciğerin doğal HDM'sinin taklit edilmesi ile karaciğer hücrelerinin *in vitro* şartlarda fonksiyonlarını kaybetmeden üretilibilmeleri, gerek hücre nakli açısından 3B ortam sağlaması, gerekse *in vitro* doku modelleri oluşturularak yenilikçi ve daha başarılı ilaç tarama sistemlerinin geliştirilmesini sağlayabilmesi bakımından dikkat çekmektedir.

Bu amaçla literatürde belirlenen eksiklikler ve bilinmeyenler doğrultusunda, tez çalışmasında ilk aşamada sığır karaciğer dokularından doğal HDM eldesine yönelik etkin deselülerizasyon protokolünün belirlenmesi amacıyla farklı protokollerin çalışılması ve etkinliklerinin histokimyasal, spektrofotometrik ve mikroskopik analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dkHDM'lerin biyoaktif içeriklerinin (sGAG, kollajen, total protein) detaylı karakterizasyonu sonrasında hidrojel ve 3B iskele yapıları geliştirilmiştir. Geliştirilen farklı formdaki dkHDM temelli biyomalzemelerin mekanik (kuvvet dayanımı), fiziksel (bozunma, su tutma, jelleşme kinetiği, termal kararlılığı), kimyasal (FTIR), morfolojik (SEM) ve biyolojik (*in vitro* sitotoksitesite) özellikleri detaylı olarak incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Tarih ve Etimoloji

Tarihin eski zamanlarından beri karaciğer, kanca zengin olmasıyla vücudun önemli bir organı olarak bilinmektedir. Öyle ki, Yunan mitolojisinde, Zeus tarafından cezalandırılan Prometheus'un karaciğerinin bir kartal tarafından parçalanması ve ertesi gün işkencenin tekrarlanması, karaciğerin rejeneratif özelliğini mitolojik ve güzel sanatlar üzerinden ifade edilişi olarak görülmektedir. Tiniakos ve arkadaşlarına göre o çağlardaki tıp bilimcilerinin, karaciğerin kendini yenileyebilme kapasitesini ilişkin herhangi yazılı bir bilgi bulunmamasına rağmen, karaciğerin rejeneratif kapasitesinin bilindiğini düşündürmüştür. Tityus tablosunda (1549) benzer şekilde Prometheus efsanesine atıf yapan imgeler yer aldığı düşünülmektedir (Power ve Rasko 2008, Tiniakos vd. 2010) (**Şekil 2.1**).

Etimolojik olarak bakıldığında Cermen ve Romen dillerinde “karaciğeri” belirtmede farklı terimlerin kullanımına rastlanmaktadır. Yunancada “zevk” kelimesiyle bağlantılı olan “hèpar” kelimesi dikkat çekmektedir. Antik çağda ise karaciğerin ruhun ve insan duygularının yeri olarak kabul edildiği bilinmektedir. Öte yandan, Cermen "lifere" terimi başlangıçta, karaciğer ile sağlık ve varoluş arasındaki ilişkinin altını çizen “yaşam” kelimesiyle olan bağlantısı görülmektedir. Yine, eski İngilizcede “lifer”; Hollandacada “lever”; Almancada “leber”; Danca, Norveççe ve İsveçcede “lever” (eski Norveçcede “lifr”) “yaşam” ile ilişkili terimlerdir. Erken Modern Çağ'da ise kralın sık sık ülkesinin “karaciğeri” olarak tanımlandığı görülmektedir ki bu da karaciğerin önemini işaret etmektedir (Riva vd. 2011).

Karaciğer anatomisine ilişkin yazılı çalışmalar incelendiğinde, 1306 ve 1315'te halk arasında yapılan otopsilere dayanan Mondino de Luzzi'nin “Anatomia Mundini” adlı eseri öne çıkmaktadır. Bu anatomi kitabı neredeyse iki yüzyıl boyunca bir kanun görevi görmüştür. Glisson ise 1654 yılında karaciğer hakkındaki ilk kapsamlı monografisini yayınlamıştır. Bu çalışmalar, devam eden iki yüzyıl boyunca referans olarak görev üstlenmiştir (Glisson 1654).



Şekil 2.1 Tityus (1549), Titian, Museo del Prado, Madrid, İspanya. Yırtıcı bir kuş tarafından cezalandırılan Tityus'un resmi.

2.2 Karaciğer Anatomisi

Karaciğer, ortalama vücut ağırlığının yaklaşık %2 ila %3'ünü oluşturan en büyük organdır. Sağ hemidiaframın altındaki karın boşluğunun sağ üst kadranında bulunur. Bu organ göğüs kafesi tarafından korunur ve ligamentöz bağlantılar olan periton yoluyla konumunu sürdürür. Gerçek ligamentler olmamasına rağmen, bu bağlanmalar avaskülerdir ve Glisson kapsülüyle veya karaciğerin visseral peritonu ile devamlılık gösterirler (Bismuth 1982).

Gastrointestinal sistemin de karaciğer ile ilişkisi mevcuttur (**Şekil 2.2**). Mide, sol hepatik lob ile gastrohepatik ligament veya midenin küçük kurvatürü ile ve sol hepatik lobtaki *ligamentum venosum* ile bağlantılı olan küçük omentumun üst yönü ile

ilişkilidir. Önemli nöral ve vasküler yapılar, vagus sinirinin hepatik bölümü ve sol gastrik arter orijinininden ilerleyen aberrant sol hepatik arteri içeren gastrohepatik ligament içerisinde devamlılık göstermektedir. Kalın bağırsağın, çıkan kolunu ve enine kolonun birleştiği bölge ile ya çok yakındır ya da sağ hepatik lob ile doğrudan temas halindedir. Ek olarak, onikiparmak bağırsağı ve portal yapılar, hepatoduodenal ligament (küçük omentumun alt kısmı) ve *porta hepatis* yoluyla karaciğer ile doğrudan ilişkilidir (Jamieson 2006).

Karaciğerde sinir innervasyonu ve karaciğer fonksiyonunun kontrolleri oldukça karmaşık olmakla birlikte halen tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Bununla birlikte, vücudun geri kalanında olduğu gibi, karaciğer de parasempatik ve sempatik nöral inervasyonlara sahiptir. Sinir lifleri, *solar plexus*dan, alt torasik ganglionlardan, sağ frenik sinirden ve *vagiden* köken alır. Vagus sinirleri, göğüs kafesinden karın içine doğru ilerlerken ön (sol) ve arka (sağ) dallara ayrılır. *Anterior vagus*, küçük omentum boyunca ilerleyen ve parasempatik inervasyondan sorumlu olan sefalik ve hepatik olarak iki dala ayrılır (Jamieson 2006).

2.2.1 Hepatik damar ağı

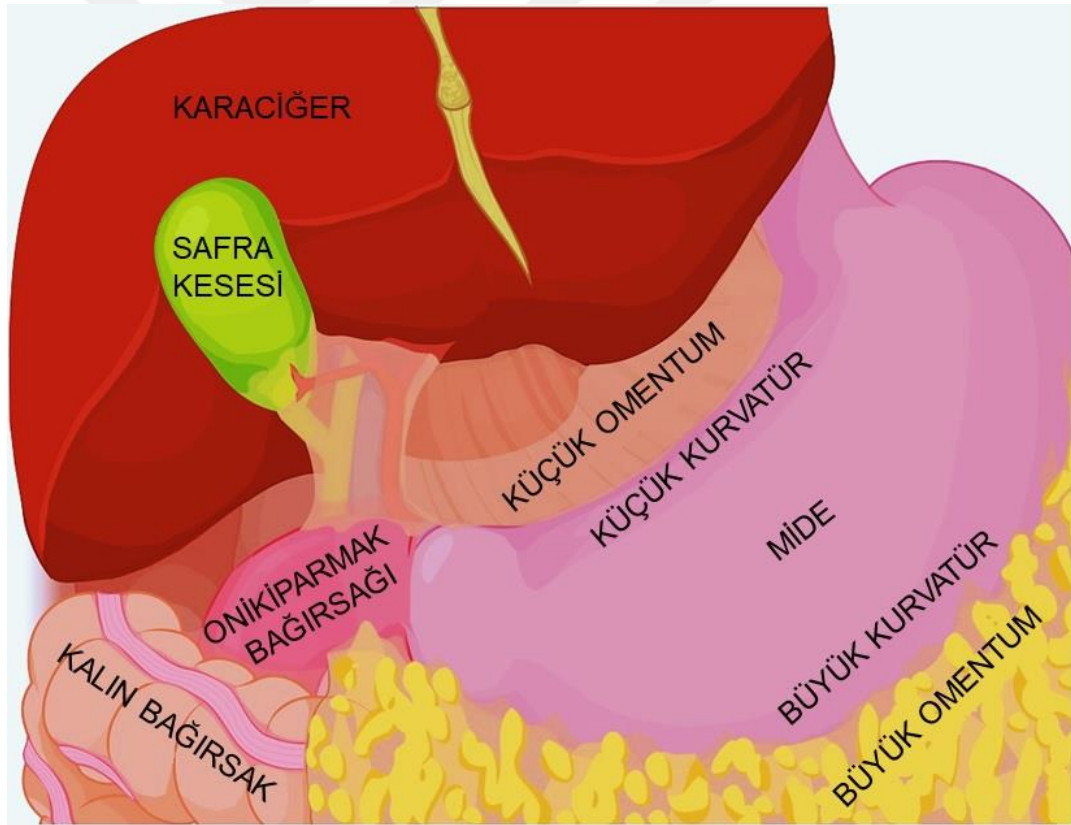
Karaciğer çok vasküler bir organdır ve istirahatte toplam kardiyak çıktının %25'ini alır. Kan desteğinin %25 ila %30'unu hepatik arterden ve %70 ila %75'ini portal venden alır. Arteriyel ve portal kan, hepatik venöz sistem yoluyla sistemik dolaşıma boşalmadan önce sonuçta hepatik sinüzoidler içinde karışır (Abdel-Misih ve Bloomston 2010).

2.2.2 Arteriyel damar ağı

Karaciğer, dolaşımı bakımından benzersiz bir organdır. Bu özelliği, hepatik arterden köken alan iki afferent damardan kan sağlanması ve portal ven olmak üzere damar ağınca zengin olmasından ileri gelmektedir. Oksijence zengin arteriyel kan ve besince zengin portal venöz kan hepatik parankimalde mikrodolaşım halindedir (Lewis ve Downes 2019). Karaciğer sinüzoidleri yaklaşık olarak 10-15 µm çapındadır ve

epitelyum ile devamlılık göstermektedir. Buna rağmen epitel tabaka intraselüler sıvı ve proteinin geçişine izin vermek için birbirlerine gevşek bir şekilde bağlantı kurmuşlardır ve bu sayede Disse boşluğu denen bölge oluşmaktadır (Leffert vd. 1979) Disse boşluğu ise oksijence zengin kan ve besinin birleştiği bir lokasyon olarak ortaya çıkar.

Karaciğerin arteriyel damar yapısı değişkenlik göstermektedir. Ortak hepatik arter, sol gastrik ve splenik arterlerle birlikte çölyak ekseninden köken alır. Ortak hepatik arter lateral olarak ilerler ve uygun hepatik arter ve gastroduodenal artere dallanır. Gastroduodenal arter, pilor ve proksimal duodenumu beslemek için kaudal (kuyruğa veya alta ait) bir şekilde ilerler. Safra kesesine yapılan kistik arter genellikle sağ hepatik arterden köken alır (Pawlina ve Ross 2018).



Şekil 2.2 Gastrointestinal sistemin anatomik gösterimine ait şematik gösterim (<https://en.wikipedia.org>, Remesz 2013'ten değiştirilerek alınmıştır)

2.3 Karaciğerin Histolojisi

Karaciğerin yapısal komponentleri incelendiğinde parankima, bağ dokusu olan stroma, sinusoidler (sinusoidal kapiller) ve perisinusoidal boşluktan (Disse) meydana geldiği görülmektedir (**Şekil 2.3**). Parankim, yetişkinlerde normalde bir hücre kalınlığında olan ve sinüzoidal kılcal damarlarla ayrılan hepatositlerden meydana gelmektedir. Parankim, 6 yaşına kadar genç bireylerde ise karaciğer hücreleri iki hücre kalınlığında plakalar halinde düzenlenmiştir. Stroma, Glisson kapsülü ile süreklidir ve kan damarları, sinirler, lenfatik damarlar ve safra kanalları bağ dokusu stroması içinde düzenlenmiştir. Sinüzoidal kılcal damarlar, hepatosit plakaları arasındaki vasküler kanallardır. Disse kanalları ise sinüzoidal endotel ve hepatositler arasında bulunan perisinüzoidal boşluklardır (Kanel ve Korula 2010, Junqueira ve Mescher 2013, Pawlina ve Ross 2018).

2.3.1 Karaciğer lobülleri

Karaciğerin fonksiyon gösteren en küçük ünitelerini tanımlamanın üç farklı yolu bulunmaktadır. Bunlar, klasik lobül, portal lobül ve karaciğer asinüsüdür. Karaciğer parankimasını en geleneksel yolla ifade edilme şekli klasik lobül kavramıdır. Portal ven ve hepatik arterin dallarının organ içindeki dağılımına ve karaciğer hücrelerini perfüze ederek onlardan gelen kanın izlediği yola dayanır. Klasik hepatik lobül, kabaca altıgen bir doku kütesidir (Pawlina ve Ross 2018).

Klasik lobül (**Şekil 2.3.A**), bir araya gelmiş hepatosit kümelerini, portal ve arteriyel kanı birleştiren sinüzoidlerin anastomoz sistemi ile ayrılmasıyla oluşan sistemlerdir. Her lobül yaklaşık 0,7-2 mm ölçülerindedir. Lobülün merkezinde, sinüzoidlerin aktığı terminal hepatik venül (merkezi ven) bulunur. Hücre kümeleri, sinüzoidler gibi merkezi damardan lobülün çevresine yayılır. Altıgenin açılarında portal kanallar, portal triadların varlığı ile karakterize gevşek stromal bağ dokusu mevcuttur. Bu bağ dokusu sonuçta karaciğerin fibröz kapsülü ile süreklidir. Portal kanal, lobülün en dışındaki hepatositler ile sınırlanmıştır. Portal kanalının kenarlarında, bağ dokusu stroma ve hepatositler arasında, periportal boşluk (Mall alanı) adı verilen küçük bir alan vardır. Bu alanın,

lenfin karaciğerde ortaya çıktığı yerlerden biri olduğu düşünülmektedir (Kanel ve Korula 2010, Junqueira ve Mescher 2013, Pawlina ve Ross 2018). Domuz gibi bazı türlerde, klasik lobüller, portal alanları nispeten kalın bağ dokusu katmanları ile bağlandıklarından kolayca ayırt edilebilmektedir. Bununla birlikte, insanlarda normalde çok az interlobüler bağ dokusu vardır. Dolayısıyla karaciğerin histolojik bölümlerini incelerken, klasik lobun büyüklüğünü anlamak için merkezi bir damarı çevreleyen portal alanlar arasında hayali çizgiler çizmek gerekmektedir (Kanel ve Korula 2010, Junqueira ve Mescher 2013, Pawlina ve Ross 2018).

Portal lobül tanımlaması karaciğerin ekzokrin fonksiyonlarını vurgular. Karaciğerin ana ekzokrin fonksiyonu safra sekresyonudur. Dolayısıyla, portal lobülün morfolojik eksen, klasik lobülün portal triadının interlobüler safra kanalıdır. Dış kenar boşlukları, portal triadın en yakın olan üç terminal hepatik venleri arasına çizilen hayali çizgidir (**Şekil 2.3.B**). Bu çizgiler, safra kanalına akan safrayı salgılayan üç klasik lobülün kısımlarını içeren kabaca üçgen bir doku bloğunu tanımlar. Bu portal lobül kavramı, hepatik parankimal yapının diğer ekzokrin bezlerinininkine benzer şekilde tarif edilmesine izin verir (Pawlina ve Ross 2018).

Karaciğer asinusu tanımı ise kan perfüzyonu, metabolik aktivite ve karaciğer patolojisi arasında en iyi korelasyonu sağlayan yapısal birimini ifade etmektedir. Karaciğer asinüsü baklava deseni şeklindedir ve hepatik parankimdeki en küçük fonksiyonel birimi temsil eder. Asinusun kısa eksen, iki klasik lobül arasındaki sınır boyunca uzanan portal triadın terminal dalları tarafından tanımlanır. Asinusun uzun eksen, kısa eksene en yakın iki merkezi damar arasına çizilen bir çizgidir. Bu nedenle, iki boyutlu bir görünümde karaciğer asinusu, komşu klasik lobüllerin bölümlerini kaplar. Bu kavram, karaciğerin ekzokrin salgılama fonksiyonunun portal lobül ile karşılaştırılabilir bir tanımına izin verir. Her karaciğer asinusundaki hepatositlerin, kısa eksen çevreleyen üç eş merkezli eliptik bölgede düzenlendiği tarif edilmektedir (Pawlina ve Ross 2018) (**Şekil 2.3.B**). Bölge 1, kısa eksene en yakın ve portal ven ve hepatik arterin penetran dallarından gelen kan kaynağıdır. Bu bölge klasik lobüllerin çevresine karşılık gelir. Bölge 3 kısa eksenden en uzak ve terminal hepatik damara (merkezi ven) en yakın olanıdır. Bu bölge, terminal lobüllerin veni çevreleyen klasik lobülün en merkezi

kısmına karşılık gelir. Bölge 2, bölge 1 ve 3 arasında yer alır, ancak keskin sınırları yoktur.

Bölgeleme, karaciğer hücrelerinin vasküler perfüzyonunun derecesine veya kalitesine göre karaciğer parankimindeki dejenerasyon, rejenerasyon ve spesifik toksik etkilerin desenlerinin tanımlanması ve yorumlanmasında önemlidir. Sinüzoidal kan akışı, oksijen gradyanı, hepatositlerin metabolik aktivitesi ve hepatik enzimlerin dağılımı üç bölge arasında değişmektedir. İskemiden kaynaklanan karaciğer hasarının dağılımı ve toksik maddelere maruz kalma bu bölgesel yorum kullanılarak açıklanabilir. Bölge 1'deki hücreler, sinüzoidal kandan oksijen, besin maddeleri ve toksinleri alan ve safra kanalı oklüzyonundan (safra stazı) sonra morfolojik değişiklikler gösteren ilk hücrelerdir. Bu hücreler, dolaşım bozukluğu ve ilk yenilenme durumunda da ölen son hücrelerdir. Diğer yandan, bölge 3'teki hücreler, azalmış perfüzyon durumlarında ilk olarak iskemik nekrozu ve ilk olarak yağ birikimini gösteren hücrelerdir. Toksik maddelere ve safra stazına son cevap veren hücrelerdir. Enzim aktivitesindeki normal varyasyonlar, sitoplazmik organellerin sayısı ve büyüklüğü ve sitoplazmik glikojen depolarının boyutu da bölge 1 ve 3 arasında görülür. Bölge 2'deki hücreler fonksiyonel ve morfolojik özelliklere ve bölge 1 ve 3'ün aralarına verilen cevaplara sahiptir (Pawlina ve Ross 2018).

Kan damarları interlobüler damarlar adı verilen portal kanallar boyunca uzanmaktadır. Sadece, en küçük portal triadları oluşturan interlobüler damarlar sinüzoidlere kan gönderir. Büyük interlobüler damarlar, lobülün çevresinde bulunan dağıtım görevini üstlenmiş damarlara dallanmaktadırlar. Sinüzoidlerde kan, santral olarak merkezi damara doğru akar. Merkezi damar, klasik karaciğer lobülünün merkezi eksenini boyunca ilerler, lobül boyunca ilerledikçe büyür ve sublobüler bir damara boşalır. Birkaç sublobular venin birleşmesi ise inferior vena cavaya boşalan daha büyük hepatik damarlar oluşturmak için ilerler. Karaciğer arteri doğrudan sinüzoidlere arteriyel kan sağlamanın yanı sıra bağ dokusuna ve daha büyük portal kanallarındaki diğer yapılara arteriyel kan sağlar. Bu daha büyük portal kanallarındaki kılcal damarlar kanı sinüsoid içine boşaltmadan önce interlobüler damarlara geri döndürür (Kanel ve Korula 2010, Junqueira ve Mescher 2013, Pawlina ve Ross 2018).

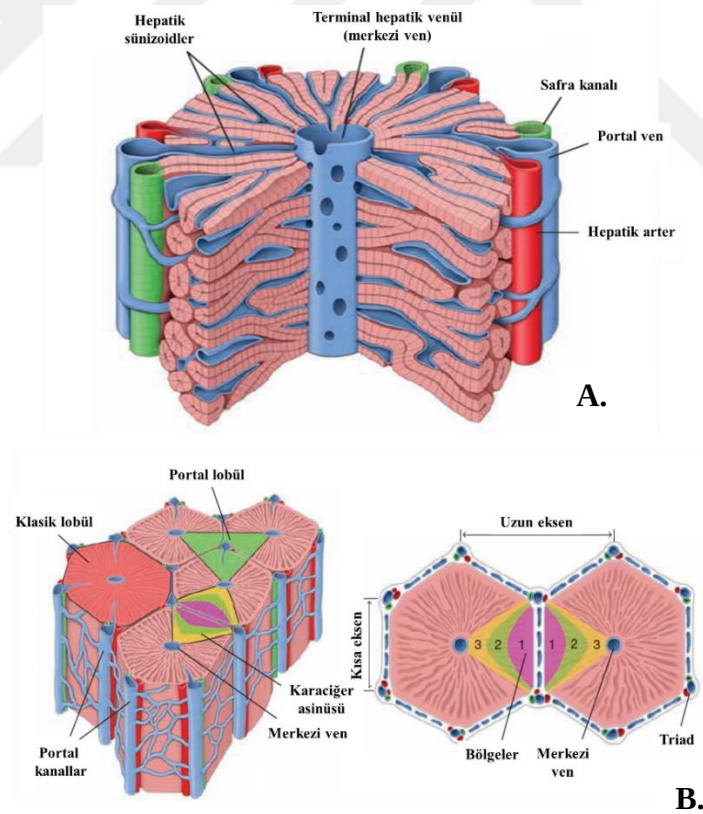
Merkezi damar, hepatik sinüzoidlerden kan alan ince duvarlı bir damardır. Klasik lobüldeki merkezi konumu nedeniyle bu şekilde adlandırılan merkezi damar, aslında hepatik ven sisteminin terminal venülüdür. Sublobüler ven, terminal hepatik venüllerden kan alan damar, endotelin hemen dışında, hem kollajen hem de elastin bağ doku elemanlarına sahiptir. Karaciğer damarlarında kapakçık yoktur. Karaciğer sinüzoidleri ise ince ve süreksiz bir endotel tabakası ile kaplıdır (Kanel ve Korula 2010, Junqueira ve Mescher 2013, Pawlina ve Ross 2018).

Karaciğer sinüzoidleri diğer sinüzoidlerden farklıdır, çünkü ikinci bir hücre tipi, yıldız sinüzoidal makrofaj veya Kupffer hücresi, damar astarının düzenli bir parçasıdır. Kupffer hücreleri mononükleer fagositotik sisteme aittir. Mononükleer fagositotik sistemin diğer üyeleri gibi Kupffer hücreleri de monositlerden köken almaktadır (Grisham 2009, Pawlina ve Ross 2018).

Perisinüzoidal boşluk (Disse boşluğu), kan ve karaciğer hücreleri arasında materyal alışverişi bölgesidir. Disse boşluğu, hepatositlerin bazal yüzeyleri ile sinüzoidleri hizalayan, endotel hücrelerinin ve Kupffer hücrelerinin bazal yüzeyleri arasında yer alır. Hepatositlerin bazal yüzeyinden bu boşluğa doğru çıkıntı yapan mikrovilluslar görülmektedir. Mikrovilluslar, hepatositler ve plazma arasında malzeme alışverişi için mevcut yüzey alanını altı katına kadar artırır. Endotel tabakasındaki büyük boşluklar ve sürekli bazal laminanın bulunmaması nedeniyle, sinüzoiddeki kan plazması ile hepatosit plazma membranı arasında önemli bir engel yoktur. Hepatosit tarafından sentezlenen proteinler ve lipoproteinler, perisinüzoidal boşluktan kana aktarılır; bu yol, safra dışındaki diğer karaciğer salgıları için geçerlidir (Bismuth 1982, Junqueira ve Mescher 2013, Pawlina ve Ross 2018).

Safra sistemi ise safranın hepatositlerden safra kesesine ve daha sonra bağırsağa aktığı kanal sistemidir. Yetişkin insan karaciğerinde, 2 km'den fazla birbirine bağlı olan safra kanalı, farklı boyut ve şekillerde kanallar içermektedir. Bu yapılar sadece pasif kanallar değil, aynı zamanda hormonal ve nöral stimülasyona yanıt olarak safra akışını değiştirebilir ve bileşimini ayarlayabilmektedir. Safra sistemi safra akışını izleyen ve içeriğini düzenleyen kolanjiyositlerle kaplıdır. Kolanjiyositler safra sistemi boyunca

uzanan bu sisteme özgü epitel hücrelerdir. Kolanjiyositler, aralarındaki sıkı bağlantılarla ve bazal laminası düzenli olan bitişik olarak düzenlenmiş hücrelerdir. Kolanjiyositlerin apikalinden lümene uzanan mikrovillusleri bulunmaktadır. Safra kanalı, esas olarak kübik şekilli küçük kolanjiyositlerle kaplıdır, ancak safra kanalının çapı arttıkça, giderek daha büyük ve daha sütun şekilli olurlar. Safra sisteminin en küçük dalları, hepatositlerin safra salgıladığı safra kanaliküleridir. Bunlar, idealize altı taraflı hepatositlerin dört tarafı etrafında tam bir halka oluşturur. Lümen çapı yaklaşık 0,5 μm 'dir ve *zonula adherent*leri ve *dezmozom*larını da içeren bağlantı komplekslerinin bir parçası olan sıkı bağlantılarla hücreler arası bölmenin geri kalanından ayrılırlar. İki bitişik hepatositin mikrovillusları kanaliküler lümene uzanır. Safra akışı, terminal hepatik venül (merkezi damar) bölgesinden portal kanala (kan akışının tersi yönde) doğru gerçekleşir (Kanel ve Korula 2010, Junqueira ve Mescher 2013, Pawlina ve Ross 2018).



Şekil 2.3 Karaciğerin histolojik olarak şematize edilmesi(Pawlina ve Ross 2018)

A) klasik lobül yaklaşımı ve B) üç farklı lobül yaklaşımı

2.4 Karaciğer Hücreleri

Karaciğer sadece omurgalılarda bulunan, detoksifiye, çeşitli metabolitler, protein sentezi ve sindirim için gerekli biyomolekülleri üreten bir organdır. Bununla birlikte glikojen depolar, bağırsaktan gelen sayısız yabancı antijeni ve mikroorganizmaları nötralize eder. Yetişkin insan karaciğeri kütlesi, cinsiyet ve vücut ölçüsüne bağlı olarak 1300-1700 g arasında değişir (Grisham 2009). Ortalama vücut ağırlığının yaklaşık %2-%3'ünü oluşturması açısından en büyük iç organdır. Bu açıdan karaciğer, birçok ayrı loblu ve 2 ayrı afferent kan akışı olan büyük parenkimal bir organdır. Bu, çeşitli fonksiyonu olan kompleks organ, çok fonksiyonlu özgül hücreleri sayesinde görevlerini yerine getirir.

Hepatosit, safra kesesi epitelyumu, sinusoidal epitelyal hücreler, Kupffer hücreleri, vasküler, endotelyum, fibroblast, makrofaj, lökositler ve birçok farklı fenotipte dentritik hücre ve stellat hücreler karaciğerde bulunan hücre tipleridir. Hepatositler, karaciğerin kütleye %70-85'ini, sayıca %60-70'ini meydana getirmekte olup, bu anlamda karaciğerin parenkimal dokusunun temel hücresidir (**Çizelge 2.1**).

Çizelge 2.1 Karaciğerdeki hepatositlere ait sayısal veriler (Kuntz ve Kuntz 2009)

Karaciğer hacmi oranı	%80
Toplam hücre sayısına oranı	%60-65
Karaciğer hücre sayısı	300 milyar
Karaciğer başına hepatosit sayısı	171 milyon
Hepatosit çapı	20-40 µm
Hepatosit ömrü	150-200 gün
Hepatositlerin membran yüzey alanı	33000 m ²

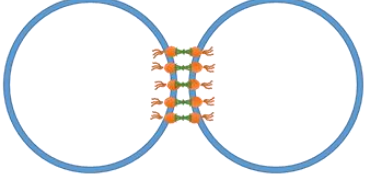
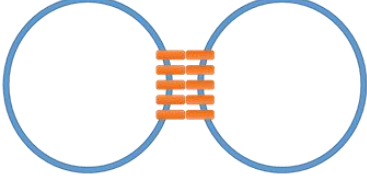
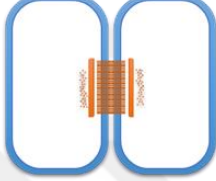
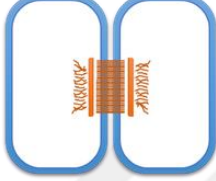
2.4.1 Hepatositler

Hepatositler, hücre yapısındaki bireysel konumları nedeniyle altı veya daha fazla yüzü olan çokgen hücrelerdir. Artan yaşla birlikte karaciğerin ağırlığının vücut ağırlığına göre %3'ten %2'ye azalmasıyla, mutlak hepatosit sayısında da karşılık gelen bir azalma

vardır. Hepatositlerin olağan ömrü en az 150-200 gündür (Karpen ve Crawford 1999, Kuntz ve Kuntz 2009).

Hepatositler değişen taşıyıcı, reseptör ve kanal proteinleri içermektedir. Morfolojik ve fonksiyonel hücresel polarizasyonla tanımlanan üç bölmeye ayrılmış, açıkça belirgin hatlara sahip bir hücre zarına sahiptirler. Hepatositler zarın dışında, *sinüzoidal yüzeyde* (bazolateral) ve Disse boşluğunda da bulunan yaklaşık %37'si emici ve salgılama işlevi olan, yüzey alanını altı kat arttıran sayısız mikrovillus içermektedir. Hatta bazıları fenestradan sinüzoidlere doğru çıkıntı yaparlar ve böylece kanla doğrudan temas halindedir. Sinüzoidal membranda, altında veziküller bulunan invajinasyonlar görülmektedir (Grisham 2009). Dış hepatosit zarının yaklaşık %15'i, *kanaliküler yüzey* (apikal) olarak adlandırılan yapıdan oluşur. Bu alan hücrenin salgı kutubu olarak ifade edilir. Dış hepatosit zarının geri kalan %50'si Disse boşluğuna bağlı pürüzsüz hücreler arası fissürü oluşturur. Bu fissür kanaliküllerden kapalı birleşme bağlantıları (*zonula occludens*) ile kapatılır, sadece su ve katyonların geçişine izin verir. Komşu hepatositler ile adezyon alanları, kemer dezmozomlar (*zonula adhaerens*) ve nokta dezmozomlar (*maculae adhaerens*) olan membran proteinleri ile sağlanır. Lateral membran üzerinde rastgele bir şekilde dağılır ve hepatosit yapısını stabilize etmeye yardımcı olurlar. Aslında, bitişik hepatositler arasında boru benzeri bağlantılar oluşturan ve böylece hücreler arası alışverişi kolaylaştıran *gap junctionlar* (*maculae communicantes*) içerirler. Hücre ölümü meydana geldiğinde, komşu hücrelerin boşluk yapıları, dinamik yapılar olarak, hücre ölümünün ilerlemesini önlemek için kapanır (Feldmann 1989, Stockert ve Wolkoff 2001) (Şekil 2.4).

Dört farklı hücre tipi sinüzoidal hücreler terimi altında toplanır: endotel hücreleri, Kupffer hücreleri, Ito hücreleri ve Pit hücreleri. Sinüzoidal hücreler (31 milyon/mg karaciğer) karaciğer hacminin nispeten küçük bir kısmını (%6,3) oluştursa da, toplam hücre sayısının %30-40'ını oluştururlar. Plazma zarlarının toplam yüzey alanı, tüm karaciğer hücrelerinin toplam membran yüzeyinin %26,5'ini oluşturmaktadır (Aterman 1986, Smedsrød vd. 1994, Karpen ve Crawford 1999, Stockert ve Wolkoff 2001).

SIKI BAĞLANTILAR		İLETİŞİM BAĞLANTILARI	
KAPALI BİRLEŞME NOKTASI		NEKSUS	
			
BAĞLANTI ÇEŞİTLERİ			
HÜCRE - HÜCRE		HÜCRE - HDM	
KEMER DEZMOZOM	DEZMOZOM	FOKAL ADEZYON	HEMİDEZMEZOM
			

Şekil 2.4 Hücreler arası etkileşime yardımcı farklı hücre bağlantı türleri

2.4.2 Endotel hücreleri

Endotel hücreleri sinüzoidal hücrelerin en büyük kısmını (%70) oluşturur. İnce sitoplazmik dalları ile hem komşu endotel hücreleri hem de hepatositlerin mikrovillusları ile gevşek bir bağlantı içindedirler, şekilleri düz ve hücre çekirdekleri hücre morfolojisi içerisinde bir kavis oluşturmaktadır. İnce bir hücre dışı matriks tabakası üzerinde bulunurlar. Toplam hücre sayısı oranı %15-20'dir, ancak karaciğer hacminin sadece %2,8'ini oluştururlar (Smedsrød vd. 1994, Karpen ve Crawford 1999).

Sinüzoidler (toplam yüzey alanı 400 m^2) $4\text{-}5 \text{ }\mu\text{m}$ genişliğinde ve $350\text{-}500 \text{ }\mu\text{m}$ uzunluğundadır. Burada portal kan, arteriyel kan ile birleşir. Kanın giriş ve çıkışı sinüzoidal sfinkterler tarafından kontrol edilir. Diğer organların kılcal damarlarına kıyasla sinüzoidler temel yapısal farklılıklar gösterir. Çapı değişken olmakla birlikte genellikle $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ olan porlar şeklinde dağınık bir haldedirler. Birlikte gruplandırıldığında, bu gözenekler elek plakası olarak bilinir. Ayrıca $0,5 \text{ }\mu\text{m}$ çapında fenestra olarak adlandırılan daha büyük gözenekler vardır ve sinüzoidlerde kan ile hepatositler arasında sıvı ve madde değişimini düzenlerler. Ek olarak, lipitler, kolesterol

ve A vitamini dengesi için büyük önem taşırlar. Endotel hücreleri ayrıca sitokinler (örn. II 1, 6, IF, α -TNF), matriks bileşenleri (örn. kollajenler, fibronektin) ve büyüme faktörleri (örn. HGF, IGF, FGF) ve ayrıca vazoaktif maddeler (örn. NO, endotelin) üretir ve salgılarlar (Smedsrød vd. 1994, Karpen ve Crawford 1999).

2.4.3 Kupffer hücreleri

Kupffer hücreleri sinüzoidal hücrelerin yaklaşık %25'ini oluşturur. Toplam karaciğer hücrelerinin %8-12'sini ve karaciğer hacminin %2'sini oluştururlar ve yarılanma ömrü 12,4 gündür. Muhtemelen monositlerden köken alır ve kemik iliğindeki kök hücrelerden köken aldıklarından mononükleer fagositoz sistemine aittirler. Kupffer hücreleri mitoz ile çoğalabilir. Sinüsendotelde rastgele olarak dağılmış vaziyette bulunurlar ancak periportal bölgede perivenöz bölgeye göre üç ila dört kat daha sık görülürler. Hücrelere bitişik veya aralıklı olabilirler, çıkıntılar ve gözenekler yoluyla bağlantılar oluştururlar. Sitoplazmaları çok sayıda organel içerir. Fagositoz, Kupffer hücrelerinin en önemli fonksiyonu olarak görülebilir. Pulmoner vasküler bazalındaki hücreler dışında, en büyük intravasküler fagositik kapasiteye sahiptirler. Diğer fonksiyonlar arasında (i) pinositoz, (ii) sinyal maddelerinin (örn. sitokinler, büyüme faktörleri, eritropoietin, eikosanoidler) veya proteinlerin ve/veya enzimlerin deşarjı ve (iii) toksinlerin, antijenlerin, antijen-antikor komplekslerinin ve pürinlerin temizlenmesi de fonksiyonlarına dahildir. Kupffer hücrelerinin fagositik fonksiyonu alkol ve ilaçlar (örn. mitomycin, α -methyldopa) sebebiyle azalabilir (Wake vd. 1989, Toth ve Thomas 1992, Smedsrød vd. 1994, Karpen ve Crawford 1999, Stockert ve Wolkoff 2001).

2.4.4 Ito hücreleri

Ito hücreleri (Stellat Hücreler veya Yıldızsı Karaciğer Hücreleri), yağ depolayan hücreler, karaciğer Stellat hücreleri veya lipositler olarak da bilinir. Uzun ince iplikçiklere sahip 5-10 μ m büyüklüğündeki bu hücreler, Disse boşluğunda yer alır ve çok sayıda sitoplazmik yağ damlacıklarının yanı sıra bol miktarda A vitamini (retinol ester) içerir. Şilomikronların retinol esterleri hepatositler tarafından emilir ve retinole hidrolize edilir. Hidroliz, Retinol Bağlayıcı Protein (RBP) vasıtasıyla kana geçirilir ya

da Ito hücrelerine taşınır ve depolanır. Ito hücrelerinin yağ damlacıklarında, karaciğer retinoidlerinin yaklaşık %75'i retinol esterleri formunda bulunur. Bu yağ damlacıkları Ito hücrelerinin karakteristik bir özelliğidir. Ito hücreleri toplam karaciğer hücre sayısının yaklaşık %3-8'ini ve karaciğer hacminin %1,5'ini oluşturur. Asinusun 3. zonu en yüksek sayıya sahiptir. Ito hücreleri, sinusendothelium'un genişliği, mikrovasküler sağlığı ve hücrelerin yenilenmesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Protein sentezi için çok sayıda filament ve organel içerirler. Ito hücreleri, kollajen tip I, III ve IV, fibronektin, laminin veya diğer maddeleri sentezleyebilir ve salgılayabilir. Fibroblastların aksine, Ito hücreleri desmin ifade edebilir. Bu nedenle fibrojenezde, özellikle patolojik intralobüler fibrozda önemli bir rol oynayabilirler (Tanuma vd. 1982, Gressner vd. 1990, Weiner vd. 1990, Stockert ve Wolkoff 2001).

2.4.5 Pit hücreleri

Pit hücreleri ilk olarak sıçanlarda sinüzoidal duvarda gösterilmiştir. Daha sonra, büyük granüllere ve çubuk şeklinde veziküllere sahip bu lenfositler insan karaciğerinde, özellikle sinüzoidlerde ve Disse boşluklarında tespit edilmişlerdir. Psödopodları nedeniyle morfolojileri değişkendirler. Pit hücrelerinin Kupffer hücrelerine oranı 2/10'dur. Doğal öldürücü hücrelerdir ve tümör hücrelerini veya yabancı hücreleri ve nekrozlanmış hücreleri yok ederler. Ek bir endokrin fonksiyonuna sahip olup olmadıkları açık değildir (Wisse vd. 1976, Vanderkerken vd. 1993, Karpen ve Crawford 1999, Stockert ve Wolkoff 2001).

2.4.6 Safra epitel hücreleri

Safra epitel hücreleri veya kolanjiyositler safra sistemine özgüdür. Tüm hepatik hücrelerin yaklaşık %3,5'ini oluştururlar. Bulundukları safra kanallarının boyutuna bağlı olarak, belirgin histolojik ve histokimyasal varyasyonlar gösterirler. Hepatositlerle karşılaştırıldığında, safra epitel hücreleri daha az mitokondri ve daha az endoplazmik retikulum içerir; Sitokrom P450'nin olmadığı bilinmektedir. Hücre iskeleti bakımından zengindirler ve golgi aygıtı ve veziküller içerirler. Yuvarlak-oval şekilli çekirdekleri bazal sitoplazmaya yakın bir şekilde konumlanmıştır. Bu safra hücreleri safra

oluşturmada (biligenesis) rol oynar (Traber vd. 1988). Ara safra kanallarının epitel hücreleri, karaciğer parankimi için kök hücreler olarak kabul edilir.

2.4.7 Hücre iskeleti

Protein liflerinden oluşan hücre iskeleti, formlarını ilgili gereksinimlere hızla adapte edebilen dinamik yapılardan oluşur. Hücrenin, taşıma işlemleri, organel hareketi, hücre polaritesi ve hücre bölünmesi genel organizasyonu için önemlidir. Hücre iskeleti aktin filamanları, mikrotübüller ve ara filamanlar içermektedir (Feldmann 1989). İplik benzeri aktin filamanları (mikrofilamentler) hepatositlerden yayılır, üç boyutlu bir ağ oluşturulur ve hücrenin hem biçimini hem de stabilitesini sağlar. Ayrıca kanaliküllerin mekanik işlevlerini desteklemenin yanı sıra mikrovillus ve fenestraların şeklinden sorumludur. Ek olarak, sitoplazmanın viskozitesini etkiler. Sitokalsin A, kanalikülerin lümen genişlemesi ile aktini depolimerize ederek kolestaz yapar; bu şekilde *phalloidin*, safra akışını hem stabilize eder hem de inhibe eder. Tübülinden oluşan tüp benzeri mikrotüpler ayrıca hücre içinde bir ağ oluşturur. Hücre altı substratların veya organellerin hedefli taşınmasına hizmet ederler ve hücre bölünmesinde yer alan mitotik mekanizmalar için önemlidirler. Ara filamanlar da tüp şeklinde bir yapıya sahiptir ve dengeleyici işlevlerine ek olarak muhtemelen malzemelerin hücre içi taşınmasına da hizmet ederler. Mikrotrabeküller ayrıca, enzimlerin de depolanabileceği üç boyutlu sitoplazmik bir ağ oluşturacak şekilde eğilim göstermektedir. Mikrotrabeküller dinamik bir kafes oluşturur ve bu şekilde tüm organeller, mikrotübüller ve filamanların yanı sıra nükleer ve hücre zarlarıyla bağlantılıdır. Çeşitli motor proteinler, hücresel ve hücre altı düzeyde çeşitli hareketliliklerden sorumludur. Bu, karaciğer hücresinin hayati fonksiyonel birimi olan sitoplazmanın hayati fonksiyonel ayrılmaz bir bütünü oluşturur (Feldmann 1989).

Doku mühendisliği açısından hücre iskeletinin rolü hücre dışı matriks ile ilişkilidir. Hücrelerin mikro çevreleriyle etkileşime girmesi gerektiği ve bu tür etkileşimin koordineli işlev ve hücresel homeostaz için çok önemli olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, hücrelerin gen düzenlemesine yol açan hormonları ve büyüme faktörlerini gibi

dış sinyalleri, hücre yüzeyi ile doğrudan temas yoluyla hücre dışı matriksten aldığı düşünülmektedir (Lelièvre vd. 1996).

2.5 Karaciğer Hücre Dışı Matriksi

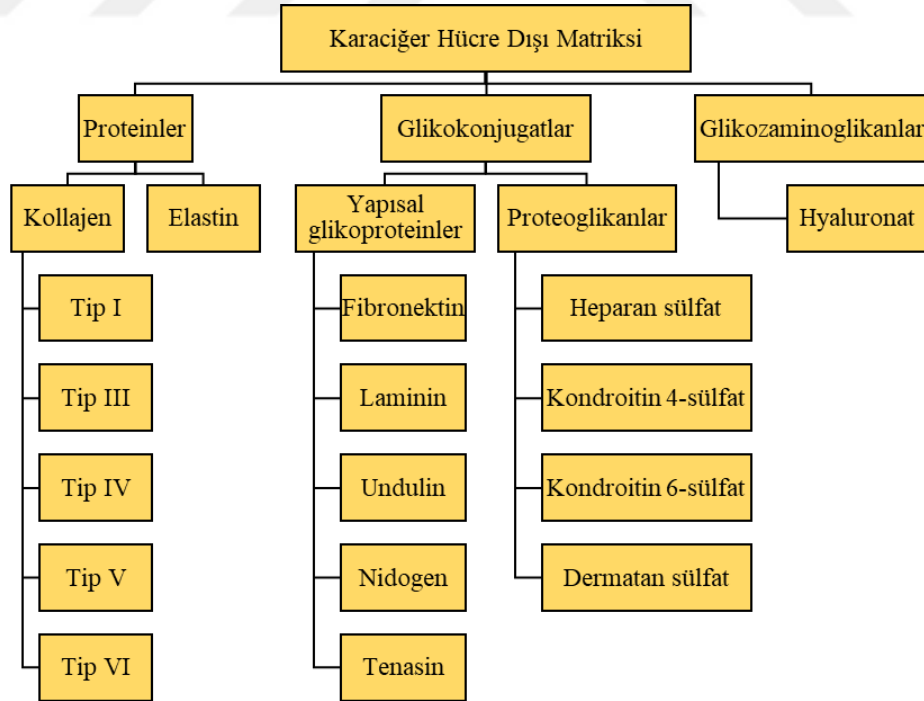
Bağlanma bağımlı hücreler, optimal hücre dışı matriks (HDM) ortamı olmadan fonksiyonel fenotiplerini kaybederler (Kim vd. 2011). Karaciğer doku mühendisliğinin temel amacı hepatositler için fizyolojik mikro ortamı taklit eden mekanik ve biyokimyasal destek sağlayan üç boyutlu (3B) bir ortam oluşturmaktır (O'brien 2011). Karaciğer rejenerasyonu için ideal bir ortam, parankimal/parankimal olmayan hücre-hücre teması ve hepatosit polarizasyonu için stabil bir sistem oluşturmak ve fonksiyonlarını *ex vivo* ortamda korumak için HDM ile etkileşimleri içermelidir (Hammond vd. 2006).

HDM, hücelere yapısal ve biyokimyasal destek sağlamak için hücreler tarafından salgılanan matriks moleküllerini ihtiva etmektedir. Bu matriks molekülleri, birbirine geçen lifli proteinler ve glikosaminoglikanlardan (GAG) oluşan bir ağdan oluşur. HDM, hepatositler için destek sağlar, salgılanan büyüme faktörleri için bir depo görevi görür ve hücre içi sinyal yollarını indükler. Böylece hücrelerin çevresine adaptasyonunu ve fonksiyon göstermesini sağlar. Karaciğer doku mühendisliğinde yapı iskelesi için biyomalzeme seçimi, hücrelerin hayatta kalması, proliferasyonu, göç ve farklılaşma gibi hücre davranışını etkilediğinden hepatosit davranışının belirlenmesinde kritik öneme sahiptir (Daley vd. 2008, Ishii vd. 2008, Uygun vd. 2012). HDM bileşimi dinamiktir ve dokunun ihtiyaçları ile belirlenir ve karaciğer rejenerasyonunu destekleyecek ideal iskele materyalini tasarlamak için HDM'nin doğal karaciğerdeki farklı gelişim aşamalarındaki rolünün anlaşılması gerekir.

HDM, karaciğer dokusu oluşumunun düzenlendiği embriyonik aşamada sürekli olarak matriks metaloproteinazlar ile yeniden modellenir (Rozario ve DeSimone 2010, Lu vd. 2011). Başlangıçta, karaciğer lobülü bazal membrana sahip değildir ve çoğunlukla fibronektin, bazı kollajen tip I ve az miktarlarda tip III, IV, V ve VI'dan oluşan zayıflatılmış bir HDM'si vardır. Erişkin karaciğerinde, matriks proteinlerinin

ekspresyonu hepatik bölgelere bağlı olarak değişir (McClelland vd. 2008, Wang vd. 2010). Periportal bölgelerde, matriks safra kanalında bol olan lamininlerden oluşur (Kikkawa vd. 2008), fibronektin ise Disse kanallarındaki en bol HDM proteinidir (Andez ve Amenta 1995, Wang vd. 2011, Mazza vd. 2015). Santral damara yakın olan matriksde kollajen tip I, IV ve VI'yı ve bunlara kıyasla az miktarda kollajen tip III, fibronektin, sindekanlar, ve nispeten yüksek oranda heparan sülfat proteoglikanlarını içerir (McClelland vd. 2008, Wang vd. 2011, Mazza vd. 2015). Elastin tüm karaciğer lobülünde eksprese edilir (Van Eyken 1990, Wang vd. 2010, Turner vd. 2011). Karaciğer boyunca dağılmış şekilde diğer HDM proteinleri arasında hyaluronan, entaktin ve kondroitin sülfat proteoglikanları bulunur (Roskams vd. 1995, McClelland vd. 2008, Turner vd. 2011). Özetle, karaciğerde tip I, III, IV, V ve VI dahil olmak üzere bir dizi kollajeni ihtiva etmektedir. Fibronektin, laminin ve tenascin dahil glikoproteinlerin yanı sıra; heparan sülfat, perlekan ve sindekan gibi proteoglikanlar da mevcuttur (Ueno vd. 2003) (**Çizelge 2.2**).

Çizelge 2.2 Karaciğer hücre dışı matriks elemanları



Karaciğer HDM'sinin bileşimi, yapısı ve fonksiyonu, hücre proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşması ve doku homeostazının sürdürülmesi için temel ipuçları sağlar (Faulk vd. 2014). HDM'deki kantitatif, topografik veya kalitatif herhangi bir değişikliğin karaciğer fonksiyonları üzerinde doğrudan bir etkisi vardır (Bedossa ve Paradis 2003) ve bu da düzensiz hücre proliferasyonuna, fibroz ve kanser gibi ciddi patolojik olaylara neden olan farklılaşmaya yol açar (Rozario ve DeSimone 2010, Lu vd. 2011). Zararlı ajanların (örn. virüsler, ilaçlar, alkol, otoantikolar, demir vb.) çeşitliliğine rağmen, karaciğer, doku onarımının dinamik bir mekanizması olan fibrojenez ile karakterize edilen çok standart bir yolla yanıt verir (Bedossa ve Paradis 2003). Tersinir koşullar altında fibrojenez, fibrozise ilerlemez. Orijinal karaciğer parankimi restore edilerek doku yeniden modellenmesi ve epitel rejenerasyonu ortaya çıkacaktır. Bu muazzam rejenerasyon kapasitesi, karaciğer hücrelerinin %80'inden fazlasının kaybından sonra bile karaciğeri restore edebilir (Bedossa ve Paradis 2003). Rejenerasyonda, hepatosit proliferasyonu vasküler proliferasyondan önce gelir ve geçici olarak sinüzoidleri olmayan hepatosit kümelerinin oluşmasına neden olur. Sonunda vasküler proliferasyon gerçekleşir ve normal hepatosit-vasküler ilişkileri süreci başlar. Bu süre zarfında, Ito hücreleri tarafından laminin sentezi belirgindir. Hepatositler stabil hale gelir gelmez, sinüzoit fenotipini koruyan faktörlerin sekresyonu devam eder ve laminin sentezi ve sekresyonu sona erer (Ueno vd. 2003). Öte yandan, zararlı ajan/ajanların uzun süre devam etmesi karaciğer fibrozisi ile sonuçlanır. Son aşama siroz ve fibrozis, herhangi bir kronik karaciğer hastalığının ayırt edici özelliğidir ve morbidite ve mortalitenin ana nedenidir.

Hücre membran proteini olan integrinlerin ligant gibi davranarak arjinin-glisin-aspartat (RGD) motifine reseptör ligant uyumu ile hücre adezyonu sağlaması doku mühendisliği iskelerinin tercihi için önem arz etmektedir. Genellikle HDM elemanlarından fibronektinler RGD sekansı bakımından zengin olduğu bilinse de vitronektin ve lamininde de tespit edilmiştir (Li ve Friedman 2003, Okazaki vd. 2003).

Karaciğer doku mühendisliğinde iskelenin mekanik özellikleri hepatik kök hücrelerin hepatosit soyuna farklılaşmasını kontrol eder ve primer sıçan hepatosit işlevselliğini (Lozoya vd. 2011, You vd. 2013) desteklediği bilinmektedir. Bir iskele içindeki

birbirine bağılı gözenekli ağlar, uzamsal olarak düzgün hücre dağılımı, hücre göçü, besinlerin ve gazların yayılması, daha iyi büyüme faktörü iletimi ve metabolik atıkların giderilmesinde önemli rol oynar (Hollister 2005, Huang vd. 2007).

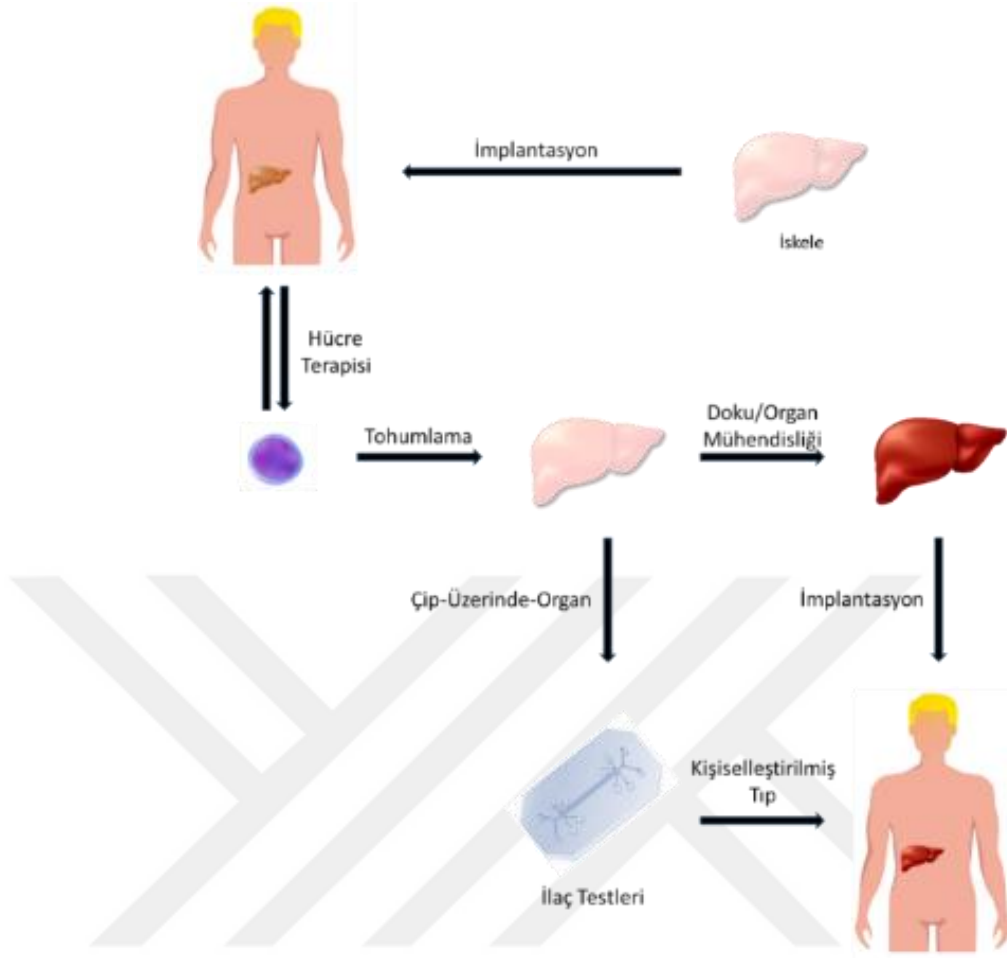
Bu gibi pek çok nedenden, geleneksel fabrikasyon metotlarına kıyasla *in vivo* ortama en yakın iskeletin üretiminde deselülerizasyon yöntemlerinin birçok avantajı bulunmaktadır. Doğal dokuyu en iyi şekilde taklit edebilmesi açısından birçok kompleks biyopolimerlerle üretilen iskelelerin kullanımı, dokunun kendisinden deselülerizasyon yöntemiyle elde edilecek bir iskeleden alınacak potansiyel verimi karşılamaya yetmeyebilir. En basit örneklerden biri RGD-integrin RGD-fibronektine kıyasla daha zayıf bir etkileşim kurduğu bilinmekte olup fibronektinin RGD domainlerindeki sekonder yapının hücre adezyonuna etkisi bilinmektedir (Fong ve Tirrell 2010).

2.6 Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği ve yenileyici tıp, biyoloji, biyokimya, fizik, kimya, uygulamalı mühendislik ve tıp da dahil olmak üzere çok sayıda bilimsel alandan bilgiyi birleştiren interdisipliner bir bilim dalıdır. Doku mühendisliği ve yenileyici tıp, insan vücudunun hasarlı kısımlarını, hücreler ve onları çevreleyen hücre dışı matriks gibi biyolojik dokuların spesifik yapı taşlarını kullanarak dokuyu yeniden inşa etmeyi amaçlamaktadır. Doku mühendisliği yaklaşımlarının çoğu, hastanın kendi hücrelerinin ekstraksiyonunu, amplifikasyonunu, spesifik bir fenotipe farklılaşmasını, biyouyumlu bir iskeleye tohumlama ve *in vitro* olarak dokuların büyütülmesinin ardından bir hastaya nakledilmesini içerir (Langer ve Vacanti 1993, Elçin 2008, Kaul ve Ventikos 2015). Diğer bir doku mühendisliği ve yenileyici tıp yaklaşımı, hastanın kendi hücreleri indüklenerek pluripotent özellik kazandırıldıktan sonra hasarlı doku veya organların onarılmasını içerir (Yamanaka 2009, Sancho-Bru vd. 2011).

Son yirmi yılda, doku mühendisliği ve yenileyici tıp alanındaki gelişmeler üstel büyüme yaşamıştır. Bugün, hem kapsam hem de ilgili araştırma ve translasyonel tıp anlamındaki

abalar da artmaya devam etmektedir (Atala vd. 2006). Doku mühendisliği ile ilgili araştırma makaleleri çok sayıda disiplini kapsayan dergilerde bulunabilmektedir. Birkaç doku mühendisliği ürünü, özellikle deri yamaları, hastaları tedavi etmek için halihazırda kullanılmakta ve birçoğu klinik araştırmalara girmektedir (Parmaksiz vd. 2016). Doku mühendisliğinin tedavi etmeyi amaçladığı hastalıklara örnek olarak osteoporoz, diyabet, kalp hastalığı, karaciğer hastalıkları, iskelet bozuklukları, omurilik yaralanmaları, böbrek yetmezliği, venöz eksiklik ve diğer birçok ölümcül veya henüz tedavi edilememiş bazı hastalıklar gösterilebilir. Doku mühendisliğinin ilk uzun vadeli hedefi, hasarlı bir organı, hastanın kendi hücrelerinden oluşturulan yeni, daha güçlü bir organla değiştirmektir (Langer ve Vacanti 1993, Kaul ve Ventikos 2015). Aslında, bugün itibariyle deri, kıkırdak, damarlar ve kemik gibi çeşitli dokuların basit formları zaten oluşturulmuştur. Bu sebeple doku mühendisliği ile kalp, karaciğer, böbrekler veya akciğerler gibi daha karmaşık doku ve organlar oluşturma çabaları devam etmektedir. Transplantasyona uygun yeni organların mühendislik çalışmaları için araştırma ve geliştirme çabalarına ek olarak, doku mühendisliği alanı birkaç tamamlayıcı yöne dallanmıştır. Bunlardan biri olan, hastanın kendi hücreleri kullanılarak ilaçları test etmek için üretilen mikro doku veya organoidler, yeni bir küresel endüstri oluşturmaktadır. İkincisi, ip-üzerinde-organ veya birden fazla birbirine bağlı tasarlanmış doku ve organlar, ip-üzerinde-insan olarak adlandırılır (Elçin 2017). Bu yönleri ile doku mühendisliği, kişiselleştirilmiş tıp alanında büyük umut vadetmektedir (**şekil 2.5**). Kök hücre temelli tedaviler, 3B biyobasım ve deselülerize yapı iskelelerinin implantasyonu, hızla genişleyen doku mühendisliği ve yenileyici tıp alanının diğer dallarıdır (Vurat 2020a). Yeni ortaya çıkan doku mühendisliği dalları, kontrollü ilaç salımı için enjekte edilebilir hidrojellerin kullanımını ve 3B tümör modelleri oluşturmak için doku mühendisliği araçlarının kullanımını içerir. Bunun nedeni, yapılan çok sayıda çalışma, antikanser ilaçlara yanıtın, hücreler 3B ortama kıyasla 2B ortamda kültüre alındığında, çok farklı olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, doku mühendisliği yaklaşımlarını kullanarak *in vitro* 3B tümör modelleri oluşturmak, yeni antikanser tedavilerinin test edilmesini ve geliştirilmesini büyük ölçüde hızlandırabilir ve önemli bir potansiyele sahiptir (Wang ve Wang 2014).



Şekil 2.5 Kişiselleştirilmiş tıbbın uygulanma şekline dair temsili şema

Ex vivo olarak biyomühendisliği yapılmış ve daha sonra insan vücuduna implante edildiği bildirilen ilk tam-organ mesanedir. Postoperatif olarak, bu tür doku mühendisliği ile üretilen mesanenin, uygun üç katmanlı bir yapı ortaya koyduğu ve hiçbir yan etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Atala vd. 2006). Bununla birlikte, takip eden çalışmalar benzer şekilde oluşturulan mesanelerin önemli eksikliklerini ortaya koymuştur. Günümüzde mesane, trake ve deri gibi nispeten ince, çok katmanlı organların yanı sıra kalp, karaciğer veya akciğer gibi daha büyük ve daha karmaşık organların doku mühendisliği aktif bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir. Devam eden çabalar arasında, doku yapılarının boyutunun büyütülmesi, kan akışının iyileştirilmesi, hücre yoğunluğunun artırılması ve mekanik özelliklerinin ayarlanması bulunmaktadır. Bu zorlukları sistematik ve tutarlı bir şekilde ele alarak, doku

mühendisliği alanı hastalıklı organları ve dokuları tedavi etme konusundaki orijinal vaadini yerine getirebilecektir.

2.6.1 Karaciğer doku mühendisliği

Hayati bir organ olan karaciğer, protein sentezi ve zenobiyotik metabolizmasında önemli bir rol oynar. Karaciğerin yüksek derecede rejeneratif kapasitesi olmasına rağmen, ilaçlar, toksinler, viral enfeksiyonlar, metabolik bozukluk, alkol tüketimi, kanser veya yaralanmada kalıcı doku hasarı ve karaciğer fonksiyon bozukluğuna neden olabilmektedir. Bu durumlar da son aşama karaciğer hastalığına yol açar veya hızla akut karaciğer yetmezliğine sebep olmaktadır (Itoh ve Miyajima 2014). Hastaların hayatlarını kurtarmak için karaciğer nakli sıklıkla uzun süreli terapötik etkinlik için kullanılan bir yöntemdir, ancak bu yöntem immünolojik olarak uygun donör eksikliği ile sınırlı kalmaktadır (Duan vd. 2013, Shi vd. 2017). Ayrıca, hastaların sağlık koşullarını kaçınılmaz olarak kötüleştiren ve sağlık bakım maliyetini artırmakla birlikte, hastalarda kısa süreli ve uzun süreli immün-baskılama uygulanması ve sürdürülmesi gerekmektedir. Karaciğer transplantasyonu ile karşılaştırıldığında, daha az invaziv olan ve tekrar tekrar yapılabilen hepatosit transplantasyonu akut karaciğer yetmezliğinin tedavisinde kullanılmış bir yöntemdir. Bununla birlikte, bu yöntem uzun süreli karaciğer fonksiyonlarını geri getirememektedir (Palakkan vd. 2013). Bu nedenle, uzun süreli hepatik fonksiyonel restorasyon için transplante edilebilir mikro dokuları veya biyomühendislik ile elde edilen kısmi veya tüm karaciğeri sağlamak için karaciğer doku mühendisliği yaklaşımları dikkat çekmektedir. Şimdiye kadar, karaciğer doku mühendisliği, transplante edilebilir karaciğer mikro dokularını (Takebe vd. 2013, Ma vd. 2016) veya biyomühendislik ile elde edilen tüm karaciğeri (Uygun vd. 2010, Baptista vd. 2011) üretmek için son on yılda önemli ölçüde ilerleme kaydetmiştir.

Hücrel tedavi seçenekleri bakımından incelendiğinde, primer hepatositlerden indüklenmiş pluripotent kök hücrelere (iPKH'ler) kadar çeşitli hücreler çok sayıda çalışmada ele alınmıştır. Bu tip hücreler hücre kültürüne uygundur ve allojenik transplantasyon için immünolojik uyumluluğa sahiptirler.

Biyomateryal olarak, jelatin metakroil (GelMA) ve polietilen glikol (PEG), kök hücre farklılaşması ve hepatosit olgunlaşması için gerekli olan uzamsal mimariler ve mekanik ipuçları sağlamak için gerekli olan 3B HDM yapımında kullanılmaktadır. Biyofiziksel ve çözünür faktörlerin hassas ayarı ve kök hücrelerden üretilen karaciğer mikro dokularının domuzlarda (Shi vd. 2017) ve farelerde (Du vd. 2014, Sakai vd. 2015) gelişmiş karaciğer fonksiyonları sergilediği gösterilmiştir. Karaciğer mikro dokularının yanı sıra, biyomühendisliği yapılmış tüm karaciğer de klinik olarak çekici olmuştur ve bu alanda yapılan öncü araştırmalar, hücreleştirilmiş tüm karaciğerin, uyarılmış karaciğer yetmezliği olan hayvanların tedavisi için fonksiyonel hepatositlerle yeniden kullanılabileceğini göstermiştir (Uygun vd. 2010, Baptista vd. 2011).

Karaciğer doku mühendisliğinin yanı sıra, biyoyapay karaciğer (BYK) cihazları (Lu vd. 2016) ve çip-üstü-karaciğer platformları (Esch vd. 2015, Zhu vd. 2016) gibi yenileyici tıp temelli stratejiler esas olarak ekstrakorporeal destek sağlamak ve farmakolojik testler için geliştirilmiştir (Huh vd. 2011, Bhatia ve Ingber 2014). BYK'ler metabolik atıkları gidermek için kan diyalizi prensibine dayanarak, karaciğer transplantasyonu bekleyen hastaların karaciğer fonksiyonlarını regüle etmek için fonksiyonel hepatositlerle birleştirilmiş sistemlerdir (Bañares vd. 2013). BYK'nin hastalar için sunduğu ekstrakorporeal desteğin, klinik çalışmalarda karaciğer hastalığı olan hastaların tedavisi üzerinde faydalı etkiler sağlayabileceği klinik olarak kanıtlanmıştır (Bañares vd. 2013). BYK cihazlarının aksine, çip-üstü-karaciğer platformları, besinlerin ve büyüme faktörlerinin zamansal ve uzamsal dağılımını hassas bir şekilde kontrol etme ve ayrıca perfüzyon altındaki hücrelere fizyolojik uyaranlar sağlama yeteneği ile entegre edilmiş minyatür mikro ölçekli cihazlardır (Huh vd. 2011, Bhatia ve Ingber 2014). Hücrelerin türüne, iskelelere, büyüme faktörlerine ve biyomekanik uyaranlara bağlı olarak, çip-üzeri-karaciğer, hastalık modelleme, kök hücre farklılaşması, ilaç taraması, toksisite testi ve benzeri gibi birçok uygulama için uyarlanabilmektedir. Açıkça bu iki tip cihaz, karaciğer yenileyici tıbbi ile ilgili klinik ve temel araştırmaları önemli ölçüde etkilemiştir.

2.6.2 Karaciğer doku mühendisliğinde biyomalzemeler

İskelelerin gözenek boyutu ve gözenekliliği, büyüme faktörlerinin yayılmasında önemli bir rol oynar ve vaskülerizasyonu indükler. Nitekim bu yolla karaciğere özgü fonksiyonların korunmasına yardımcı olurlar. Gözenek büyüklüğü, oksijen ve besin maddelerinin, iskelenin iç kısımlarına toplu olarak taşınmasını kontrol eden, böylece bölgedeki hücresel büyümeyi destekleyen önemli bir faktördür (Ma vd. 2007). Gözenek boyutu 500 μm 'den büyük olduğunda yüzeyleri tanımadığından hücreler göç etmez ve bu nedenle hepatositlerin kültürü için gözenekler arası bağlantıya sahip gözenek boyutu 50 ila 150 μm arasında değişen gözenekli yapı iskeleleri arzu edilir (Wu vd. 2007). Gözenekli yapı iskeleleri, yeterli hücre tohumlama ve çoğalması için gerekli olan, hepatositlerin bağlanması için yüksek yüzey/hacim oranı sağlar. Ayrıca, hepatositler diğer hücrelere kıyasla 5 ila 10 kat daha fazla oksijen tükettikleri için besin transferi, oksijen ve diğer metabolitlerin değişimlerini gerçekleştirirler (Park 2002, Park ve Bae 2002). 2B tek tabakalı koşullarda kültürlendiğinde hepatositler, hızla farklılaşma ve kültür prosesi sırasında glukoneogenez gibi karaciğere özgü işlevlerini kaybetme eğilimindedirler (Wen vd. 2009). Bu nedenle, yüksek hücre yoğunluğunda 3B kültürlenmesi, doku rekonstrüksiyonu için 2B sistemle karşılaştırıldığında farklı fonksiyonları için hepatositler arasındaki etkileşimi ve iletişimi artıracak için gereklidir.

İskele yüzey kimyası da hücre yapışmasını, çoğalmasını ve fonksiyonlarını etkiler. Yapılan bir çalışmada UV polimerizasyonu ile hazırlanan poli(etilen glikol) (PEG) hidrojel üzerindeki hücre canlılığı, zayıf hücre-hücre etkileşimi nedeniyle üç gün içinde azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, hepatositlerin fibroblastlarla birlikte kültürünün, parakrin ve hücre teması aracılı sinyallerin birleştirici etkisi nedeniyle fonksiyonların korunmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (Underhill vd. 2007). Arginin-Glisin-Aspartat (RGD) amino asitleri ile modifiye edilen PEG hidrojelleri ise karaciğere özgü fonksiyonların beş güne kadar artışı gözlenmiştir (Underhill vd. 2007). Bir başka çalışmada solvent dökümü ile hazırlanan tip I kollajen kaplı poli(sülfonat) süngerleri (PS) üzerinde hücre farklılaşması, sadece PS'ye kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Kinasiewicz vd. 2007). Böylece hücre adezyonu, iskele yüzeyine hücre

yapışmasına spesifik ligandların dahil edilmesiyle desteklenebildiği ve hepatosit adezyonu ve proliferasyonunu arttırdığı bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada, kitosan/jelatin (KJ) mikro taşıyıcıların kullanımı ile agregat formunda hücrelerin geniş hücre-hücre iletişimi nedeniyle hepatosit canlılığını ve işlevini on beş güne kadar sürdürdüğü gösterilmiştir (Li vd. 2004). KJ mikro taşıyıcılarının kitosan bileşeni, doğal hepatik matrikse benzerliği nedeniyle, farklılaşmış karaciğer fonksiyonlarının korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu, kollajen kaplı kitosan taşıyıcılara kıyasla daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır (Li vd. 2004). Başka bir çalışmada ise kollajen kaplı poli(L-laktik asit) temelli elektroegirme yoluyla üretilmiş nanofiberlerin, daha az hücre teması, daha düşük hücre adezyonu ve migrasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Buna rağmen hizalanmış nanofiberlerin, tek yönlü göç ve en az hücre temas alanı ve en düşük yapışma ile ağa kıyasla daha fazla agregasyon gösterdiği raporlanmıştır (Feng vd. 2010). Lif oryantasyonu toplanma sağlamamıştır ve hücre fonksiyonu yedi gün sonra kaybedilmiştir. Bu da fiziksel özelliklerinin hepatosit büyümesini desteklemek için yeterli olmadığını düşündürmektedir. Başka bir çalışmada, elastin benzeri polipeptit (EBP) filmlerinin polietilen imid (PEI) veya poliakrilik asit (PA) gibi polielektrolit (PE) ile modifiye edilmesi, primer sıçan hepatositlerinin morfolojisini ve farklılaşmasını etkilediği gösterilmiştir. Hepatositlerin, doğal bir HDM proteini olan elastin varlığı nedeniyle ELP-PEI ve ELP-PA yüzeylerinde sferoidler oluşturduğu gözlenmiştir (Janorkar vd. 2008). Bu nedenle, hücre çoğalmasını başlatan ve karaciğere özgü fonksiyonları sürdüren hücre tanıma motifleri ve sinyalleri sağlayabilen uygun bir iskelenin geliştirilmesi önemlidir. Karaciğer doku mühendisliği uygulamaları için sentetik polimerlerin kullanımı, hücre adezyonu iskelelerin kilit bir fonksiyonu olduğu için hepatosit bağlanmasına yardımcı olan hücre tanıma motiflerinden yoksun oldukları için sınırlıdır (Chen vd. 2002). Bu nedenle doğal polimerlerle kompozitlerinin veya doğrudan doğal polimerlerin kullanımı karaciğer doku mühendisliğinde çok büyük bir avantaj sağlamaktadır.

2.6.3 Karaciğer doku mühendisliğinde kök hücreler

Kök hücreler kendi kendini yenileme özelliğine sahiptir ve hepatositlerin hücre kültüründeki fonksiyonunu korunmasında karşılaşılan zorlukların üstesinden gelme

potansiyelini taşımaktadırlar. Yapılan bir çalışmada, insan embriyonik kök hücrelerinin (iEKH'lerin) üç aşamalı bir süreçte hepatik hücelere farklılaştığı ve oluşan karaciğer hücrelerinin karaciğere özgü belirteçleri ve karaciğere spesifik fonksiyonları eksprese ettiği gözlenmiştir. iEKH'lerin hepatik hücelere farklılaşması sürecinde, EKH'de endoderm farklılaşmasını indükleyen aktivin A ile muamele edilmiş, ardından fibroblast büyüme faktörü-4 (FGF-4) ve kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2) eklenerek hepatik endodermin morfogenetik büyümesi ve farklılaşması başlatılmıştır (Cai vd. 2007).

Mezenkimal kök hücrelerin (MKH), farklılaşma kabiliyetleri ve sınırlı ömürleri ile bilinir ve bu nedenle insan göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerini (iUKMKH'ler), telomeraz katalitik alt birim geni taşıyan lentivirüs vektörü ile transdüksiyona tabi tutularak hepatosit farklılaşması indüklenebilmektedir. Liang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, transfekte edilmiş hücrelerin, MKH'ye benzer morfolojiyi koruduğu ve hepatik farklılaşma ortamında kültürlendiğinde hepatositlere farklılaştığını ve karaciğere spesifik belirteçleri eksprese ettiğini göstermişlerdir (Liang vd. 2011).

Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AKMKH'ler), endodermal/erken hepatik farklılaşma evresine aittir ve MKH özelliklerine sahiptir ve transplantasyon yollarına bağlı olarak karaciğer fonksiyonlarını iyileştirdiği bilinmektedir. AKMKH'ler cerrahi işlemde kolayca elde edildikleri ve kök hücrelerin verimi yüksek olduğu ve *in vitro* olarak rahatça kültür edilebildikleri için tercih edilirler. Adipoz stromal hücreler, HGF, TGF, VEGF, IL-6, granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör salgırlar. AKMKH'ler kısa bir süre içinde akut karaciğer hasarı olan farelerde karaciğer fonksiyonunu geliştirdiği bildirilmiştir. Periferik ven yoluyla hücrelerin transplantasyonu, diğer yollardan transplantasyondan daha belirgin bir karaciğer fonksiyonuyla sonuçlanmıştır (Kim vd. 2011). Bunun yanı sıra AKMKH'lerin hepatik kökene farklılaştırılarak deselülerize HDM iskeleleriyle kullanımı da raporlanmıştır (Lee vd. 2014).

İnsan göbek kordonu matriks kök hücreleri (iUKMKH) büyüme faktörlerine ve hepatojenik ortama maruz kaldığında mezodermal ve ektodermal soylara farklılaşarak,

hücrelerin granüler sitoplazma ile poligonal morfoloji benimsediği ve hepatik belirteçleri ifade ettiği gösterilmiştir. Hücreler subkütan olarak ağır kombine immün yetmezliği olan farelere aktarılmış, transplantasyondan altı hafta sonra hiçbir ölüm gözlenmeyip farelerde insan karaciğer hücreleri de saptandığı; ara filaman protein ekspresyonunun transplantasyondan iki hafta sonra gözlemlendiği ve böylece hücrelerin hepatik kökene farklılaştığı gösterilmiştir (Campard vd. 2008).

İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH'ler), Yamanaka faktörleri olarak tanımlanmış transkripsiyon faktörlerinin transdüksiyonuyla fare ve insan yetişkin somatik hücrelerinden yeniden programlanarak elde edilen yeni nesil kök hücre popülasyonlarıdır (Okita vd. 2007). Çalışmalar iPKH'lerin morfoloji, proliferatif yetenek, yüzey antijenleri, gen ifadeleri, pluripotent hücreye özgü genlerin epigenetik durumu ve telomeraz aktivitesinde EKH'lere benzer olduğunu göstermiştir (Yamanaka 2009). Hem insan hem de fare iPKH'lerinin *in vitro* fonksiyonel hepatositlere etkili bir şekilde farklılaşabileceğini gösterilmiştir (Sancho-Bru vd. 2011). iPKH'lerin iPKH-hepatosit benzeri hücrelere farklılaşması gerçekleştirilmiş ve karaciğere özgü belirteçlerin ekspresyonu gözlenmiştir. Bunlar intravenöz transplantasyon ile karaciğer hasarlı farelere transplante edildiğinde hepatik fonksiyonları, motor aktiviteyi ve mortalite oranını önemli ölçüde geliştirmiştir. Bütün bu çalışmalar iPKH'lerin aktivitesinin MKH'lerin aktivitesine benzer olduğunu ve bu hücrelerin gelecekte karaciğer yetmezliğine karşı hücre temelli tedaviler için tercih edilebileceği savunulmuştur (Chiang vd. 2011). Aynı zamanda doku mühendisliği çalışmalarında da son yıllarda sıkça tercih edilmektedir.

2.6.4 Biyolojik bir iskele olarak hücre dışı matriks

Allojenik karaciğer transplantasyonu, son evre karaciğer hastalığı olan hastalar için altın standarttır. Ancak yüksek maliyeti ve şiddetli donör organ yetersizliği ile sınırlıdır (Fuhrman vd. 2006). Hem zenotransplantasyon hem de hepatosit transplantasyonu alternatif tedavileri temsil etmektedir ancak bu yaklaşımların klinik başarısı sınırlıdır. Zenotransplantasyon sınırsız sayıda verici organ temini sağlayabilir; bununla birlikte, önceki girişimler hiperakut ret ve ölümle sonuçlanmıştır. Hepatosit transplantasyonu,

karaciğerin genetik kusurları gibi acil olmayan durumların düzeltilmesi için umut vaat etmekle birlikte düşük aşılama etkinliği, allojenik hücrelerin kullanımından, uzun süreli immün-baskılama ve nakledilen hepatositlerin *in vivo* ortamda fonksiyonel hale gelmesi için 48 saatlik bir gecikme süresi klinik başarıyı sınırlandırmaktadır (Bonavita vd. 2010, Fiegel vd. 2008). Bununla birlikte, biyoyapay karaciğer cihazları (BYK), allojenik karaciğer nakli bekleyen hastalar için geçici destek sağlar. Bununla birlikte, güvenilir bir hücre kaynağının olmaması, BYK'nin hepatositlerin işlevselliğini uzun süre sürdürememesi ile birlikte klinik faydasını sınırlamıştır (Diekmann vd. 2006).

Allojenik veya zenojenik HDM'den oluşan biyolojik iskeleler çeşitli dokuları yeniden yapılandırmak için hastalarda denenmiştir. HDM, mikro ortamdaki değişikliklere yanıt olarak yerleşik hücrelerle dinamik bir iletişim halindedir ve hücre göçü, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve konakçı doğal bağışıklık yanıtın modülasyonu gibi doku mühendisliğinin temel fenomenlerini sağladığı gösterilmiştir (Valentin vd. 2006, Crisan vd. 2008, Beattie vd. 2009).

Deselülerize HDM iskelesinin oluşturulmasında nihai hedef, doğal HDM altyapısını ve bileşimini koruyarak bir kaynak doku veya organın deselülerizasyonunu içerir. Doku hücresizleştirme tekniklerinin gözden geçirilmesi ve bunların HDM özellikleri üzerindeki etkileri ve tüm organlara uygulama için sürekli olarak yeni tekniklerin geliştirilmesi halen araştırılmaktadır (Agrawal vd. 2010).

Biyolojik iskele malzemeleri tipik olarak her zaman olmamakla birlikte cerrahi yamalar olarak kullanılan tıbbi ürünler olarak pazarlanmaktadır (**Çizelge 2.3**). HDM'den oluşan klinik ürünler, insan, domuz, sığır ve at gibi çeşitli türlerin dokularından izole edilerek üretilmektedirler. Akciğer, böbrek ve karaciğer gibi kompleks organlarda, tam-organların fonksiyonel rekonstrüksiyonu için dokuya özgü iskelelerin gerekli olduğuna dair kanıtlar vardır. Buna rağmen, biyolojik iskelenin doku özgülüğü, iskelet kası, özofagus ve idrar kesesi gibi birçok dokunun rekonstrüksiyonu için gerekli gibi görünmemektedir (Kropp vd. 1995, Nieponice vd. 2009, Mase vd. 2010). dHDM iskelelerinin fonksiyonel olması ve doku yeniden modellenmesi: hücre mitogenezi ve kemotaksi, hücre farklılaşması ve konakçı bağışıklık tepkisinin modülasyonu üzerinde

olumlu etkileri içerir. HDM'nin üç boyutlu alt yapısı, yüzey topolojisi, yüzey ligand düzenlenişi ve kompozisyonunun bu yapıcı etkilere katkıda bulunması muhtemeldir (Brown vd. 2009).

Çizelge 2.3 Ticari olarak kullanılan cerrahi yamalar (Badylak 2007)

Marka/Ürün	Kaynak	Kullanım şekli	Kullanımı
Wright Medical Tech/Graft Jackets®	İnsan derisi	Kuru	Ayak ülseri
Molnlycke/ Xelma™	HDM+PGA	Jel	Venöz bacak ülseri
TEI Biosciences/PriMatrix™	Fetal Sığır Derisi	Kuru/Şerit	Yara tedavisi
Pegasus Biologicals/OrthADAPT™	At Perikardiumu	Çapraz bağlı	Ortopedide yumuşak dokunun güçlendirilmesi, onarımı ve rekonstrüksiyonu
Healthpoint/Oasis®	Domuz SIS	Şerit/Kuru	Kısmi ya da tam kalınlıktaki yaralarda/ Yanıklarda
DePuy/Restore™	Domuz SIS	Şerit	Yumuşak dokuların güçlendirilmesi
Cook SIS/Stratasis®	Domuz SIS	Şerit/Kuru	İdrar kaçırma tedavisi
Arthrotek/CuffPatch™	Domuz SIS	Şerit/Nemli	Yumuşak dokuların güçlendirilmesi

2.6.5 Hücre dışı matriks iskelelerine ilk yanıt

Makrofajlar, implante edilen biyomalzemelere karşı immün yanıtta önemli bir rol oynayan heterojen mononükleer fagositlerin bir alt kümesidir. Bir biyomateryalin implantasyonunu takiben immün yanıt katılan makrofajlar, implante edilen bölgede bulunan hücreler, biyomateryallerden salgılanan bozunma ürünleri, sitokinler ve efektör moleküller gibi uyaranlara maruz kalırlar. Makrofaj popülasyonları, sitotoksik/pro-inflamatuar tip (M1, “klasik olarak aktif” makrofajlar olarak adlandırılır) veya yara iyileşmesi/anti-inflamatuar tip (M2, “alternatif olarak aktiveleştirilen” makrofajlar olarak adlandırılır) olarak adlandırılan bir spektrum boyunca fenotipik ve fonksiyonel olarak

sınıflandırılabilir (Gardner vd. 2013). HDM iskelelerinin implantasyonuna yanıt olarak sitokin ekspresyonunun baskın bir M2 ve Th2 tepkisi ile tutarlı olduğu gösterilmiştir. Kısaca, *in vivo* olarak iskele biyobozunması ve yeniden şekillendirme için makrofajların M1 fenotipi yerine M2 yönü baskın gelmektedir. Bu durum skar dokusunun oluşmayıp, makrofajların hasarlı doku rejenarasyonundaki pozitif rolünü ortaya çıkarmaktadır (Cravedi vd. 2017).

2.6.6 Hücre dışı matriksin biyobozunması

Çoğu dHDM iskelesinin *in vivo* olarak biyobozunmasının hızlı gerçekleştiği bilinmektedir. Yapılan bir çalışma, köpek aşil tendon onarımı modelinde Karbon-14 işaretli HDM iskelelerinin implantasyondan 30 gün sonra %60 ve ameliyattan 90 gün sonrasında ise %100 yıkıma uğradığı göstermiştir. Bu süre zarfında, iskele konakçı hücreler tarafından doldurulmuş ve yıkıma uğratarak bölgeye özgü fonksiyonel konakçı dokusunun oluşmasıyla sonuçlanmıştır (Gilbert vd. 2007). Bozunan iskelenin ana atılım mekanizması, hematojen dolaşım ve renal yolla eliminasyon olduğu bilinmektedir. Son bulgular, HDM iskelelerinin bozunma ürünlerinin biyoaktif olduğunu göstermektedir. HDM bozunma ürünlerinin biyolojik etkilerinden biri, konakçıya ait dokuya özgü kök ve progenitor hücrelerin, biyobozunmanın gerçekleştiği bölgeye doğru göç etmesidir (Reing vd. 2009). Bu nedenle, dkHDM sadece konağın immün tepkisini modüle etmekle kalmaz, aynı zamanda biyolojik bir iskele de endojen progenitor hücrelerin fonksiyonel karaciğer dokusunun rekonstrüksiyonuna katkı sağlamasına da aracılık eder. Böylece 3B dkHDM iskelelerinin de hızla bozunması ve yerini tohumlanmış hepatositlerin ve beraberindeki yerleşik hücrelerin salgıladığı yeni matriksin alması temel hedef olarak ortaya çıkar.

2.7 Deselülerizasyon

Deselülerizasyon, hücrelerin, bir dokudan veya organdan bertaraf edilerek hücre dışı matriksi (HDM) oluşturan yapısal ve fonksiyonel protein içeriğinin doku mühendisliği iskeleleri meydana getirilmesi amacıyla gerçekleştirilen bir yenileyici tıp yöntemi olarak ortaya çıkar (Gilbert vd. 2006). Stephen F. Badylak Pittsburgh Üniversitesi

McGowan Yenileyici Tıp Enstitüsü'nde hücreleştirme sürecine öncülük etmiştir ve yöntem günümüzde öncü çalışmalarıyla yenileyici tıpta önemli bir yer tutmaktadır.

Deselülerize matriksin kimyasal bileşiminin, nano/mikro yapısının veya mekanik özellikleri açısından değerlendirildiğinde *de novo* sentezlenmesi mümkün olamamaktadır. Doku/organların hücreleştirilmesi, böyle karmaşık bir yapının *de novo* sentezlenmesinin zorluğu nedeniyle genellikle gereklidir (Spector 2016).

HDM'ler, her doku ve organın yerleşik hücrelerinin salgılanan ürünlerini temsil eder, mikro ortamdaki değişikliklere yanıt olarak bu hücrelerle dinamik bir iletişim içindedir ve hücre göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını etkileyen ipuçları sağladığı gösterilmiştir (Crapo vd. 2011). Hücreleştirilmenin ana hedeflerinden biri, zenojenik doku ve organların, hücre kültürü ile üretilen matrikslerin, matriks moleküllerinin yanı sıra yerleşik düzenleyici moleküllerinin en etkili biçimde muhafaza edilmesidir.

Günümüzde deselülerize HDM'lerden elde edilen biyolojik iskeleler, çeşitli rekonstrüktif cerrahi uygulamalar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Son dönemlerde ise doku/organ replasmanı için yenileyici tıp stratejilerinde giderek daha fazla uygulama alanı bulmaktadır.

Doğal olarak elde edilen materyallerin klinik ve klinik öncesi kullanılması, sentetik materyallerin kullanımına göre bir takım avantajlar sağlamaktadır. Birincisi ve en önemlisi, doğal olarak elde edilen materyaller içinde bulunan ligandlar ve biyoaktif bileşenlerdir. Doğal olarak türetilmiş materyaller memeli dokularından alındığında bu ligand bağlanma bölgeleri genellikle yüksek oranda korunur. Bununla birlikte, bitki, böcek ya da kabuklulardan (*crustacea*) elde edilen bazı diğer doğal malzemelerin memeli proteinlerine benzer kimyasal bileşimlere sahip olduğu ve benzer avantajlar sağladığı bilinmektedir (Kurita 2006). İkincisi, konağın malzemeyi verimli bir şekilde biyobozunmasını sağlaması ve işleme tabi tutma kabiliyetidir ve birçok sentetik polimerin bu açıdan immün tepkiden kaçtığı görülmüştür. Bununla birlikte, birtakım dezavantajlar, doğal olarak türetilmiş malzemelerin kullanımı ile de ilişkilidir. Bu dezavantajlar arasında potansiyel immünojenisite, elde edilen dokunun kaynağından

kaynaklanan biyolojik değişkenler ve tıbbi uygulamalarda materyalin başarısı veya başarısızlığı ile ilişkili mekanizmalar açısından önemli karmaşıklıklar bulunmaktadır (Lopresti ve Brown 2015).

Tıbbi uygulamalarda doğal olarak elde edilen biyomalzemelerin kullanım tarihi uzundur. Zenojenik deri greftlerinin kullanımı M.Ö. 15. yüzyılda Ebers Papirüsünde belirtilmiştir. Daha sonra araştırmalar, tarihte Mısırlıların hayvanın lifsi sinir dokularını dikiş malzemesi olarak kullandıklarını göstermiştir. Bu malzemeler iki bin yıldan fazla bir süre önce kabul edilebilir olsa da zenojenik ve allojenik dokudan türetilmiş materyallerin başarısı, implantasyonu takiben immünojenik yanıtla bağlı olarak sınırlandırıldığı bilinmektedir (Watson ve Dark 2012). Bunların dışında, yaygın olarak, mevcut tıbbi uygulamalarda kullanılan doğal malzemelerden köken alan dHDM'ler memeli dokusunun hücre dışı matriksinden elde edilebilir. Bununla birlikte, kabukluların dış iskeletlerinden veya bakteri kaynaklarından elde edilen biyomalzemeler de mevcuttur. **Çizelge 2.4'**de günümüzde çalışılan, doğal olarak türetilmiş çeşitli materyaller listelenmektedir, ancak listelenen materyallerin çoğu implantasyonun aksine geçici veya topikal kullanım için tasarlanmış olması dikkat çekmektedir. (Lopresti ve Brown 2015).

Teşhisteki ilerlemeler, hastalıklı organın çıkarılması ve sağlıklı olan organla değiştirilmesi yoluyla önleyici olarak çok erken tedavi edilebilecek ölümcül veya zayıflatıcı hastalıkların tanımlanmasına izin verdiği için organ nakli talebinin daha da artması beklenmektedir. Bununla birlikte, organ nakli için çok büyük ve artan talebe rağmen, bu talebi karşılayacak organların tedariki kayda değer bir artış göstermemiştir. Bu organ ve doku yetersizliği, maalesef hastaların küçük bir yüzdesinin nakil alması nedeniyle çok önemli bir halk sağlığı sorunu olarak bilinir. Ortaya çıkan bu açık, yenileyici tıp açısından, araştırmacıları karaciğer, kalp, deri ve böbrek gibi farklı organ ve dokuları yenilemeye ve değiştirmeye yönelik çalışmalar yapmaya itmiş ve çalışmaların hız kazanmasında temel yürütücü güç olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çizelge 2.4 Çeşitli biyolojik kaynaklardan elde edilen biyomalzemeler ve özellikleri
(Ratner vd. 2014)

Malzeme	Kaynak	Kullanım şekli	Özellikler
Deselülerize matriksler	Hayvan dokusu	Cerrahi yama/doku iskelesi	Dokuya özgü bileşim ve mimaride protein ve GAG'ların kompleks içeriği
Alginat	Algler	Yara örtüsü	Anyonik polisakkarit, modifiye edilmedikçe sınırlı bozunma, hidrojeller oluşturur
Kitosan	Krustase dış iskeleti	Yara örtüsü	Kasyonik, enzimatik parçalanma, hidrojeller oluşturabilir
İpek Fibrion	İpek böceği kozası	Sütur	Güçlü, yavaş bozunma, dokunabilirlik
Kollajen	Hayvan dokusu/Hücre kültürü/Bakterial fermantaston	Dermal dolgu	HDM proteini, üçlü sarmal yapı, hücre bağlanma bölgeleri sağlar
Jelatin	Denatüre kollajen	Doku iskelesi (Sünger)	Ucuz, hücre kültüründe hücre bağlanması için kullanılır
Fibrin/fibrinojen	Hayvan doku veya plazması	Fibrin sızdırmazlık maddesi	Pıhtı oluşumu, fibrinojenin trombin ile polimerizasyonundan kaynaklanır
Hyaluronik Asit	Hayvan dokusu/Bakterial fermantaston	Dermal dolgu	Yağlayıcı polimer, sadece sGAG, negatif yüklü, hidrojeller oluşturabilir
Heparin	Hayvan doku veya plazması	Stent veya kateter kaplama	GAG'da, sayısız büyüme faktörüne bağlanır, antikoagülan aktivite, stentleri kaplamak için kullanılır

Doku transplantasyonlarında zenojenik ve allojenik hücrel antijenler konakçı tarafından yabancı olarak tanınırlar ve bu nedenle inflamatuvar bir yanıtı veya dokunun reddine neden olurlar. Bununla birlikte, dHDM bileşenleri genellikle türler arasında benzerlik gösteren kimyasal profili nedeniyle elverişlidir (Faulk ve Badylak 2014). Kalp kapakçıkları, kan damarları, deri, sinirler, iskelet kası, tendonlar, ligament dahil olmak üzere çeşitli dokular, ince bağırsak submukozası, mesane ve karaciğer doku

mühendisliği ve yenileyici tıp uygulamaları için çalışmalar yapılmıştır. Çalışmaların tamamı bu benzerliğin avantajından faydalanılarak hücresizleştirme protokolünün amacını ortaya koymaktadır. Deselülerizasyonda HDM'nin biyolojik aktivitesi ve mekanik bütünlüğü üzerindeki olumsuz etkileri en aza indirilerek tüm hücrel ve nükleer malzemelerin etkili bir şekilde uzaklaştırılması temel hedeftir. Böylece doku/organ transplantasyonlarındaki temel dezavantajlardan biri olan immün yanıt ve doku reddi gibi problemleri en aza indirilmesi hedeflenmiştir.

HDM, hücrelerin bağlanması ve uzamsal organizasyonu için fiziksel bir substrat sağlar ve HDM bileşimi ve 3B yüzey topografisinin hücre fenotipi ve davranışında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Faulk ve Badylak 2014).

Deselülerizasyonun etkinliği için en yaygın olarak kullanılan yöntemler, fiziksel ve kimyasal uygulamaların bir kombinasyonunu içerir. Böylece biyouyumlu iskele yapılarının elde edilmesi sağlanmaktadır (Parmaksiz vd. 2015, Parmaksiz vd. 2016). Deselülerizasyonun başlıca amacı hücrelerin ve nükleik asit bileşenlerinin uzaklaştırılması ve HDM'nin mevcut doğal biyoaktif içeriğinin yapıda korunabilmesine bağlıdır. Daha sonra elde edilecek biyomalzeme doğrudan kullanılabilmesi gibi izole edilmiş hücreler ile kombine edilerek de (reselülerizasyon) kullanılabilir. Deselülerizasyon protokolleri temel olarak fiziksel veya iyonik çözeltiler yardımıyla hücre membranının parçalanması ile başlar, enzim muamelesi ile hücrel bileşenlerin HDM'den uzaklaştırılması ve ardından sitoplazmik ve nükleer bileşenlerin deterjanlarla çözdürülmesi esasına dayanır. Bu şekilde elde edilen biyomalzeme, biyoteknolojik/biyomedikal uygulamalar için önemli potansiyel taşımaktadır (Gilbert vd. 2006).

Hücresizleştirme ajanlarının optimal olarak uygulaması için dokuya ait özellikler örneğin kalınlık ve yoğunluk, kullanılan ajanlar ve hücresizleştirilmiş dokunun amaçlanan klinik uygulamasına bağlıdır. Hücresizleştirme ajanlarını uygulamadan önce, deselülerizasyon işlemini basitleştirmek için istenmeyen fazla doku çıkarılabilir. Hücresizleştirmeye yardımcı olmak için dokuya doğrudan kuvvet de uygulanabilir (Crapo vd. 2011). İdrar kesesi, bağırsak, perikard ve amniyon gibi ince doku

laminatları için, en yaygın olarak kullanılan hücresizleştirme teknikleri donma ve çözülme, kas veya submukoza gibi istenmeyen tabakaların mekanik olarak çıkarılması ve böylece deterjanlara veya asitlere nispeten kısa maruz kalması saplanmış olur (Crapo vd. 2011). Dermis gibi daha kalın doku tabakaları daha kapsamlı biyokimyasal maruziyet ve daha uzun durulama süreleri gerektirebilir. Amorf organlar, yağ dokusu, beyin ve pankreas gibi dokularda genellikle daha kapsamlı biyokimyasal maruziyet ve daha uzun durulama süreleri gereklidir (Crapo vd. 2011).

Deselülerizasyon için kullanılan kimyasallar çeşitlilik göstermektedir. Bir veya birden fazla kimyasal birlikte uygulanabilmektedir. Literatürde sıkça kullanılan deselülerizasyon ajanları **çizelge 2.5**'te özetlenmektedir. Her doku benzersiz bir kompozisyona, hücre ve HDM organizasyonuna sahiptir. Sonuç olarak, deselülerizasyon protokolünün, yararlı HDM proteinlerini, glikozaminoglikanları ve büyüme faktörlerini muhafaza ederken, hücresel içeriğin uzaklaştırılmasını en üst düzeye çıkarmak için her doku için optimize edilmesi gerekir. Optimize edilmiş deselülerizasyon stratejileri, zenojenik veya allojenik malzemelerde, immün yanıt ortaya çıkaran moleküllerin çoğunu uzaklaştırırken, hücresel bileşenlerin lizisi nedeniyle sitoplazma içeriğinin kalıntıları ortamda bulunabilmektedir. Bu kalıntı moleküllerin immün yanıtı ve doku yeniden modelleme süreci üzerindeki sonuçlarını belirleyen az sayıda çalışma vardır; bununla birlikte, kalıntıların varlıklarını araştıran çalışmalar, hücresel kalıntıların hem olumlu hem de olumsuz etkileri için potansiyeli açıkça göstermiştir (Lopresti vd. 2015).

2.7.1 Deselülerizasyon ajanları

2.7.1.1 Kimyasal ajanlar

Asit-baz işlemi, biyomoleküllerin hidrolitik bozunmasını katalize ederek sitoplazmik bileşenleri ve nükleik asitleri HDM'den uzaklaştırmak için oldukça etkili bir yaklaşımdır. Asit-bazlı işlem, sterilizasyon kabiliyeti gösterse de HDM'nin bozulmasına neden olabilir ve sonuç olarak büyüme faktörlerini ortadan kaldırırken mekanik özellikler üzerinde de etki gösterebilir (Gilbert vd. 2006, Crapo vd. 2011). Deterjan

muamelesi hücresizleştirme için başka bir yaygın yaklaşımdır. İyonik (Sodyum dodesil sülfat (SDS)), iyonik olmayan (Triton X-100) ve zwitteriyonik 3-[(3-Kolamidopropil) dimetilamonyo]-1-propansülfonat (CHAPS) gibi deterjanlar hücre zarlarını ve nükleer bileşenleri çözündürür (**Çizelge 2.5**). Bununla birlikte, bu ajanlar HDM'nin bozulmasına ve HDM'den protein çıkarılmasına neden olabilir (Gilbert vd. 2006, Crapo vd. 2011). DNA-protein etkileşimlerini bozabilecek ve ozmotik etkilerle hücre lizisine neden olabilen HDM'nin hücresizleştirilmesi için hipotonik (Tris-HCl) ve hipertonic (NaCl) kimyasallar da kullanılmıştır (Crapo vd. 2011, Kabirian ve Mozafari 2020). Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve etilen glikol tetraasetik asit (EGTA) gibi kenetleme maddeleri, doku hücresizleştirme için yaygın olarak kullanılır. Bu tür kenetlenme ajanları HDM'nin hücre yapışma bölgelerinde Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi metal katyonlarına sıkıca bağlanarak hücreleri bozar. Hücresizleştirme için kenetleme maddelerinin uygulanması, hücre çıkarılması için yetersizdir ve hücre kalıntıları ortamdaki uzaklaştırmaya yetmez. Bu nedenle yaygın olarak diğer yaklaşımlarla birlikte kullanılırlar (Gilbert vd. 2006, Crapo vd. 2011). Alkoller ve aseton gibi çözücüler dehidrasyon mekanizması ile dokuları hücresizleştirebilir. Lipitlerin dokudan uzaklaştırılması için izopropanol, etanol ve metanol gibi alkoller lipazdan daha etkilidir. Bununla birlikte, alkollerin sterilizasyon yetenekleri vardır ancak hem alkoller hem de aseton HDM'nin mikro yapısına zarar verebilecek doku fiksatifleridir (Gilbert vd. 2006, Crapo vd. 2011, Kabirian ve Mozafari 2020).

2.7.1.2 Biyolojik ajanlar

Enzimatik hücresizleştirme yöntemi, hücresel bileşenleri HDM'den spesifik olarak çıkarmak için tripsin ve nükleazlar gibi enzimleri kullanır (**Çizelge 2.5**). Enzimatik muamele hücreleri etkili bir şekilde bozmasının yanı sıra, bu yaklaşımın uygulanması tam olarak hücrelerin uzaklaştırılması için yetersizdir ve enzim kalıntıları bağışıklık tepkisine neden olabilir ayrıca maliyeti arttırıcı bir yöntemdir. Bu sebeple deterjanlar ile birlikte kullanımı yaygındır (Gilbert vd. 2006, Crapo vd. 2011, Kabirian ve Mozafari 2020).

2.7.1.3 Fiziksel ajanlar

Fiziksel yöntemler de hücre zarının bozulması ve parçalanması amacıyla doku ve organların deselülerizasyonu için kullanılabilir (**Çizelge 2.5**). Fiziksel yaklaşımlar, hücresizleştirme işlemi sırasında HDM altyapısının bozulmasını etkili bir şekilde en aza indirir. Bununla birlikte, hücre zarının parçalanması sonucunda hücresel artıklar ortamda kalır ve aselüler bir doku elde etmek için fazladan bir kimyasal veya biyolojik işlem uygulanması gerekir. Dondurma-çözme, kimyasal ajanlar kullanmadan hücre içi buz kristalleri tarafından hücresel zarı bozmak için birden fazla döngüde kullanılabilen yöntemlerden biridir. Ayrıca dondurma-çözme döngülerinin doku mimarisinde küçük değişikliklere yol açtığı ancak HDM'nin mekanik özelliklerini değiştirmedeği gösterilmiştir (Crapo vd. 2011). Donma-çözme döngülerinin HDM yapısına etkileri azaltmak için, %5 trehaloz gibi kriyoprotektanlar ilave edilebilir. Mekanik kuvvetler ve çalkalamalar, hücrelerin bazal membrandan daha etkin bir şekilde uzaklaştırılması için çoğunlukla enzimler, hipertonik salin veya kenetleyici ajanlar ile kombinasyon halinde uygulanan bir yaklaşımdır. Ancak, mekanik kuvvetler HDM yapısına zarar verebilmektedir (Gilbert vd. 2006, Crapo vd. 2011, Kabirian ve Mozafari 2020).

Bir arada kullanıldıklarında deselülerizasyon protokolleri genellikle fiziksel muameleler veya iyonik çözeltiler kullanılarak hücre zarının lizisi ile başlar, ardından hücresel bileşenlerin enzimatik muamele ile HDM'den ayrılması, sitoplazmik ve nükleer hücresel bileşenlerin deterjan kullanılarak çözülmesi ve son olarak hücresel döküntülerin dokudan çıkarılması ile başlar. Bu adımlar, etkinliklerini arttırmak için mekanik çalkalama veya karıştırma ile birleştirilebilir. Hücresizleştirmeden sonra, kimyasal maddeye karşı olumsuz bir konakçı doku tepkisini önlemek için tüm artık kimyasallar uzaklaştırılmalıdır. Hücresizleştirme ve HDM'nin korunmasının etkinliği çeşitli yöntemlerle değerlendirilebilir. Çeşitli dokular için fiziksel, enzimatik ve kimyasal hücresizleştirme mekanizmaları bir arada kullanılabileceği gibi immün yanıt oluşturmaması için yöntem basite de indirgenebilir (Gilbert vd. 2006).

Çizelge 2.5 Hücresizleştirme yöntemleri ve bunların doku bileşenlerinin uzaklaştırılmasına yönelik sınıflandırılması (Gilbert vd. 2006, Crapo vd. 2011, Lopresti vd. 2015)

	Deselülerizasyon ajanları	Etkileme şekli	HDM'ye etkisi
FİZİKSEL	Dondurma-Çözme	Hücre içi buz kristalleri hücre zarını bozar	HDM hızlı dondurma sırasında bozulabilir veya kırılabilir
	Mekanik kuvvet	Basınç ile hücreleri patlatabilir	Mekanik kuvvet HDM'ye zarar verebilir
	Mekanik çalkalama	Hücre lizisine neden olabilir, daha çok kimyasal maruziyeti ile hücresel materyalin çıkarılmasını kolaylaştırmak için kullanılır	Agresif çalkalama veya sonikasyon, hücresel materyal giderilirken HDM'nin de bozulmasına neden olur
ENZİMATİK	Tripsin	Arg ve Lys'in C tarafındaki peptit bağlarını ayırır	Uzun süreli maruz kalma HDM yapısını bozabilir, laminin, fibronektin, elastin ve GAG'ları zarar görür
	Endonükleazlar	Ribonükleotid ve deoksiribonükleotid zincirlerinin iç bağlarının hidrolizi	Dokudan çıkarılması zor ve immün yanıt meydana getirebilir
	Ekzonükleazlar	RNA ve DNA zincirlerinin terminal bağlarının hidrolizi	-

Çizelge 2.5 Hücresizleştirme yöntemleri ve bunların doku bileşenlerinin uzaklaştırılmasına yönelik sınıflandırılması (Gilbert vd. 2006, Crapo vd. 2011, Lopresti vd. 2015) (Devamı)

		Deselülerizasyon ajanları	Etkileme şekli	HDM'ye etkisi
KİMYASAL	İYONİK OLMAYAN	Triton X-100	Protein-protein etkileşimlerini olduğu gibi bırakırken lipit-lipit ve lipit-protein etkileşimlerini bozar	Dokuya bağlı verimlilik, GAG'ları bertaraf edebilir
		Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sitoplazmik ve nükleer hücre membranı çözme; proteinleri denatüre etme eğilimi	Doğal doku yapısını bozma, GAG'lara ve kollajene zarar verme eğilimi
	İYONİK	Sodyum deoksikolat	-	Doku yapısına SDS'den daha fazla zararı olur
		Triton X-200	-	Zwitteriyonik deterjanlar ile kullanıldığında verimli hücre uzaklaştırması
	ZWİTTERİYONİK	CHAPS (3-((3-kolamidopropil) dimetilamonyo)-1-propan sülfonat)	İyonik olmayan ve iyonik deterjanların özelliklerini sergiler	Triton X-100'dekine benzer HDM bozulması ile etkili hücre bertarafı
		Sülfobetain-10 ve Sülfobetain-16 (SB-10, SB-16)	-	Triton X-200 ile hücrenin çıkarılması ve hafif HDM bozulması
		Tribütil Fosfat	Protein-protein etkileşimlerini bozan organik çözücü	Mekanik özellikler üzerindeki etki, kollajen içeriği kaybı
		EDTA, EGTA	İki değerlikli metalik iyonları bağlar ve böylece HDM-hücre adezyonunu bozar	Enzimatik yöntemlerle (örn. Tripsin) kullanılır

Deselülerizasyon yöntemleri, doğal olarak hücrelere zarar verme özellikleri nedeniyle kullanılan çok çeşitli kimyasalları içerir. Kimyasalların muamelesinden sonra doku içinde yüksek konsantrasyonlardaki kalıntılar, iskele *in vitro* kültürü veya *in vivo* implante edildiğinde konakçı hücrelere toksik olmaları muhtemeldir. Benzer şekilde, yukarıda tarif edilen işlemlerin bazıları, büyük ölçüde sığır kaynaklarından (yani DNaz, RNaz, tripsin) türetilen enzimleri içerir. Bu enzimler potansiyel olarak konakçı tarafından olumsuz bir bağışıklık tepkisine neden olmaktadır. Benzer sebeplerden deterjanlar ve asit veya bazlar benzer immün yanıt mekanizmalarını *in vivo* ortamda harekete geçirirken; *in vitro* sitotoksiste göstermektedir.

Deselülerize doku tamamlandıktan sonra, üç ana sonucu belgelemek önemlidir. Bunlar sırayla, (i) hücresel içeriğin çıkarılma derecesi, (ii) hücresizleştirilmiş dokunun deterjan ve tuz kalıntılarının arınmış olup olmadığı ve (iii) geri kalan HDM'nin bütünlük düzeyidir. Genellikle, nükleik asitler için oldukça hassas analizler ile nükleer materyalin varlığını ölçmek gerekmektedir. Histokimyasal boyamalarla, kalan potansiyel hücre çekirdeği sayısı belirlenmektedir. Ancak, bu yaklaşım daha az nicelikselidir. Deterjanların uzaklaştırılmasının belirlenmesi de deselülerize dokunun reselülerizasyonuna zararlı girişimde bulunacağından önemlidir. HDM iskelesinin bütünlüğünü doğrulamak için, taramalı elektron mikroskobu kullanarak hücresizleştirilmiş dokunun 3B mikro yapısını görüntülemek sıkça başvuru yöntemlerinden biridir. İyi bir deselülerizasyon protokolü, hücrelerin daha önce oturduğu görünür gözeneklere sahip düzenli bir HDM yapısı verir (Sarvazyan 2020). İskele proteinleri ayrıca farklı histokimyasal boyalarla boyanabilir, bu durumda spesifik boyanmalar, her bir HDM bileşenlerinin, yani elastin, kollajen veya glikozaminoglikanların bolluğuna işaret edebilir. Başarılı deselülerize doku protokolünün son aşamaları, *in vivo* uyumluluğun ve hücre uyumluluğunun kontrolünü içermelidir. Ayrıca, *in vitro* olarak hücrelerin deselülerize doku içinde kendi işlevlerini yerine getirip getirememesi, çoğalma ve farklılaşma gibi özelliklerini değerlendirmek önemli bir parametre olarak ön plana çıkmaktadır (Sarvazyan 2020).

2.7.2 Karaciğer deselülerizasyonu

Deselülerizasyon doku mühendisliğinde iskele hazırlanması için geliştirilmiş tekniklerden biridir, elde edilen malzeme potansiyel olarak doğal mikro damar ağı yapılanması ve fonksiyonel yönleri de dahil olmak üzere orijinal dokunun mimarisini koruyabilir (Badylak 2007). Anjiyogenez, hücre infiltrasyonu, mitogenez ve *in vivo* implantasyon sonrası konakçı HDM'nin birikimi ve organizasyonu, HDM yapı iskelelerinin yeniden modellenmesi yaygın olaylardır. Epidermal büyüme faktörü (EGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü alfa (TGF- α) gibi bileşen büyüme faktörleri, iskele biyobozunması sırasında salınır ve biyolojik aktivite göstermektedirler (Selden ve Hodgson 1991).

Deselülerize karaciğer HDM'sinde muhtemelen doğal karaciğer dokusunda yer alan fibronektin, bazı kollajen tip I ve az miktarlarda tip III, IV, V ve VI'dan oluşmaktadır. Periportal bölgelerde, matriks safra kanalında bol olan lamininlerden oluşur, fibronektin ise Disse kanallarındaki en bol HDM proteindir. Santral damara yakın olan bölgelerde kollajen tip I, IV ve VI'yı ve bunlara kıyasla az miktarda kollajen tip III, fibronektin ve nispeten yüksek oranda sülfatlanmış heparan proteoglikanlarını içerir. Elastin tüm karaciğer lobülünde eksprese edilir. Karaciğer boyunca dağılmış şekilde diğer HDM proteinleri arasında hyalüronan, entaktin ve kondroitin sülfat proteoglikanlar bulunur. Özetle, karaciğerde tip I, III, IV, V ve VI dahil olmak üzere bir dizi kollajeni ihtiva etmektedir. Fibronektin, laminin ve tenascin dahil glikoproteinlerin yanı sıra; heparan sülfat, perlekan ve sindekan gibi proteoglikanlar da mevcuttur. Bunlar karaciğer hücrelerinin doğal nişi olarak görev üstlenmektedir ve deselülerize matrikslerde bu yapısal elemanların kompozisyonları doku mühendisliği iskelelerinin başarısını oluşturmaktadır. Bu içeriği korumak yöntemin oluşturulmasındaki en önemli unsur olarak ortaya çıkmaktadır (Andez ve Amenta 1995, Kikkawa vd. 2008, McClelland vd. 2008, Wang vd. 2011, Mazza vd. 2015).

Deselülerize matriksler, farklı kullanım amaçları için farklı süreçler izlenerek hazırlanabilir. Kısmi ya da tam kalınlıktaki yaralarda, yara ülserlerinde veya yanıklarda

kullanılmak üzere sığır incebağırsak submukozası üzerinde çalışmalar yapılmış, elde edilen dHDM şeritler ile hali hazırda ticari olarak başarı elde etmişlerdir (Parmaksız vd. 2015, Parmaksız vd. 2016). Karaciğer deselülerizasyonu kullanım amacına göre tüm-organ (Baptista vd. 2011), enjekte edilebilir jel (Lee vd. 2014), 3B biyobasım (Lewis vd. 2019, Vurat vd. 2020a) veya elektroegirme yöntemiyle oluşturulmuş membran (Grant vd. 2019) gibi çok çeşitli yollarla elde edildiği bilinen çalışmalar bulunmaktadır. Genellikle kolay şekillendirilebilme, su tutma, sertliği ve mekanik özelliği kolayca değiştirilebilme gibi özelliklerinden dolayı dHDM'ler çözünebilir formda jel halinde kullanılabilme potansiyeli taşımaktadırlar. dHDM'ler genel olarak literatürde pepsin ile muamele edilerek jel formuna getirilebilirler, daha sonrasında kullanım amacı doğrultusunda uygulanacak işleme göre farklı şekillerde ve fabrikasyon metoduna uygun kullanılabilir.

Karaciğer doku mühendisliğinde de deselülerizasyon büyük bir yer tutmaktadır. Kanlanmayı sağlayan damarlanma yapısı aynı zamanda safra kanallarıyla karaciğerin fonksiyonel modüler birimi olan sinüzoidlerde birleşmektedir. Karaciğer, bunun dışında vücuttaki birçok önemli biyokimyasal yolun başı ve sonudur. Karaciğer fonksiyonunun en temelinde yer alan hepatositler ise bu biyokimyasal aktivitenin merkezi itici gücünü oluşturmaktadır. Doku mühendisliğinin temelinde yer alan mekanotransdüksiyon, hücre iskeletinin hücre dışı matriks ile ortaklaşa bir uyum içerisinde olmasını göz önünde bulundurmaktadır ve bu perspektiften bakıldığında üretilcek dokuyu en iyi şekilde taklit etmenin yolu, doku veya organı en yakın kaynağın işlenmesiyle elde edilecek olan metodu seçmek için düşünmeye itmektedir. Bu amaçla doğal içeriği, sahip olduğu biyoaktif molekülleri ve kompleks mimarisini en iyi şekilde taklit edebilecek olan deselülerizasyon ile üretilcek doku veya organ için en iyi iskele malzemesi olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.8 Hidrojeller

Hidrojeller, kuru ağırlıklarının binlerce katına kadar su absorblayabilen hidrofilik polimer ağlarıdır. Hidrojeller kimyasal olarak stabil olabilir veya bozulabilir ve sonunda

parçalanabilir ve çözülebilirler. Moleküler bağlar ve/veya iyonik, hidrojen bağ veya hidrofobik kuvvetler de dahil olmak üzere ikincil kuvvetler tarafından bir arada tutulduğunda “geri dönüşümlü” veya “fiziksel” jeller olarak adlandırılırlar. Fiziksel hidrojeller homojen değildir, çünkü konformasyonel yapılarında hidrofobik veya iyonik olarak ilişkili kümeler homojen olmayan alanlar oluşturabilir (Campoccia vd. 1998, Prestwich vd. 1998).

Son zamanlarda, doku mühendisliği, ilaç salımı, kendi kendine şekil alabilen malzemeler, biyosensörler ve hemostaz bandajları gibi alanlarda hidrojellerin uygulanmasının fizibilitesi üzerine geniş araştırmalar devam etmektedir (Lee ve Mooney 2001, Ding vd. 2016). Diğer biyomalzeme türleri ile karşılaştırıldığında, hidrojellerin artan biyouyumluluk, ayarlanabilir biyobozunurluk, uygun mekanik mukavemet, gözenekli yapıya sahip olmaları gibi avantajları vardır. Bununla birlikte, hidrojellerin düşük mekanik mukavemeti ve kırılma eğilimi nedeniyle, sınırlamaları mevcuttur. Bu nedenle, daha güçlü ve daha kararlı özelliklere sahip yeni hidrojellere hala ihtiyaç vardır. Bu sebeple hidrojeller fiziksel, kimyasal veya enzimatik yollarla çapraz bağlanarak manipüle edilir ve böylece ihtiyaca uygun şekilde kullanılabilirler. Örneğin çeşitli çevresel tetikleyiciler (pH, sıcaklık, iyonik güç) ve çeşitli fizikokimyasal etkileşimler (hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağı) kullanılarak polimer zincirlerinin fiziksel çapraz bağlanması sağlanabilmektedir.

Hidrojeller, çok çeşitli kimyasal bileşimleri ve bir yığın fiziksel özellikleri olan, hemen hemen hepsi suda çözünür polimerlerden üretilir. Ayrıca hidrojeller, levhalar, mikropartiküller, nanopartiküller, kaplamalar ve filmler dahil olmak üzere çeşitli fiziksel formlarda formüle edilebilir. Sonuç olarak, hidrojeller klinik uygulama ve deneysel tıpta, doku mühendisliği ve yenileyici tıpta (Lee ve Mooney 2001; Vurat vd. 2020a), teşhis (Van der Linden vd. 2003), hücre immobilizasyon (Jen vd. 1996), biyomoleküllerin veya hücrelerin ayrılması (Wang vd. 1993) dahil olmak üzere çok çeşitli uygulamalar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Oldukça gözenekli yapıları, jel matriksindeki çapraz bağlantıların yoğunluğu ve hidrojellerin şiştikleri sulu ortam için afinitesi kontrol edilerek kolayca ayarlanabilir. Gözeneklilikleri ayrıca, ilaçların jel matriksine yüklenmesine ve müteakiben, jel ağı yoluyla küçük moleküllerin veya

makromolekölün difüzyon katsayısına bağı bir oranda ilaç salımına izin veren bir özelliktir.

2.8.1 Deselülerize doku kaynaklı hidrojel

dHDM'lerden türetilen biyomalzemeler miyokard enfarktüsünden ortopedik yaralanmalara kadar çok çeşitli tıbbi uygulamalarda kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Hussey vd. 2018, Spang ve Christman 2018). Bu materyallerin birçoğu hala klinik öncesi aşamada daha fazla değerlendirme gerektirmesine rağmen, çok sayıda deselülerize ürün ticari olarak elde edilebilir hale gelmiştir (Brown ve Badylak 2014). Bu ürünlerin çoğu insan, domuz veya sığır doku kaynaklarından elde edilir ve en yaygın olarak şerit örtü şeklinde üretilirler. Bununla birlikte, hücreleştirilmiş bu şerit tabakaların implante edilmesi, deselülerize HDM'nin enjekte edilebilir formlarına kıyasla daha invaziv prosedürler gerektirir. Özellikle, HDM hidrojel, minimal invaziv olarak kullanılabilmeleri nedeniyle giderek daha fazla çalışılmaktadır ve bu malzemelerin jelleşmiş şekli, amorf şekilli kusurların doldurulması için avantaj sağlamaktadır. dHDM biyomalzemelerinin tabaka formundan farklı olarak, sadece bir miyokard matriksi kaynaklı enjekte edilebilir hidrojel, Ventrix, Inc. (ClinicalTrials.gov, NCT02305602), klinik deneylere ulaşmıştır (Traverse vd. 2019). Bunun yanı sıra, enjekte edilebilir HDM hidrojel için üretim standartları iyi belirlenmemiştir.

HDM'den köken alan bir hidrojin geliştirilmesi, doku onarımında birkaç umut verici uygulamaya sahiptir. Yapılan çalışmalar, dHDM'nin, fizyolojik sıcaklıkta kendi kendine bir araya gelebilme özelliği örneğin kalbe enjekte edilebilir bir malzeme olarak kullanılabileceği yönündedir (Singelyn vd. 2009, Ungerleider vd. 2015). Aynı zamanda hidrojel, hücre organizasyonunu ve hizalamasını yönlendirmek için arzulanan bir modelin üretilmesini mümkün kılmaktadır (Singelyn vd. 2009; Vurat vd. 2020a).

2.8.2 Deselülerize doku kaynaklı hidrojellerden elde edilen sünger iskeleler

Karaciğer dokusuna en yakın 3B mikro mimariye ve hücre dışı matriks bileşimine sahip bir karaciğer doku iskelesinin geliştirilmesi, karaciğer transplantasyonu ve karaciğer hastalıklarının tanı ve tedavisine katkı sağlama potansiyeline sahiptir. 3B doku iskeleleri 2B kültüre kıyasla hücre organizasyonları ve hücrelerin fenotipik karakteri için büyük önem arz etmektedir. Ventura ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, hidroksiapatit ve dHDM kompozit iskelesini sıçanlarda subkutan olarak implante etmiş ve implantlar kemik rejenerasyon potansiyeli açısından test edilmiştir (Ventura vd., 2015). Bir başka çalışmada, doku mühendisliği uygulaması için hücreleştirilmiş keçi karaciğeri deselülerize edilmiş ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. HDM bileşenlerini ve doğal karaciğer dokusuna benzer yapısal özellikleri koruduğu bildirilmiştir (Agarwal vd. 2019).

Karaciğer doku mühendisliği alanında karşılaşılan en büyük zorluk, karmaşık biyokimyasal bileşimi ve doğal doku/organa benzer 3B mikro mimariyi taklit etmektir. Bu tez çalışmasında hepatik dokunun geliştirilmesi amacıyla sığır karaciğeri tercih edilmiştir. Hem karaciğer izolasyonu açısından sığır karaciğeri yüksek miktarda bir kaynak olması açısından, hem memeli grubuna yakın HDM bileşenlerine sahip olmasından, hem de bu alanda sığır kaynağından izole edilerek biyomühendisliği yapılan karaciğer üzerindeki çalışmaların eksikliğini gidereceği düşüncesiyle tercih edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Bu tez çalışması kapsamında deselülerizasyon aşamalarında Triton X-100, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum hidroksit (NH_4OH), perasetik asit (PAA); 3B iskelelerin hazırlanması ve jelleştirme süreçlerinde pepsin ve hidroklorik asit (HCl) Sigma (St. Louis, MO, ABD) marka kimyasallar temin edilerek gerçekleştirildi. İskeleler Christ marka Alpha 1-4LD plus model liyofilizatör (Osterode am Harz, Almanya) kullanılarak elde edildi.

Deselülerize karaciğer dokularının karakterizasyonu kapsamında DNA içeriği analizlerine, Trizma (Tris-HCl), potasyum klorür (KCl), magnezyum klorür (MgCl_2), Tween-20, Fenol, Kloroform, İzamil alkol ve Proteinaz K Sigma (St. Louis, MO, ABD) marka tercih edildi ve NanoDrop One (Thermo Scientific, Delaware, ABD) ile spektrofotometrik ölçümler alındı.

Protein içeriğinin belirlenmesi amacıyla, QuantiPro™ BCA tayin kiti Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD), analizlerde ekstraksiyon amacıyla kullanılan yardımcı kimyasallar NaCl, EDTA, Triton-X 100, deoksikolik asit, SDS Sigma (St. Louis, MO, ABD) marka tercih edildi ve cOmplete™, EDTA'sız Proteaz İnhibitor Kokteyli Roche (Mannheim, Almanya) firmasından temin edildi; Molecular Devices marka SpectraMax M5 model spektrofotometre (Kaliforniya, ABD) kullanılarak kolorimetrik tayin gerçekleştirildi.

Kollajen içeriğinin belirlenmesi amacıyla Sircol™ Kollajen tayin kiti (Biocolor, Carrickfergus, Büyük Britanya) kullanıldı, ekstraksiyonu amacıyla pepsin ve asetik asit Sigma (St. Louis, MO, ABD) marka tercih edildi. sGAG içeriğinin belirlenmesi amacıyla Blyscan™ sGAG tayin kiti (Biocolor, Carrickfergus, Büyük Britanya) kullanıldı, ekstraksiyonu amacıyla fosfat tamponu, sodyum asetat, EDTA, disodyum tuzu, sistein HCl ve papain Sigma (St. Louis, MO, ABD) marka kimyasallar

kullanılarak hazırlandı ve spektrofotometrik ölçümler Molecular Devices marka SpectraMax M5 model spektrofotometre (Kaliforniya, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

Mekanik analizler için Shimadzu marka Autograph AGS-X model (Kyoto, Japonya) mekanik test cihazı ile basma testi gerçekleştirildi.

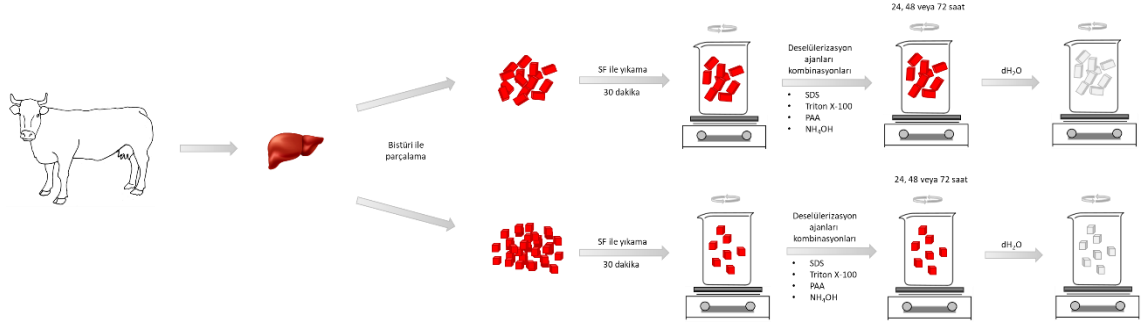
Diğer karakterizasyon çalışmaları kapsamında, taramalı elektron mikroskobu analizleri Zeiss EVO 40 (Jena, Almanya), FTIR Shimadzu IRAinfinity, TGA Shimadzu DTG-60/60 (Kyoto, Japonya) cihazları kullanıldı.

3.2 Yöntem

Sığır karaciğer dokularının deselülerizasyonu, jelleştirilmesi, 3B doku iskelesi geliştirilmesi çerçevesinde yapıların histokimyasal olarak analizi, DNA içeriği, yüzey özelliklerinin belirlenmesi (SEM); toplam protein, kollajen ve sGAG gibi biyoaktif bileşenlerin belirlenmesi; türbidimetrik jelleşme kinetiği özelliklerinin belirlenmesi; *in vitro* biyobozunma, su tutma testi ve *in vitro* sitotoksitesite analizlerini kapsayan karakterizasyon çalışmaları yer almaktadır.

3.2.1 Karaciğer dokularının izolasyonu ve deselülerizasyonu

Çalışmalarda kullanılan sığır karaciğeri, veteriner hekim kontrolündeki Ankara Et ve Süt Kurumu Kesim Tesisindeki sağlıklı sığırların kesiminin ardından 4 saat içerisinde, bir bütün halinde, 4°C’de %0,9 serum fizyolojikle (SF) dolu kaplarla laboratuvara transfer edildi. İlk aşamada bütün haldeki karaciğerdeki mevcut kanın uzaklaştırılması amacıyla SF ile seri yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra 10-15 cm genişlikte ve 1-2 cm kalınlığındaki boyutlarda kesilip tekrardan SF ile yıkandı. Karaciğer dışındaki ana damarlar, yağ dokusu ve karaciğerin dışındaki zar (peritoneal zar) gibi bazı bağ doku elemanları bertaraf edildi ve akabinde ileri çalışmalar öncesinde -80°C’deki dondurucuda muhafaza edilmek üzere kaldırıldı. İşlem adımları **şekil 3.1**’de özetlenmektedir.



Şekil 3.1 Sığır karaciğer dokusunun deselülerizasyonuna ilişkin şematik gösterim

Dondurucuda (-80°C) muhafaza edilen örnekler, deselülerizasyon öncesinde SF içerisinde oda sıcaklığında yavaşça çözüldü ve bisturi yardımıyla küp ($0,5-1\text{ cm}^3$) ve dilim ($\sim 0.3 \times 1 \times 2\text{ cm}$) şeklinde parçalara ayrıldı. Daha sonra doku parçaları içerisindeki kalan kanın uzaklaştırılması amacıyla manyetik karıştırıcı üzerinde 30 dakika süre ile SF ile yıkandı. Ön hazırlık aşaması sonrasında deselülerizasyon çalışmalarına geçildi. Bu amaçla **çizelge 3.1**'de yer alan protokoller çalışıldı. Uygulanan Triton X-100, sodyum dodesil sülfat (SDS), perasetik asit (PAA) ve amonyum hidroksit (NH₄OH) distile su içerisinde hazırlandı. Deselülerizasyon manyetik karıştırıcıda sürekli karıştırma altında gerçekleştirildi ve çözeltiler her 12 saatte bir kez tazelenerek deselülerizasyon sürdürüldü. Deselülerizasyon ajanı muamelesi sonrasında her defasında durulama işlemi SF ile 30 dakikada bir tazelenerek gerçekleştirildi. Durulamanın ardından -80°C 'de dondurulan örnekler daha sonra 24 saat boyunca $0,29\text{ mbar}$ basınç altında -76°C liyofilize edilerek kurutuldu.

Çizelge 3.1 Sığır karaciğerinin deselülerizasyonu için uygulanan protokoller

Protokol	Kesim	Yöntem
1	Dilim	%1 Triton X-100 (dH ₂ O) ile 48 saat ve ardından %0,15 PAA (dH ₂ O) ile 24 saat muamele edildi.
2	Dilim	%1 Triton X-100 (dH ₂ O) ile 48 saat ve ardından %0,1 NH ₄ OH (dH ₂ O) ile 24 saat muamele edildi.
3	Küp	%1 Triton X-100 (dH ₂ O) ile 72 saat ve ardından %0,15 PAA (dH ₂ O) ile 24 saat muamele edildi.
4	Küp	%1 Triton X-100 (dH ₂ O) ile 72 saat ve ardından %0,1 NH ₄ OH (dH ₂ O) ile 24 saat muamele edildi.
5	Dilim	%2 Triton X-100 (dH ₂ O) ile 48 saat ve ardından %0,15 PAA (dH ₂ O) ile 24 saat muamele edildi.
6	Dilim	%2 Triton X-100 (dH ₂ O) ile 48 saat ve ardından %0,1 NH ₄ OH (dH ₂ O) ile 24 saat muamele edildi.
7	Küp	%2 Triton X-100 (dH ₂ O) ile 48 saat ve ardından %0,15 PAA (dH ₂ O) ile 24 saat muamele edildi.
8	Küp	%2 Triton X-100 (dH ₂ O) ile 48 saat ve ardından %0,1 NH ₄ OH (dH ₂ O) ile 24 saat muamele edildi.
9	Küp	%1 SDS (dH ₂ O) ile 24 saat muamele edildi ve ardından dH ₂ O ile durulandı.
10	Dilim	%1 SDS (dH ₂ O) ile 48 saat muamele edildi ve ardından dH ₂ O ile durulandı.
11	Küp	%0,1 SDS (dH ₂ O) ile 24 saat muamele edildi ve ardından dH ₂ O ile durulandı.

3.2.2 Deselülerize karaciğer dokularının karakterizasyonu

3.2.2.1 DNA içeriği analizleri

Deselülerize edildikten sonra liyofilizatör ile kurutulan numuneler DNA ekstraksiyonu amacıyla homojenize edildi ve eş miktarlarda örnekler (10 mg) tartılarak mikrosantrifüj tüplerine alındı. Ekstraksiyon için 20 mg/mL Proteinaz K ihtiva eden 1 mL ekstraksiyon tamponu (10mM Trizma (Tris-HCl), 50 mM potasyum klorür (KCl), 1,5 mM magnezyum klorür (MgCl₂), %0,5 Tween-20) eklendi. Akabinde, 48 saat boyunca 55°C'de vortekslendi. Süre sonunda, örnekler 4°C'de 3000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant toplandı. Ardından, 1 mL 25:24:1 Fenol:Kloroform:İzoamil alkol çözeltisi mikrosantrifüj tüplerine eklendi 4°C'de 3000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant toplandı. Süpernatant üzerine 200 µL 3 M sodyum asetat (pH 5,5) ve 500 µL %95 etil alkol eklenerek -80°C'de 20 dakika bekletildi daha sonra 30 dakika 37°C'de çözdürüldü ve daha sonra 25°C'de 10000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı. Toplanan pellet 100 µL steril su ile seyreltildi ve NanoDrop One, (Thermo Scientific, Delaware, ABD) ile spektrofotometrik ölçümler alınarak ortalama DNA konsantrasyonları tayin edildi. Herhangi bir işleme maruz bırakılmamış doğal karaciğer dokusu kontrol olarak çalışıldı.

3.2.2.2 Histokimyasal analizler

Histoloji analizleri için deselülerizasyon işlemi sonrası liyofilize edilen numuneler %2,5 gluteraldehit (suda) çözeltisi ile tespit edildi. Tespit sonrasında numuneler 0,1 M Potasyum fosfat tamponunda 10 dakika bekletildi ve daha sonra dondurma tamponu ile (%0,1 potasyum fosfat + 50 mL dH₂O + 15 g sakkaroz) 15-20 dakika muamele edildi. Tampon uygulamasını takiben doku dondurma çözeltisi ile (Tissue Freezing Medium, Leica, Wetzlar, Almanya) 15 dakika boyunca muamele edildi ve kriyo kesit işlemi için donduruldu. Kriyo-mikrotom ile 8-10 µm kalınlığındaki kesitler lamlara alınıp boyanmaya hazır hale getirildi.

Lamlara alınıp boyanmaya hazır hale getirilen kesitler Mayer metoduna göre Hematoksilin ve Eosin boyaması yapıldı. Lamdaki preparatlara 2 dakika saf su uygulandıktan sonra %95 etanol ile 5 dakika muamele edildi ve ardından 8 dakika Hematoksilin uygulandı. Daha sonra preparatlar %95 etanol ile 5 dakika muamele edilerek yıkandıktan sonra fazla Hematoksilin'in bertaraf edilmesi sağlandı. Bunun ardından ise 4 dakika Eosin uygulandı ve daha sonra fazla boya kalıntısı tekrardan %95 etanol ile 5 dakika muamele edilerek giderildi. Son aşamada Leica marka ışık mikroskobu altında analiz edilerek görüntüler toplandı.

3.2.2.3 Sülfatlanmış glikozaminoglikan (sGAG) içeriği analizleri

Liyofilize formdaki saf ve deselülerize karaciğer dokularında eş miktarda örnekler tartılarak 0,1 mg/mL papain tamponu (0,2 M sodyum fosfat tamponu, 8 mg/mL sodyum asetat, 4 mg/mL EDTA, 0,8 mg/mL sistein HCl) ile sGAG ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla örnekler tüplere alındı ve 1 mL papain ekstraksiyon tamponu mikrosantrifüj tüplerine eklendi. Numuneler mikrosantrifüj tüplerinde 65°C'de 3 saat vorteksenerek sindirim gerçekleştirildi. Tüpler 10000×g'de 10 dakika santrifüjlendi. Üreticinin kit protokolleri doğrultusunda 100 µL süpernatant alındı ve üzerine 1 mL Blyscan Boya Reaktifi eklendi. Glikozaminoglikan standartları için 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg ve 5 µg içeren referans standart solüsyonu kullanıldı. Örnekler 30 dakika boyunca ThermoMixer C (Eppendorf, Hamburg, Almanya) mekanik çalkalayıcıya yerleştirilerek hafifçe çalkalandı. Daha sonra 12000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edildi ve bağlanmamış boyanın uzaklaştırılması amacıyla süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. sGAG bağlı boyanın serbest bırakılması ve geri kazanımı için 0,5 mL Blyscan Çözme Reaktifi eklendi ve vorteksenerek bağlı boyanın çözünmesi sağlandı. Çözünmeyi takiben 200 µL alınarak SpectraMax M5 spektrofotometrede (Molecular Devices, CA, ABD) absorbans değeri 656 nm'de ölçümler alındı. Standart eğriye karşı örneklerin sGAG içerikleri tayin edildi.

3.2.2.4 Toplam protein içeriğinin belirlenmesi

Toplam protein analizi için ilk önce numunelerin küçük parçalara ayrılması sağlandı. Ekstraksiyon için 10 mg numune tartılarak 1 mL RIPA lizis ve ekstraksiyon tamponuyla (50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, %1 Triton-X 100, %0,25 deoksikolik asit ve %0,1 SDS, Proteaz inhibitör kokteyli) muamele edildi. Ardından 4°C'ye ayarlı ThermoMixer C (Eppendorf, Hamburg, Almanya) mekanik çalkalama ile 30 dakika ekstraksiyona bırakıldı. Daha sonra numuneler 13000×g'de 15 dakika santrifüj edildi. Ardından süpernatant dikkatlice toplandı ve QuantiPro BCA protein analiz kiti talimatları doğrultusunda analiz gerçekleştirildi. Bu amaçla, eş oranlarda süpernatant ve QuantiPro Çalışma Reaktifi etkileştirildi ve 1 saat boyunca 60°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her numuneden 200 µL alınarak 562 nm'de absorbans ölçümleri yapılarak standarda karşı toplam protein konsantrasyonu tayin edildi.

3.2.2.5 Kollajen içeriğinin belirlenmesi

Kollajen içeriğinin analizi kapsamında Sircol™ (Biocolor, Carrickfergus, Büyük Britanya) kiti kullanıldı. Bu çerçevede, ilk aşamada liyofilize formdaki doğal karaciğer dokusu ve deselülerize dokulardan ekstraksiyon için 10 mg numune tartılarak mikrosantrifüj tüplerine alındı. Ardından 1 mL 0,1 mg/mL pepsin çözeltisi (0,5 M asetik asit) örnekler üzerine eklendi ve 48 saat boyunca 4°C'ye ayarlı Eppendorf marka ThermoMixer C model mekanik karıştırıcıda (Hamburg, Almanya) ekstraksiyon sürdürüldü. Süre sonunda her bir numuneden 100 µL alınarak 1 mL Sircol boya reaktifi ile 30 dakika boyunca hafif çalkalamada etkileştirildi. Mekanik karıştırma ardından 12000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 750 µL Sircol asit-tuz yıkama reaktifi eklendi ve 12000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 250 µL Sircol alkali reaktifi ile etkileştirilerek boyanın çözünmesi sağlandı. Elde edilen süspansiyondan 200 µL alınarak 96 kuyucuklu kültür kabına aktarıldı ve SpectraMax M5 spektrofotometrede

(Molecular Devices, CA, ABD) absorbans değeri 555 nm’de ölçüldü. Standart eğriden örneklerin bilinmeyen kollajen konsantrasyonları belirlendi.

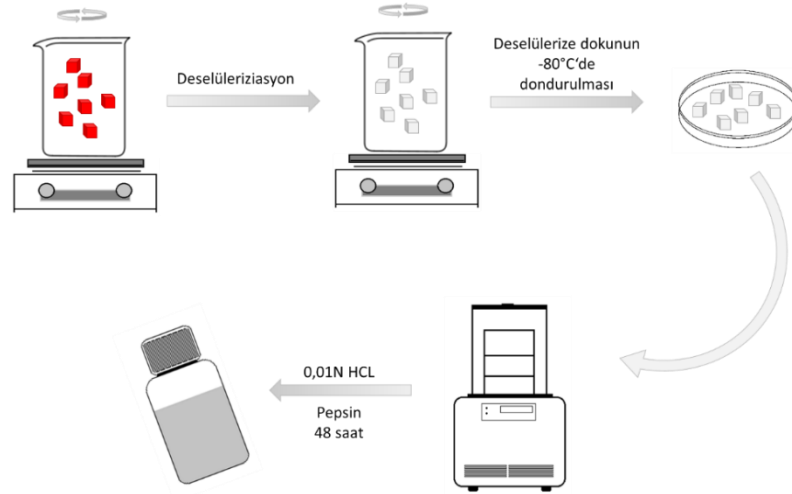
3.2.2.6 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizleri

Deselülerize karaciğer HDM’sinin yüzey morfolojisini mikrometre skalasında belirlemek amacıyla SEM analizler gerçekleştirildi. Bu amaçla örnekler numune tablasına yapıştırılan iletken karbon bantlar üzerine sabitlendi. Ankara Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü bünyesinde görüntülenmek üzere Emitech K550X model numaralı cihazla altın kaplandı ve Zeiss marka EVO 40 model SEM cihazı ile 10 kV altında örnekler analiz edildi.

3.2.3 Deselülerize karaciğer temelli biyoaktif hidrojel üretimi ve karakterizasyonu

3.2.3.1 Hepatik doku temelli hidrojel üretimi

Deselülerizasyonun ardından liyofilize edilerek kurutulmuş örnekler homojenize edildi ve ardından 1 mg/mL Pepsin çözeltisi (0,01N HCl) içinde 48 saat süre ile manyetik karıştırıcı altında sindirim işlemi uygulandı. Süre sonunda elde edilen örnekler 4°C deki 1N NaOH ile buz üzerinde pH 7,4 olacak şekilde nötralize edildi. Nötralizasyon sonrasında 10x PBS eklenerek tuz dengesi sağlandı (**Şekil 3.2**).



Şekil 3.2 Sığır karaciğer dokusunun jelleştirilme aşamalarına ait şematik gösterim

3.2.3.2 Türbidimetrik analizler

Türbidimetrik analiz için deselülerize formda sindirim işlemi tamamlanmış olan jel formundaki deselülerize karaciğer HDM'sinden 200'er µL örnekler alınarak 96 kuyucuklu kültür kabına transfer edildi. Önceden 37°C'ye ayarlı SpectraMax M5 spektrofotometrede (Molecular Devices, CA, ABD) 405 nm dalgaboyunda 2 dakika aralıklarla 90 veya 120 dakika boyunca ölçüm alındı. Elde edilen absorbans değerleri normalize edilerek değerler grafiğe aktarıldı (**Denklem 3.1**).

Denklem 3.1

$$Normalize\ Absorbans\ (NA) = \frac{A - A_0}{A_{max} - A_0}$$

3.2.4 Deselülerize karaciğer 3B doku iskelesi üretim ve karakterizasyonu

3.2.4.1 Hepatik doku temelli 3B doku iskelesi üretimi

Hepatik doku temelli 3B doku iskelelerin üretimi için etkin protokollerden elde edilen 10 mg/mL, 15 mg/mL ve 20 mg/mL konsantrasyonlarında 0,01N HCl içerisinde 48 saat pepsin sindirimiyle hazırlanan pre-jelin nötralizasyonu 1N NaOH ile pH 7,4 getirilerek sağlandı. Ardından tuz dengesinin sağlanması için 10x PBS eklendi ve 24 kuyucuklu

kültür kabına alınarak 37°C de 80-90 dakika inkübe edildi. Stabilize yapıdaki jel formundaki numuneler liyofilize edilmek üzere -80°C'deki dondurucuda 16 saat bekletildi. Daha sonra 24 saat boyunca liyofilize edilerek nihai sünger formunda HDM temelli 3B iskeleler elde edildi.

3.2.4.2 Morfolojik analizler (SEM)

Hepatik doku temelli 3B doku iskelelerin yüzey morfolojisini mikrometre skalasında belirlemek amacıyla etkin deselüerizasyon protokolleri ile geliştirilen 10 mg/mL, 15 mg/mL ve 20 mg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan HDM temelli 3B doku iskeleleri numune tablasına yapıştırılan iletken karbon bantlar üzerine sabitlendi. Ankara Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü bünyesinde görüntülenmek üzere Emitech K550X model numaralı cihazla altın kaplandı ve Zeiss marka EVO 40 model SEM cihazı ile analizler gerçekleştirildi.

3.2.4.3 Kimyasal analizler (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi, FT-IR)

FTIR analizi deselüerize karaciğer HDM temelli 3B iskelelerin kimyasal yapısının karakterizasyonu amacıyla kontrol grubu olarak doğal karaciğer, etkin deselüerizasyon yöntemleri ile geliştirilen iskeleler analize alındı. Bu amaçla kontrol ve HDM temelli 3B doku iskelelerinin homojenize edilerek toz formunda toplandı. Akabinde, örneklerin analizi Shimadzu marka IRAffinity model FTIR cihazı ile 600-4000 cm⁻¹ aralığında zayıflatılmış toplam yansıma (attenuated toplam reflection, ATR) ünitesi ile gerçekleştirildi.

3.2.4.4 Mekanik analizler

Deselüerize karaciğer HDM süngerler tek eksenli basma testi yöntemiyle Shimadzu marka Autograph AGS-X model (Kyoto, Japonya) mekanik test cihazı ile basma testine tabii tutuldu. Basma testi analizleri için etkin deselüerizasyon protokolleri çerçevesinde elde edilen farklı HDM konsantrasyonlarındaki (10 mg/mL, 15 mg/mL ve 20 mg/mL)

3B hepatik doku iskeleleri en az üç tekrar olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan 1 cm yüksekliğinde ve 1,5 cm çapında olan disk şeklindeki 3B doku iskeleleri mekanik test cihazı çenelerinin merkezine yerleştirildi. Sistemin merkezine yerleştirilen sünger iskeleler üzerine 1 mm/dakika hızla, %80 sıkıştırma uygulanarak basma testi gerçekleştirildi.

3.2.4.5 Su tutma ve bozunma analizleri

Su tutma oranı hesaplanması, farklı konsantrasyonlarda deselülerize karaciğer HDM ihtiva eden (10 mg/mL, 15 mg/mL ve 20 mg/mL) 3B doku iskelesi numuneleri kullanılarak gerçekleştirildi. Numunelerin kuru ağırlıkları (K_0) tartıldı. Su tutma davranışını gözlemlemek için numuneler 37°C’de, pH’ı 7,4 olan PBS tamponu içerisinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda numuneler hafifçe saf su ile durulandı ve yüzeylerdeki fazla su filtre kağıdına emdirildikten sonra ıslak ağırlık (K_1) ölçüldü.

Denklem 3.2 kullanılarak veriler grafiğe aktarıldı.

Denklem 3.2.

$$Su\ tutma\ (\%) = \frac{K_1 - K_0}{K_0} \times 100$$

Biyobozunurluk çalışmaları kapsamında, üretilen doku iskelelerinin ilk ağırlıkları (K_i) ölçülerek 37°C’de, pH’ı 7,4 olan PBS tamponu içerisinde inkübe edildi. İskeleler, 7. gün zaman noktasında ortamdan alınarak yüzeyindeki tuzların uzaklaştırılması amacıyla nazikçe saf su ile durulandı ve daha sonra liyofilize edildi. Liyofilizasyondan sonra tartılarak son ağırlıkları (K_s) belirlendi ve iskelelerin biyobozunurluk hesaplamaları için **Denklem 3.3** kullanılarak veriler grafiğe aktarıldı.

Denklem 3.3

$$K\ddot{u}tle\ kayb\ (\%) = \frac{K_i - K_s}{K_i} \times 100$$

3.2.4.6 Termal analizler (TGA)

Farklı konsantrasyonlarda deselülerize karaciğer HDM ihtiva eden 3B doku iskeleleri (10 mg/mL, 15 mg/mL ve 20 mg/mL) hazırlanıp TGA analizine tabii tutuldu. TGA analizleri Ankara Üniversitesi Schimadzu DTG-60/60 TGA cihazı ile azot ortamında, 25°C - 600°C sıcaklık aralığında, 10°C/dakika ısıtma hızı ile ölçüldü.

3.2.4.7 Biyolojik analizler (*In Vitro* sitotoksisite testi)

Çalışma kapsamında ayrıca 3B hepatik doku iskelelerinin biyouyumluluğunun değerlendirilmesi amacıyla *in vitro* hücre kültürü temelli indirekt sitotoksisite çalışmaları gerçekleştirildi. Protokol 9 (15 mg/mL) ve Protokol 11 (15mg/mL)'e ait 3B hepatik doku iskelelerinden eş boyut ve ağırlıklarda örnekler alınarak UV ile steril edildi (254 nm). İndirekt sitotoksisite çalışmaları için ticari olarak temin edilen insan dermal fibroblast hücreleri (ATCC, PCS-201-012) kullanıldı. Hücre canlılığı, mitokondriyel dehidrogenaz aktivitesindeki değişimin belirlenmesi esasına dayanan MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] yöntemi ile tayin edildi. Ekstraksiyon amacıyla hazırlanan iskeleleri besiyeri içerisinde %5 CO₂, >90% nem ve 37°C sıcaklığa ayarlı karbondioksit ortamında 24 saat süre ile etkileştirildi. Süre sonunda numune ile etkileştirilen besiyeri toplandı ve kültüre adapte edilmiş olan hücreler üzerine eklendi. Ardından kültür 48 saat sürdürüldü ve hücre canlılığı analiz edildi. Bu amaçla, hücreler ile muamele edilen ekstrakte besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve steril PBS ile hücre ekili kuyucuklar yıkandı. Kültür ortamına 1:10 oranında besiyeri ile seyreltilen MTT reaktifi eklenerek 4 saat inkübe edildi. Ardından, oluşan formazan kristalleri çözücü reaktifi (HCl/izopropanol) ile muamele edilerek çözüldü ve 570 nm dalgaboyuna ayarlı SpectraMax M5 spektrofotometre ile (Molecular Devices, CA, ABD) absorbans ölçümü alındı. Pozitif kontrol olarak fenol ve negatif kontrol olarak standart kültür besiyeri kullanıldı.

3.2.5 İstatistiksel Analizler

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneylerden elde edilen bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde ve grafiklerin çizilmesinde GraphPad Prism 7 programı kullanıldı. Çalışmalardaki bulgular tek yönlü ve çift yönlü varyans analizi (ANOVA) gerçekleştirilerek analiz edildi ve gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi için Post-Hoc testinden Tukey testi gerçekleştirildi.

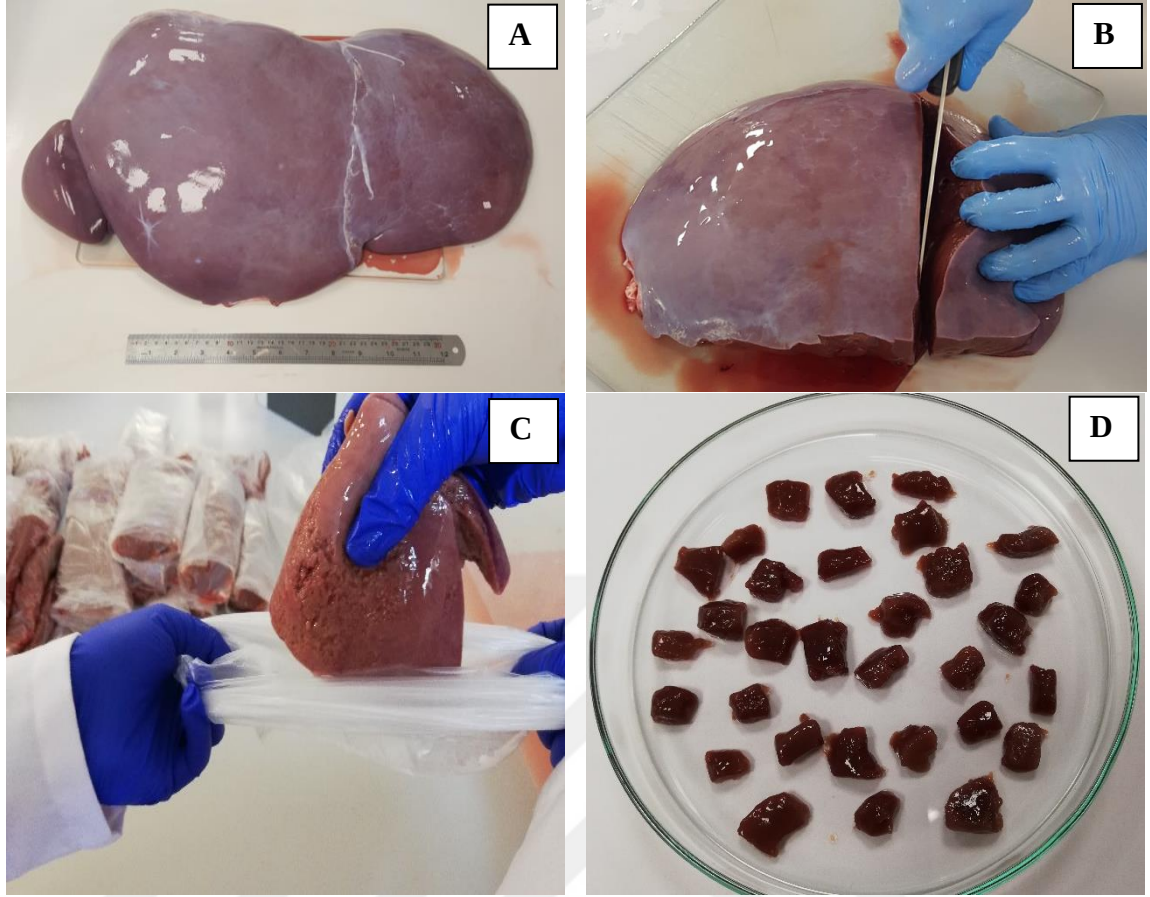


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Deselülerize Karaciğer Dokularının Karakterizasyonuna Ait Bulgular

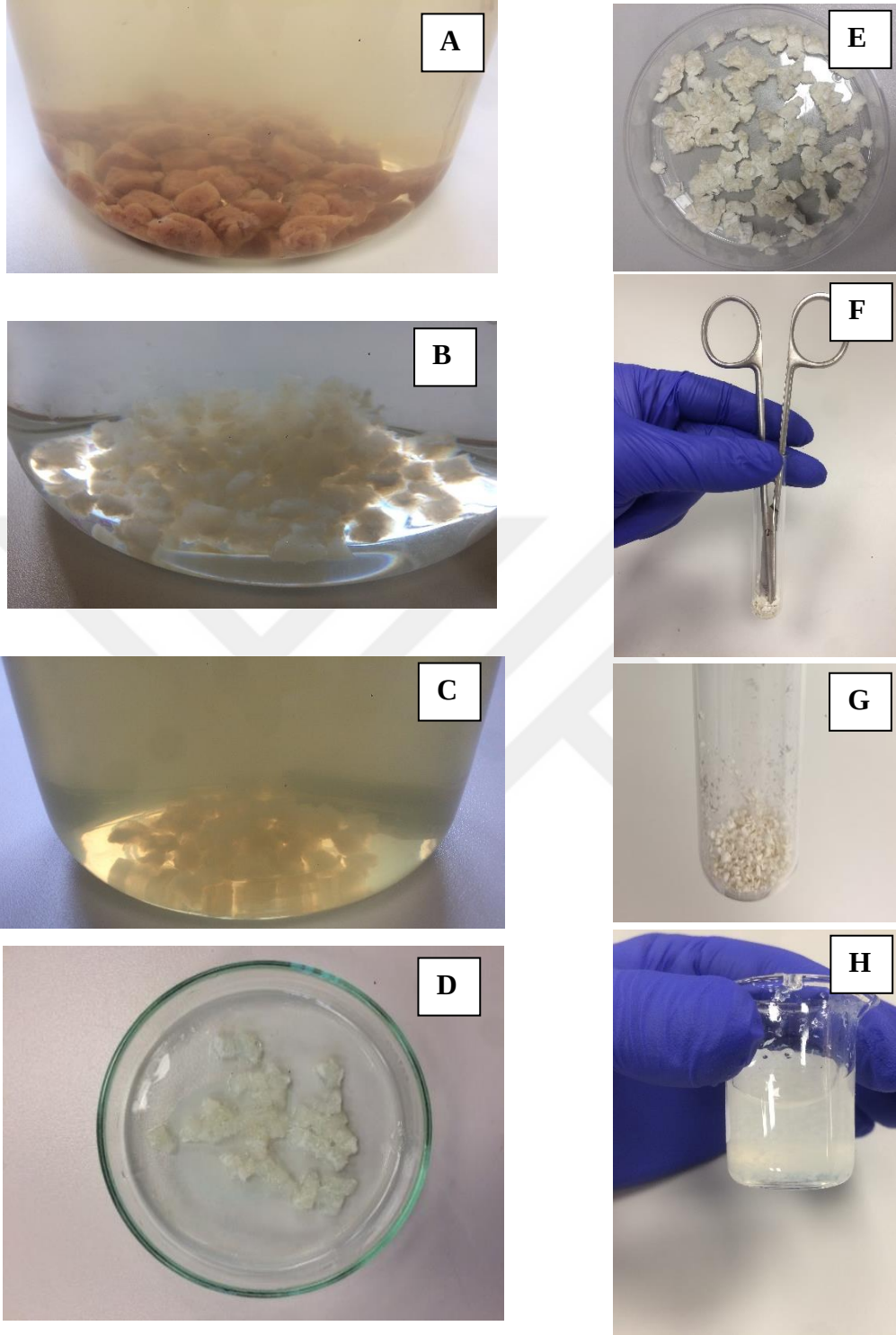
Çalışmalarda kullanılan sığır karaciğeri, veteriner hekim kontrolünde Ankara Et ve Süt Kurumu Kesim Tesisindeki sağlıklı sığırın kesimin ardından, bir bütün halinde, yaklaşık 4°C olan %0,9 serum fizyolojikle (SF) dolu kaplarla laboratuvara taşınması gerçekleştirildi (**Şekil 4.1.A**). İlk başta bir bütün haldeki karaciğerde mevcut bulunan kanın uzaklaştırılması için SF ile muamele edilerek iyice yıkandı ve ana damarlar, yağ dokusu ve karaciğerin dışındaki peritoneal zar yapısı gibi bazı bağ doku elemanları bertaraf edildi (**Şekil 4.1.B**). Daha sonra 10-15 cm genişlikte ve 1-2 cm kalınlığındaki boyutlarda kesilip 3-4 kez daha SF ile iyice yıkandı ve daha sonra paketlenerek -80°C'deki dondurucuda muhafaza edilmek üzere kaldırıldı (**Şekil 4.1.C**). Deselülerizasyona başlamadan önce küp ve dilim şeklinde parçalara ayrıldı (**Şekil 4.1.D**).

Deselülerizasyon aşamasına ait uygulanan deselülerizasyon çözeltisinin eklenmesi, tazelenmesi ve deselülerizasyon aşamasının son durumu (**Şekil 4.2.A, B ve C**), durulama işlemi sonrası durumu (**Şekil 4.2.D**), liyofilizasyon sonrası durumu, numunelerin parçalanması ve jelleştirilmesi aşamaları fotoğraflanmıştır (**Şekil 4.2.E-H**).



Şekil 4.1 Sığır kesimin ardından, bütün haldeki karaciğerin muhafazası ve kullanımına ait görseller

A) Bütün haldeki karaciğer, B) İstenmeyen parçaların uzaklaştırılması ve dondurulmak üzere parçalara ayrılması, C) SF ile yıkanarak kanın uzaklaştırılması sonrası paketlenme, D) Karaciğerin deselülerize edilmeden önceki küp ve dilim şeklinde parçalara ayrılmış görüntüsü

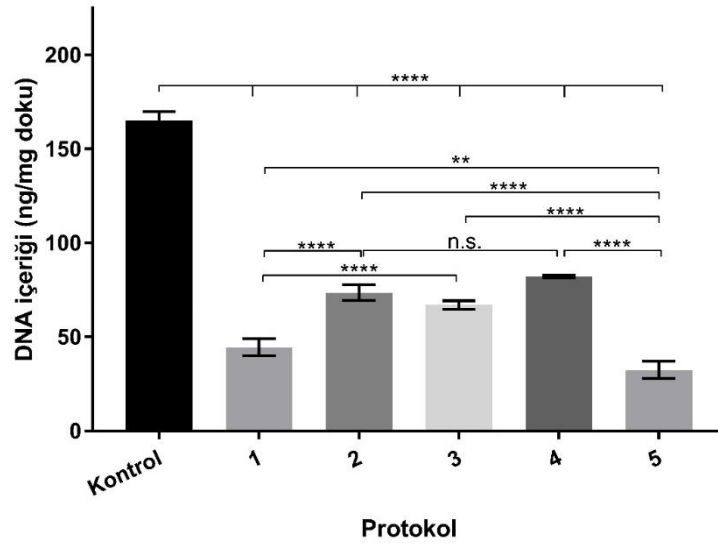


Şekil 4.2 Temsili olarak seçilen Protokol 9'a ait makroskopik görseller

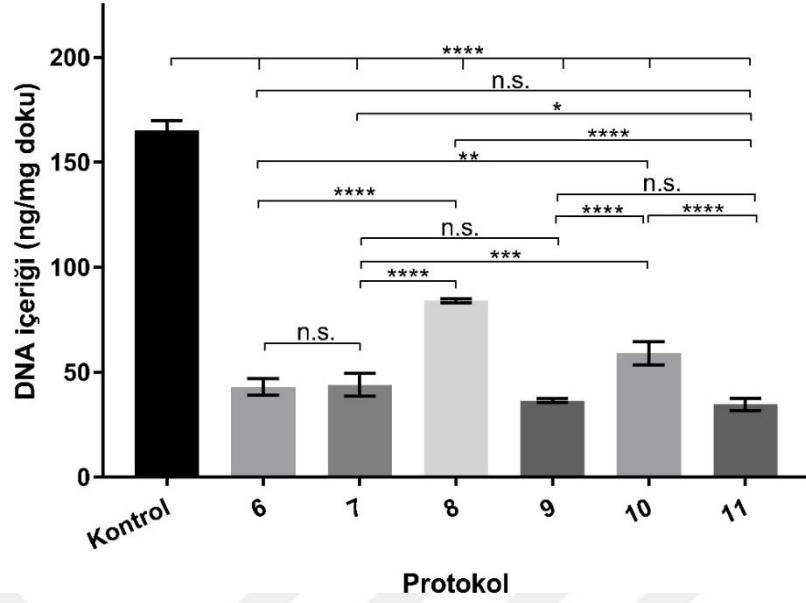
A) %1 SDS ile muamelede 0. saat; B) %1 SDS ile muamelede 12. saat sonunda çözeltinin tazelenmesi; C) %1 SDS ile muamelede 24. saat; D) Durulanma sonrası; E) Liyofilize edilmesi; F) Parçalanması; G) Parçalanmış dkHDM ve H) dkHDM hidrojeli

4.1.1 DNA içeriği analizleri bulguları

Bu tez çalışması kapsamında deselülerizasyon etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla dkHDM'sinden DNA ekstraksiyonu ve miktarlarının spektrofotometrik ölçümleri alınmıştır ve ölçümler neticesinde elde edilen veriler **şekil 4.3** ve **şekil 4.4**'de görüldüğü gibi grafiğe aktarılmıştır. Gerçekleştirilen DNA içeriği analizlerinde doğal sığır karaciğeri ve çalışmadaki 11 farklı protokol karşılaştırılmıştır. En etkili protokolün, içeriğindeki DNA'nın %80,34'ünü bertaraf eden 5 numaralı protokol ($32,46 \pm 4,59$ ng/mg), daha sonra %79,03'sini bertaraf eden 11 numaralı protokol ($34,61 \pm 3,04$ ng/mg) ve ardından %77,9'unu bertaraf eden 9 numaralı protokol ($36,50 \pm 0,86$ ng/mg) olduğu belirlenmiştir. Bunu sırasıyla Protokol 6 ($43,06 \pm 3,89$), Protokol 7 ($43,97 \pm 5,44$ ng/mg), Protokol 1 ($44,47 \pm 4,60$ ng/mg), Protokol 10 ($58,99 \pm 5,43$ ng/mg), Protokol 3 ($67,08 \pm 2,26$ ng/mg), Protokol 2 ($73,58 \pm 4,17$ ng/mg), Protokol 4 ($82,13 \pm 0,83$ ng/mg) ve Protokol 8 ($84,01 \pm 1,06$ ng/mg) takip etmiştir.



Şekil 4.3 Uygulanan deselülerizasyon protokolleri sonrasında DNA içeriğinin birbirleri arasında karşılaştırılması (Protokol 1 - 5 arası)
(**p<0.01, ****p<0,0001 n:4)

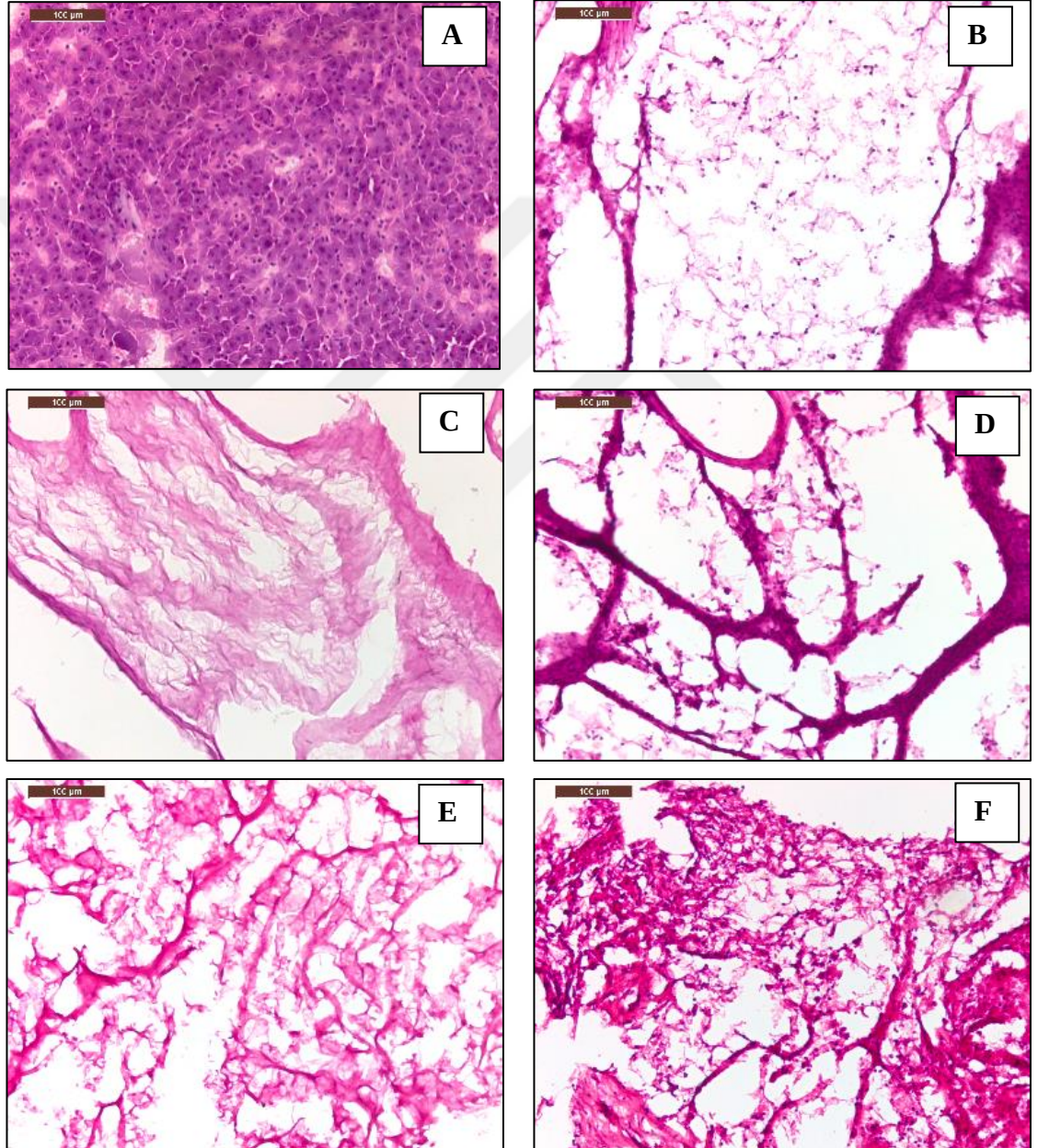


Şekil 4.4 Uygulanan deselülerizasyon protokolleri sonrasında DNA içeriğinin birbirleri arasında karşılaştırılması (Protokol 6 - 11 arası)
(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 n:4)

4.1.2 Histokimyasal analiz bulguları

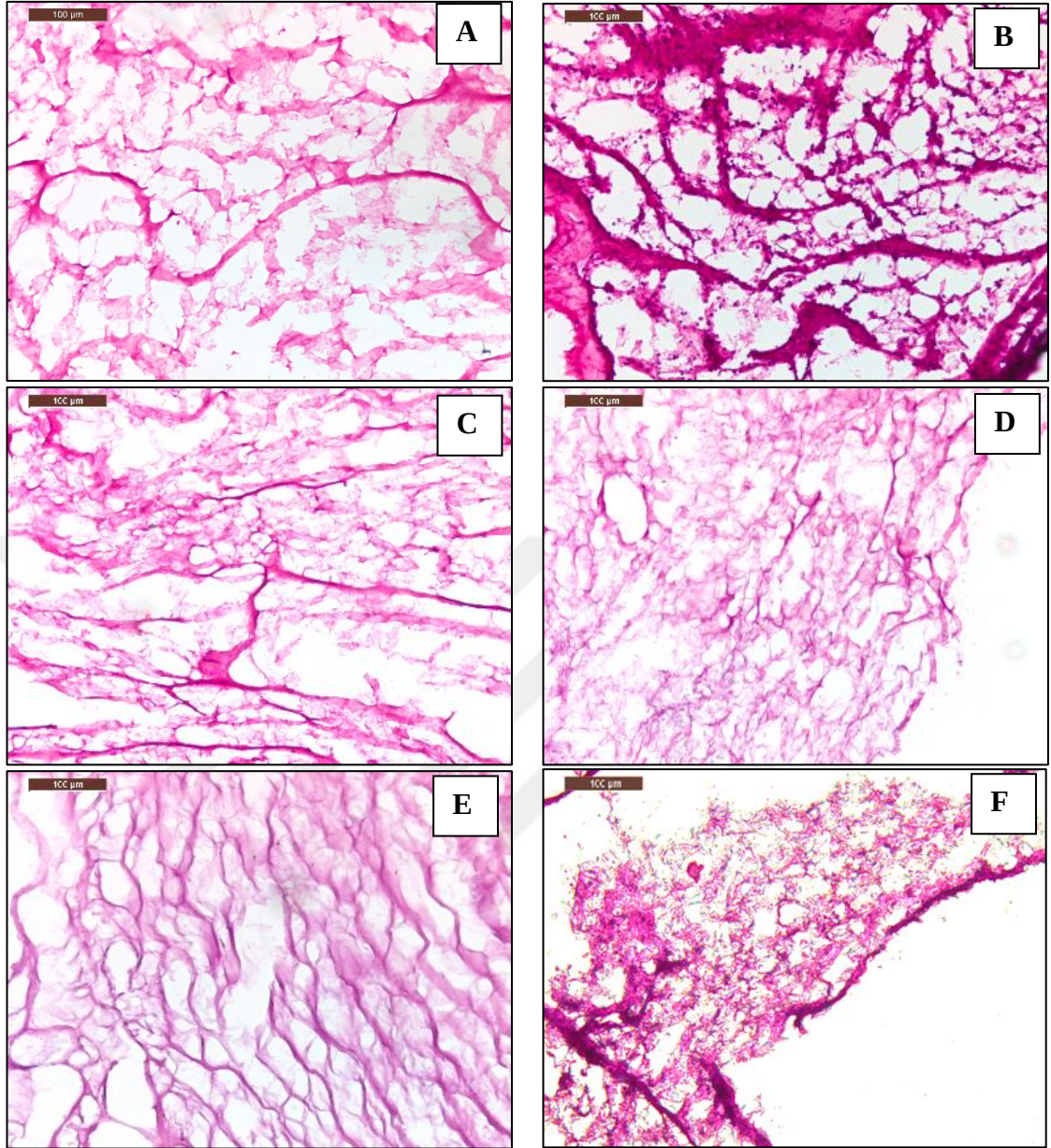
Histokimyasal analizler, deselülerizasyonun etkin bir biçimde gerçekleştiğini gösteren öncelikli parametrelerden biridir. Bu çalışmada Hematoksilin ve Eosin (H&E) boyası tercih edilmiş olup, dHDM içerisinde potansiyel hücresel bileşenlerin izlenmesi deselülerizasyonun değerlendirilmesi açısından önemli bir yer tutar (Şekil 4.5 ve 4.6). H&E ile boyanan dkHDM preparatları, hiçbir işleme tabi tutulmamış kontrol grubu olan doğal karaciğer dokusu ile karşılaştırılmıştır. Kontrol grubuna ait görüntülerde (Şekil 4.5.A) mavi-mor renk ile boyanan hücre çekirdeği ve kırmızı-pembe renkte hücre dışı matriks materyali dikkat çekmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında özellikle 2, 4, 6, 8, 9, 10 ve 11 numaralı protokollerde mavi-mor renkle boyanan hücre çekirdeğine rastlanmamıştır. Nitekim, sığır karaciğerinin %0,9 serum fizyolojik çözeltisiyle yıkandıktan ve ardından oda sıcaklığında %0,1 ve %1 SDS ile 24 veya %1 SDS ile 48 saat boyunca muamele edilmiş olan protokollerin kontrol grubu karaciğerle karşılaştırıldığında mavi-mor renkte oldukça belirgin görülen hücre çekirdeklerinin ciddi oranda uzaklaştırıldığı, buna karşın kırmızı-pembe renkte boyanmış olarak görülen HDM'nin belirgin bir şekilde korunduğu belirlenmiştir. Çalışılan protokoller

arasında en belirgin olarak SDS ile muamele edilmiş protokollerin histokimyasal açıdan etkin sonuç çıkardığı belirlenmiştir. Bununla birlikte Triton X-100 ile muamele edilen gruplarda HDM yapısının nispeten daha çok korunduğu buna karşın kesitlerde görüldüğü kadarıyla yer yer hücre çekirdeklerinin var olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5 ve 4.6).



Şekil 4.5 Deselülerize karaciğer dokularının H&E boyama sonuçları.

A) Doğal karaciğer dokusu; B) Protokol 1, C) Protokol 2, D) Protokol 3, E) Protokol 4 ve F) Protokol 5'e ait ışık mikroskobu görüntüleri (ölçek çubuğu: 100µm)



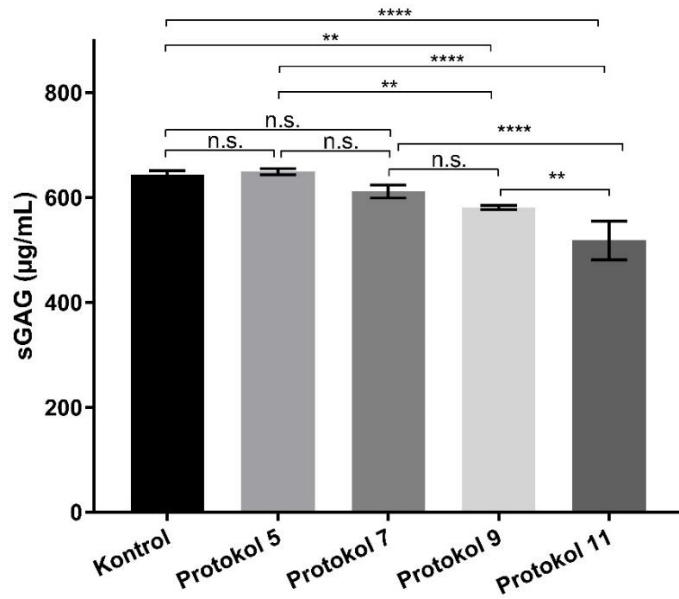
Şekil 4.6 Deselülerize karaciğer dokularının H&E boyamasına ait görüntüler.

A) Protokol 6, B) Protokol 7, C) Protokol 8, D) Protokol 9, E) Protokol 10 ve F) Protokol 11 (ölçek çubuğu: 100µm)

4.1.3 Sülfatlanmış glikozaminoglikan (sGAG) içeriği analiz bulguları

Deselülerize karaciğer hücre dışı matrisine ait histokimyasal analizler ve DNA içeriği analizlerinden elde edilen bulgular ışığında tercih edilen 4 protokol için (Protokol 5, 7, 9 ve 11) sGAG içeriği Blyscan™ (Biocolor, Carrickfergus, Büyük Britanya) kiti

kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Liyofilize edilerek kurutulmuş dkHDM tampon çözelti içerisinde Papain (P3125, Sigma, St. Louis, MO, ABD) kullanılarak ekstrakte edilmiş, akabinde 1,9-dimethyl-methylene blue boyası ile muamele edilmiş ve SpectraMax® M5 (Molecular Devices LLC, CA, ABD) marka spektrofotometre ile 656 nm dalgaboyunda ölçüm alınmıştır. Ölçümler neticesinde kontrol ile kıyaslandığında 5 numaralı protokol için %100,69±0,74; 7 numaralı protokol için %94,96±1,90; 9 numaralı protokol için %90,23±0,61 ve 11 numaralı protokol için %80,49±5,80 oranlarında sGAG içeriğinin korunduğu sonucuna varılmıştır. Sırasıyla kontrol grubu doğal karaciğer 644,23±7,18 mg/mL; 5 numaralı protokol 648,72±4,74 mg/mL; 7 numaralı protokol 611,79±12,26 mg/mL; 9 numaralı protokol 581,33±3,91 mg/mL ve 11 numaralı protokolde ise 518,55±37,29 mg/mL sGAG içeriği belirlenmiştir (Şekil 4.7).



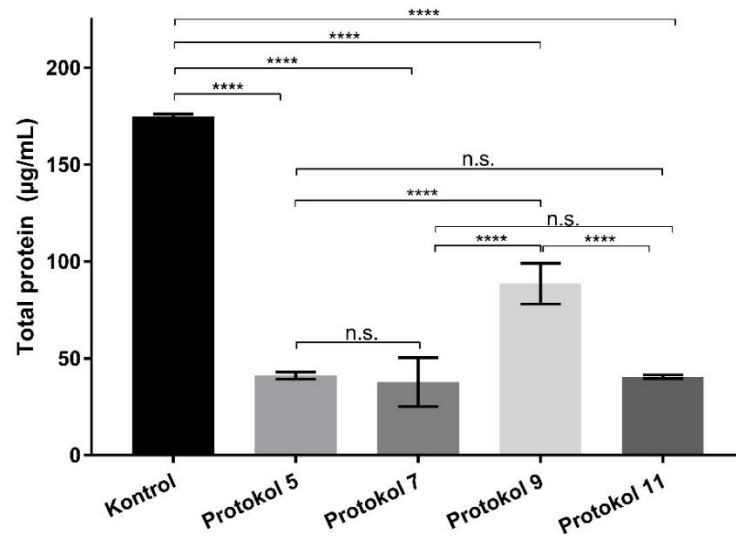
Şekil 4.7 Uygulanan deselülerizasyon protokolleri sonrasında sGAG içeriğinin birbirleri arasında ve doğal karaciğer ile karşılaştırılması (**p<0.01, ****p<0,0001 n:4)

Grafikten de anlaşılacağı üzere sGAG miktarı hiçbir işleme tabi tutulmamış kontrol grubu karaciğer ile karşılaştırdığında 5, 7, 9 ve 11 numaralı protokollerde uygulanan deselülerizasyonun, histolojik ve kantitatif DNA içeriği analizin etkin sonucuna paralel olarak aynı zamanda HDM'nin deterjan muamelesine karşı biyoaktif sGAG içeriğinde

ciddi bir kayıp olmadığı ve **şekil 4.7**'de belirtildiği gibi sGAG içeriğinin önemli miktarda korunduğu gösterilmektedir.

4.1.4 Toplam protein içeriği analiz bulguları

Sığır karaciğerinin deselülerizasyonu kapsamında gerçekleştirilen 11 farklı deselülerizasyon protokolünden dört tanesi (Protokol 5, 7, 9 ve 11), histokimyasal analizler ve DNA içeriği analizlerinden elde edilen bulgular ışında deselülerizasyon etkinliği en yüksek protokoller olarak belirlenmiştir. Bu dört protokol ve hiçbir işleme tabi tutulmayan kontrol grubu karaciğerle, deselülerize edilmiş karaciğerin HDM bileşenlerindeki proteinlere olan etkilerini karşılaştırmak amacıyla dkHDM'leri ve doğal karaciğer dokusu (kontrol) proteinaz inhibitörü ortamında ekstrakte edilmiş ve QuantiPro™ BCA tayin kiti (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, CA, ABD) kullanılarak Bikinkoninik (BCA) asit yöntemi ile tayin edilmiş ve spektrofotometrik ölçüm ile elde edilen kantitatif sonuçlar **şekil 4.8**'de görüldüğü gibi grafiğe aktarılmıştır.



Şekil 4.8 Uygulanan deselülerizasyon protokolleri sonrasında toplam protein miktarının doğal karaciğer ile karşılaştırılması (µg/mL)

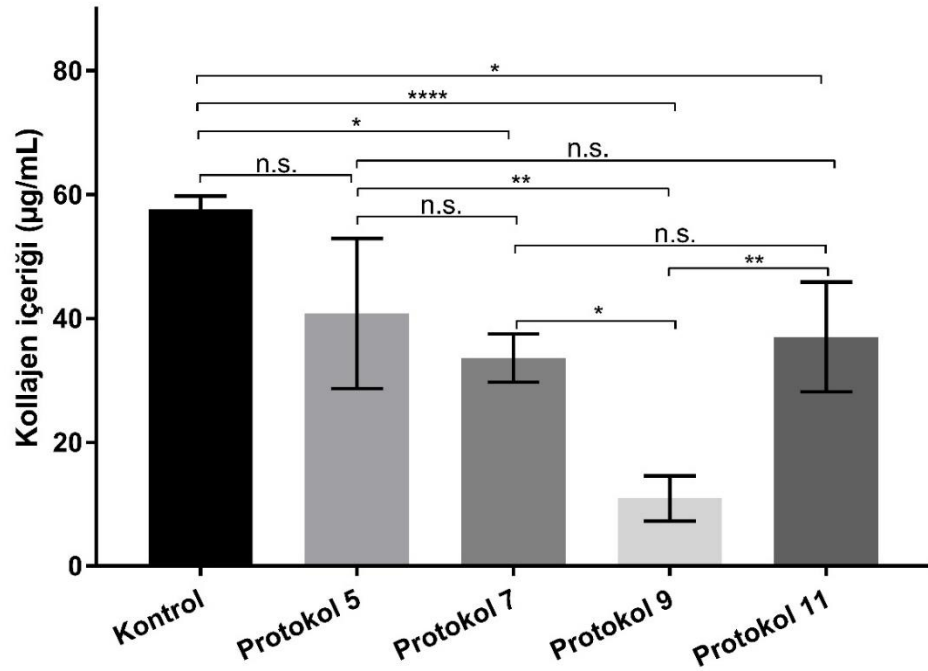
(****p<0,0001 n:4)

Elde edilen sonuçlara bakıldığında kontrol grubu doğal karaciğerin protein içeriği 174,65±1,44 µg/mL olarak belirlenmiştir. Buna kıyasla protokol 5, 7, 9 ve 11'de elde edilen sonuçlar sırasıyla 41,11±1,89 µg/mL; 37,69±12,65 µg/mL; 88,52±10,52 µg/mL

ve $40,56 \pm 0,91$ $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında 9 numaralı protokol kapsamında 24 saat %1 SDS ile muamele edilmiş karaciğerin toplam protein içeriğini korumada etkin olduğu akabinde, dilim şekilde kesilmiş ve %2 Triton X-100 ile 48 saat ardından %0,15 PAA ile 24 saat muamele edilmiş Protokol 5 ve daha sonra protokol 11 ve daha sonra bunu küp şekilde kesilmiş ve %2 Triton X-100 ile 48 saat ardından %0,15 PAA ile 24 saat muamele edilmiş Protokol 7 takip etmiştir.

4.1.5 Kollajen içeriği analiz bulguları

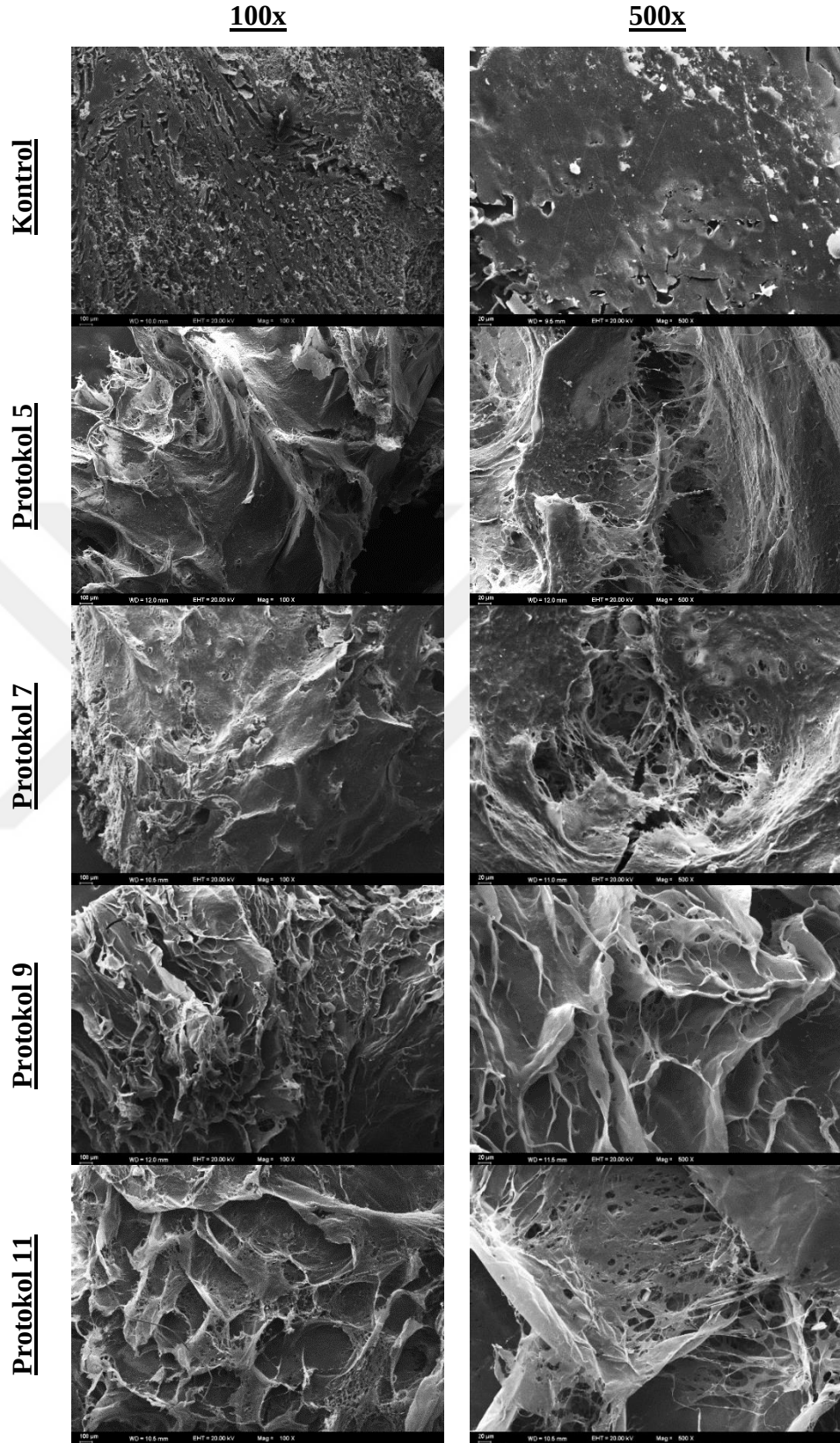
Deselülerize karaciğer hücre dışı matriksine ait histokimyasal analizler, DNA içeriği analizleri ve toplam protein analizinden elde edilen bulgular ışında tercih edilen dört farklı protokol için (Protokol 5, 7, 9 ve 11) kollajen içeriği analizleri gerçekleştirilmiştir. Deselülerizasyon protokollerinin her biri için elde edilen veriler, üreticinin standart kollajen çözeltisi referans alınarak belirlenmiş ve grafiğe aktarılmıştır (**Şekil 4.9**). Elde edilen bulgulara kontrol grubu doğal karaciğerdeki kollajen miktarının $57,60 \pm 2,16$ $\mu\text{g/mL}$ olduğu belirlenmiştir. Deselülerizasyon protokolleri karşılaştırıldığında, kollajen içeriğini %70,8 koruyarak, dilim şeklinde kesildikten sonra %2 Triton X-100 ile 48 saat daha sonra %0,15 PAA ile 24 saat muamele edilen 5 numaralı protokol $40,80 \pm 12,12$ $\mu\text{g/mL}$ kollajen içererek en fazla kollajen içeriğine sahip olan protokol olarak belirlenmiştir. Daha sonra kollajen içeriğinin %64,22'sini koruyan küp şeklinde kesilerek %0,1 SDS ile 24 saat muamele edilen 11 numaralı protokol $36,99 \pm 8,87$ $\mu\text{g/mL}$ kollajen içermektedir. Bunu daha sonra yine Triton X-100 ile muamele edilmiş 7 numaralı protokol içeriğinin %58,34'ünü koruyan ve içeriğinde $33,61 \pm 3,88$ $\mu\text{g/mL}$ kollajen bulunan protokol takip etmiştir. Diğer protokollerle kıyaslandığında kollajen içeriğini %18,94'ünü koruyan $10,91 \pm 3,67$ $\mu\text{g/mL}$ kollajen içeren 9 numaralı protokol, kollajen içeriği en fazla bozunmuş olan protokol olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9 Farklı protokoller ile deselülerize edilen karaciğer HDM'lerine ait toplam kollajen içeriği bulguları (Kontrol=Doğal karaciğer) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ n:3)

4.1.6 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analiz bulguları

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deselülerize sığır karaciğeri HDM'sinin yüzey morfolojisini mikrometre skalasında belirlemek amacıyla 100x ve 500x büyütmede kontrol grubu karaciğer, 5, 7, 9 ve 11 numaralı protokoller SEM analizine tabii tutulmuşlardır. Yapılan analizde deselülerizasyon sonrasında doğal doku bütünlüğünün bozulduğu öte yandan hücre dışı matriksin yüksek oranda yapısal olarak korunduğu görülmüştür. Şekil 4.10'da görüldüğü üzere kontrol grubu karaciğer ile karşılaştırıldığında deselülerizasyon sonrasında 5, 7, 9 ve 11 numaralı protokollerde dkHDM'lerinde çoğunlukla yüzey morfolojisinde bozulmalar olduğu, bazı bölgelerde gözenekli doğal HDM mimarisinin ortaya çıktığı gözlenmiştir.



Şekil 4.10 Liyofilize edilmiş dkHDM'lerine ait farklı büyütmelelerdeki elektron mikroskobu görüntüleri

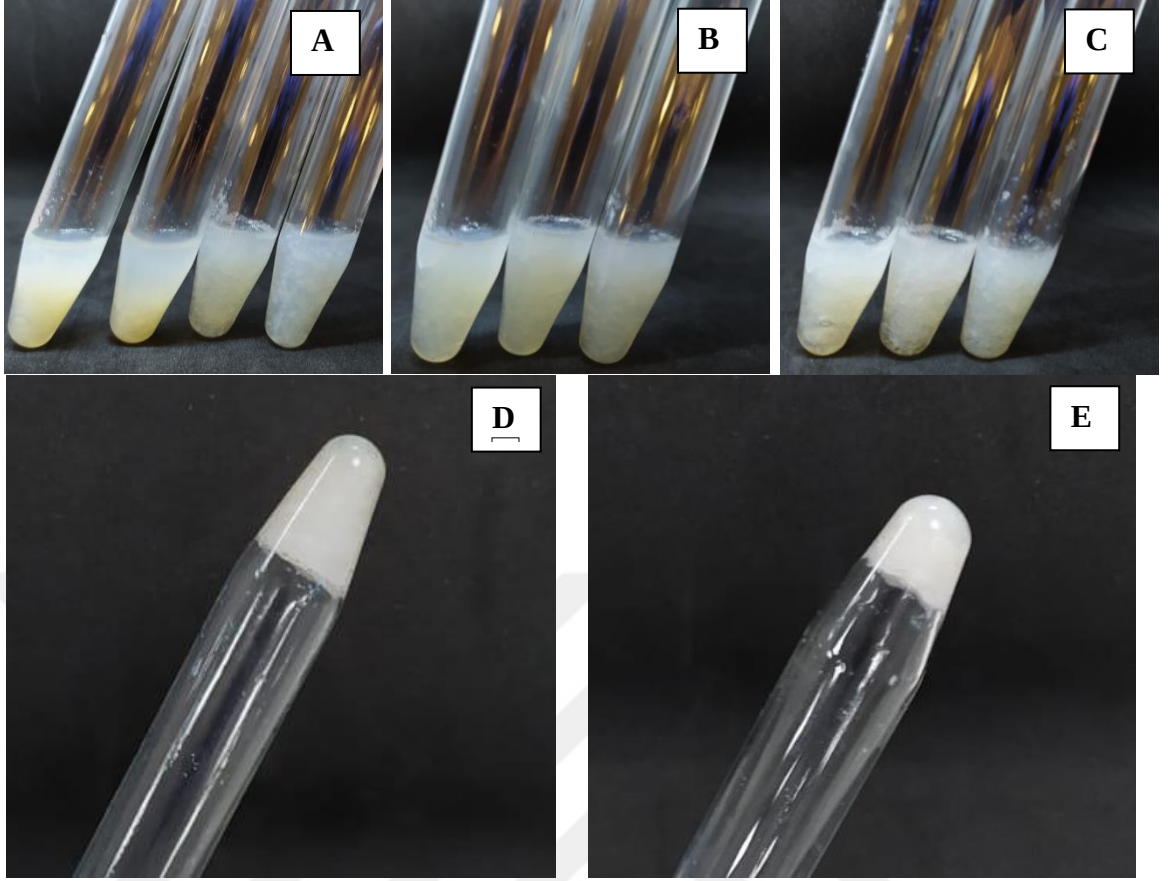
4.2 Deselülerize Karaciğer Temelli Biyoaktif Hidrojel Üretim ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular

4.2.1 Hepatik doku temelli hidrojellerin karakterizasyonuna ait bulgular

4.2.1.1 Makroskopik bulgular

Farklı protokoller kullanılarak deselülerize edilmiş karaciğer HDM'sine ait histolojik ve DNA içeriği birbiri ile kıyaslanmış; sGAG, toplam protein içeriği ve kollajen gibi biyoaktif içerikleri ve ayrıca mikro skalada morfolojik özellikleri göz önüne alındığında dkHDM jeli için aday protokoller 5, 7, 9 ve 11 olarak tespit edilmiş ve jelleştirilmek üzere pepsin ile sindirimi ve bunu takiben 37°C'de jelin katılaştırılmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışmalar neticesinde **şekil 4.11**'de görüldüğü gibi %2 Triton X-100 ile 48 saat muamele edilmiş ve ardından %0.15 PAA ile 24 saat muamele edilmiş sadece kesilme şekili bakımından farklı olan 5 ve 7 numaralı protokollerde deselülerizasyonun etkinliği ve biyoaktif içeriği konusunda umut vaadedici olmasına rağmen 48 saatlik asidik ortamda pepsin sindirimi ve sonrasında nötralizasyonunu takiben viskozitesinde bir artma görülmemiştir (**Şekil 4.11**). Buna kıyasla %1 ve %0,1 SDS ile 24 saat muamele edilerek elde edilen Protokol 9 ve Protokol 11 dkHDM'sinin asidik ortamda 48 boyunca pepsin sindirimi ve ardından pH 7,4'de nötralize edilmesi ardından 37°C'de katılaştırılması ile viskozitesi gözle görülür derecede arttığı belirlenmiştir (**Şekil 4.11.D ve E**) ve 3B sünger iskele üretimi için Protokol 9 ve 11'in uygun olduğu ve farklı konsantrasyonları ile hazırlanan jellerden elde edilecek iskelelerle çalışmaya devam edileceği kararı alınmıştır.



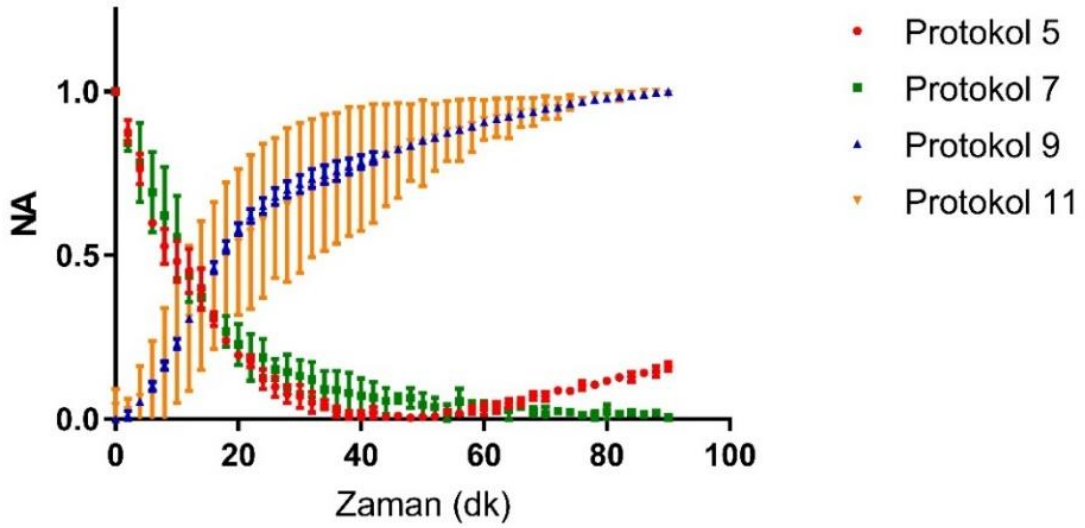
Şekil 4.11 Hepatik doku temelli hidrojel üretiminde vizkozitelerin karşılaştırılmasına ilişkin makroskopik görseller

A) Soldan sağa doğru Protokol 5, Protokol 7, Protokol 9 ve Protokol 11; B) Soldan sağa doğru Protokol 9 (10 mg/mL, 15 mg/mL ve 20 mg/mL); C) Soldan sağa doğru Protokol 11 (10 mg/mL, 15 mg/mL ve 20 mg/mL); D) Protokol 9 (15mg/mL) 37°C’de katılaştırılmış hali; E) Protokol 11 (15mg/mL) 37°C’de katılaştırılmış hali

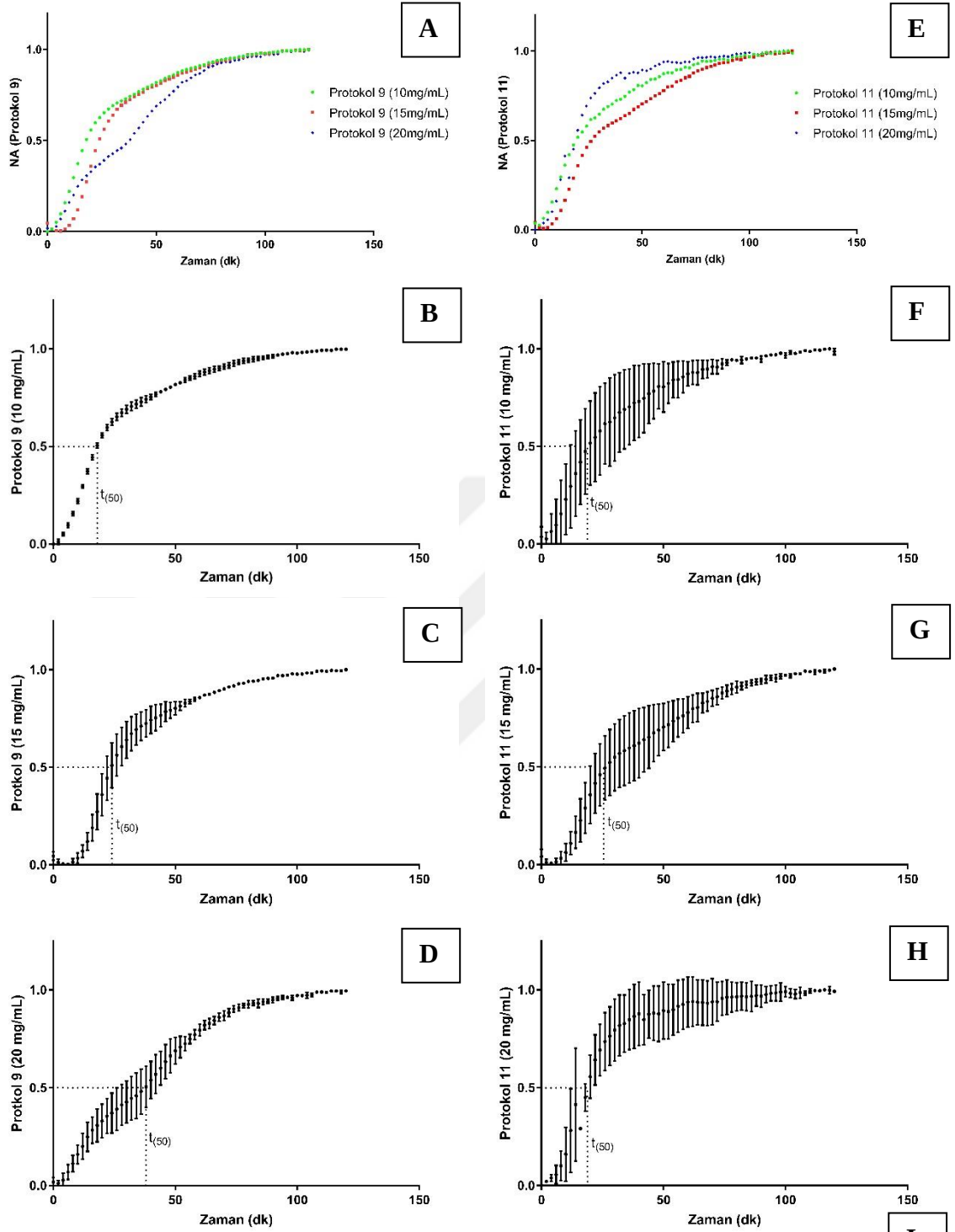
4.2.1.2 Turbidimetrik analiz bulguları

Turbidimetri, bilinen başlangıç şiddetine sahip bir ışık demetinin zayıflama derecesini ölçerek bulanıklığın ölçülmesi esasına dayanır (Lawler 2005). Yapılan çalışmada 5, 7, 9 ve 11 numaralı protokoller dkHDM’sinin asidik ortamda pepsin ile sindirilmesiyle elde edilen 10 mg/mL konsantrasyonlarındaki viskoz hidrojelın jelleşmesinin nicel olarak gözlenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda viskoz dkHDM’nin 504 nm dalga boyunda 4°C’den 37°C’ye artan sıcaklıkta 90 dakika boyunca 2 dakika aralıklarla ölçüm alınmıştır. Şekil 4.11.A’daki görselde de görüldüğü gibi 5 ve 7 numaralı protokollerde

çok düşük bir viskozite gözlenmiştir ve **şekil 4.12**'ye bakıldığında da absorbans değeri normalize edildiğinde karakteristik hiperbolik (t_{lag} fazı uzun süren çalışmalarda sigmoidal eğri ile karakterize edilir) bir eğri gözlenmemiştir. Hem 9 hem de 11 numaralı protokollerin her ikisi için de eğrinin platoya ulaştığı belirlenerek türbidimetrik jelleşme kinetiği açısından belirgin sonuçlar gözlenmiştir. Hem 9 hem de 11 numaralı protokoller için 10 mg/mL, 15 mg/mL ve 20 mg/mL konsantrasyonlarında çalışılmış ve 85-90'ıncı dakikalarda normalize absorbans değerinin platoya ulaştığı veya dkHDM jelinin 37°C'de katılaştığı izlenmiş ve **şekil 4.13**'daki gibi grafiğe aktarılmıştır.



Şekil 4.12 Protokol 5, 7, 9 ve 11'e ait dkHDM'nin 4°C-37°C türbidimetrik jelleşme kinetiği grafiği (10mg/mL olarak hazırlanmıştır)



	Protokol 9			Protokol 11		
	10 mg/mL	15 mg/mL	20 mg/mL	10 mg/mL	15 mg/mL	20 mg/mL
$t_{(50)}$ (dk)	18	24	38	20	26	19

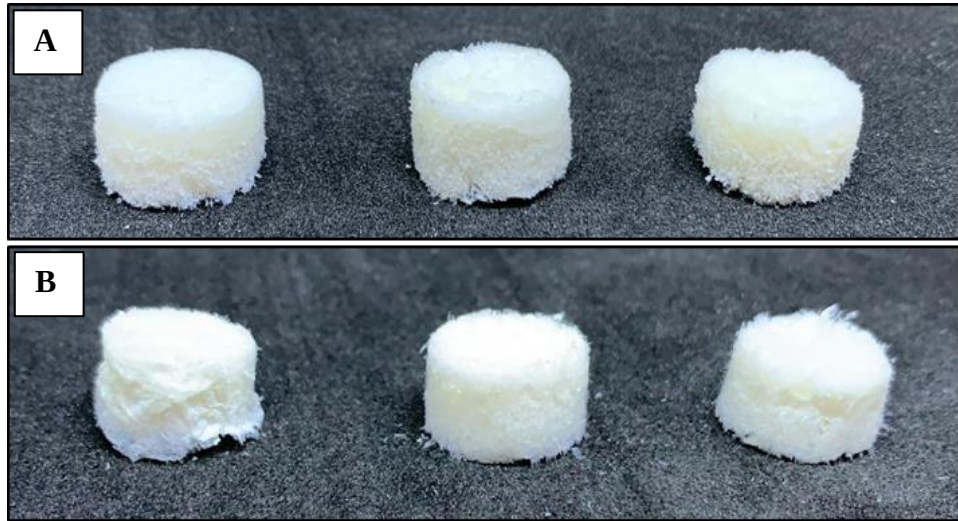
Şekil 4.13 dkHDM'nin 4°C-37°C türbidimetrik jelleşme kinetiği grafiği

A) Protokol 9 tüm gruplar B) Protokol 9 (10 mg/mL), C) Protokol 9 (15 mg/mL), D) Protokol 9 (20 mg/mL) E) Protokol 11 tüm gruplar, F) Protokol 11 (10 mg/mL), G) Protokol 11 (15 mg/mL), H) Protokol 11 (20 mg/mL) ve I) $t_{(50)}$ zaman noktası değerleri (n=2)

4.2.2 Deselülerize karaciğer 3B doku iskelesi üretim ve karakterizasyonuna ait bulgular

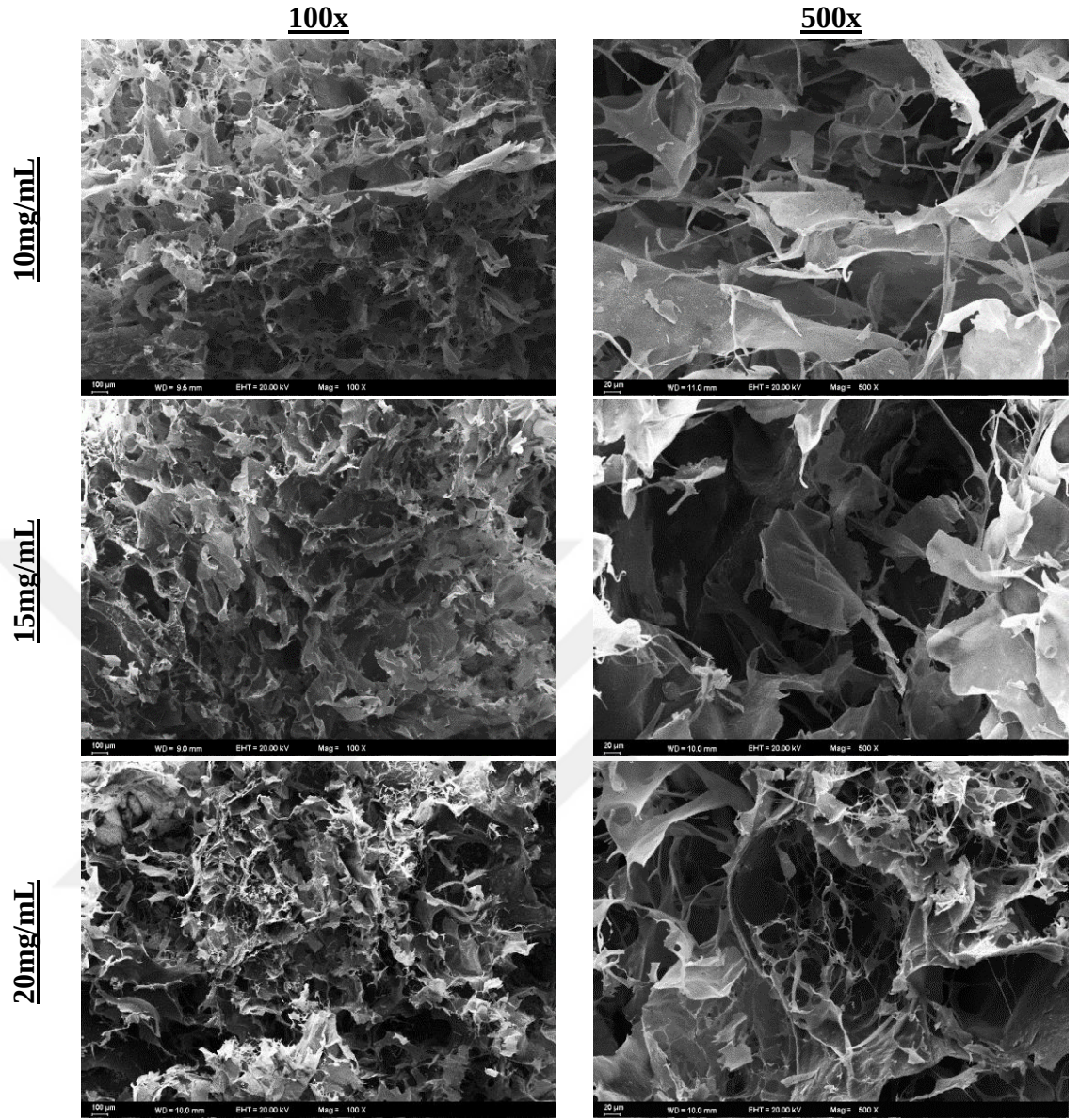
4.2.2.1 Morfolojik analiz (SEM) bulguları

Deselülerizasyon sonrasında dkHDM'lerin enzimatik jelleştirilmesi ve sonrasında 37°C'deki fiziksel çapraz bağlanmasının ardından liyofilize edilerek 3B hepatik doku iskeleleri elde edilmiştir (**Şekil 4.14**). Jelleştirme profillerinden elde edilen bulgular paralelinde 9 ve 11 numaralı protokol için 10 mg/mL, 15 mg/mL ve 20 mg/mL konsantrasyonları ile geliştirilen 3B iskelelere ait SEM analiz bulguları **şekil 4.15** ve **şekil 4.16**'de yer almaktadır. Deselülerizasyon sonrasında HDM içeriğinde, Triton X-100 (ve PAA) ve SDS gibi deterjanların kullanımına bağlı olarak bozulmaların olduğu ve bu bozulmaların meydana getirdiği gözenekliliğin dkHDM'sinin enzimatik sindirimi ile jelleştirilmesine ve sünger iskele üretimine katkı sağladığı gözlenmiştir. Üretilen dkHDM sünger iskelelerin gözenekliliği ve iskelenin mikro mimarisi, üretilen hidrojelin 37°C'de fiziksel çapraz bağlanması ve hidrojel konsantrasyonuna bağlı olarak özgün mikro mimarilerde iskelelerin elde edildiği gösterilmiştir.

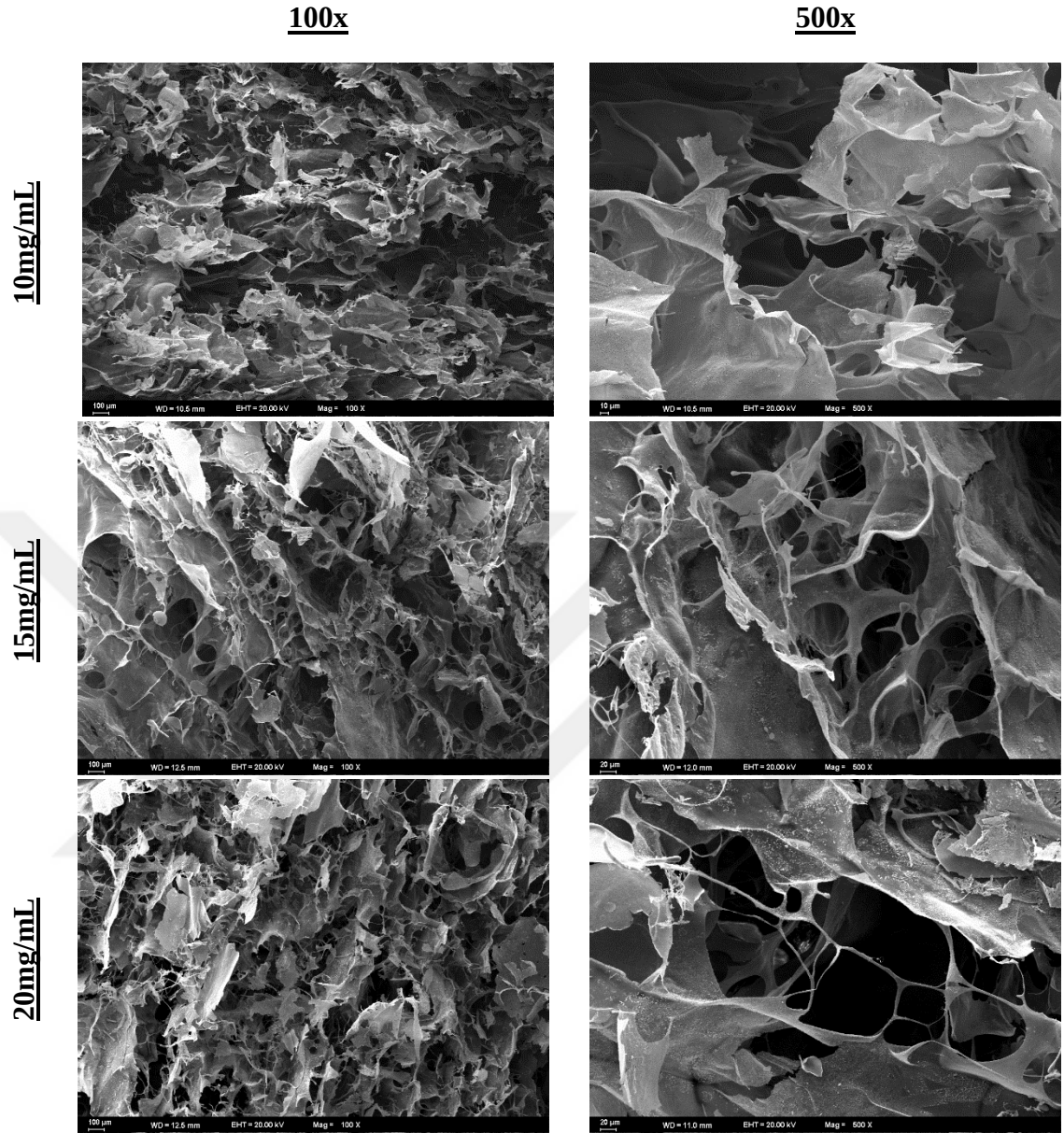


Şekil 4.14 3B hepatik doku iskelelerine ait makroskopik görüntüler

A) Protokol 9'dan elde edilen (soldan sağa) 10 mg/mL, 15 mg/mL ve 20 mg/mL konsantrasyonları ve B) Protokol 11'den elde edilen (soldan sağa) 10 mg/mL, 15 mg/mL ve 20 mg/mL konsantrasyonları



Şekil 4.15 Protokol 9'dan elde edilen deselülerize karaciğer 3B doku iskelesine ait elektron mikroskobu görüntüleri

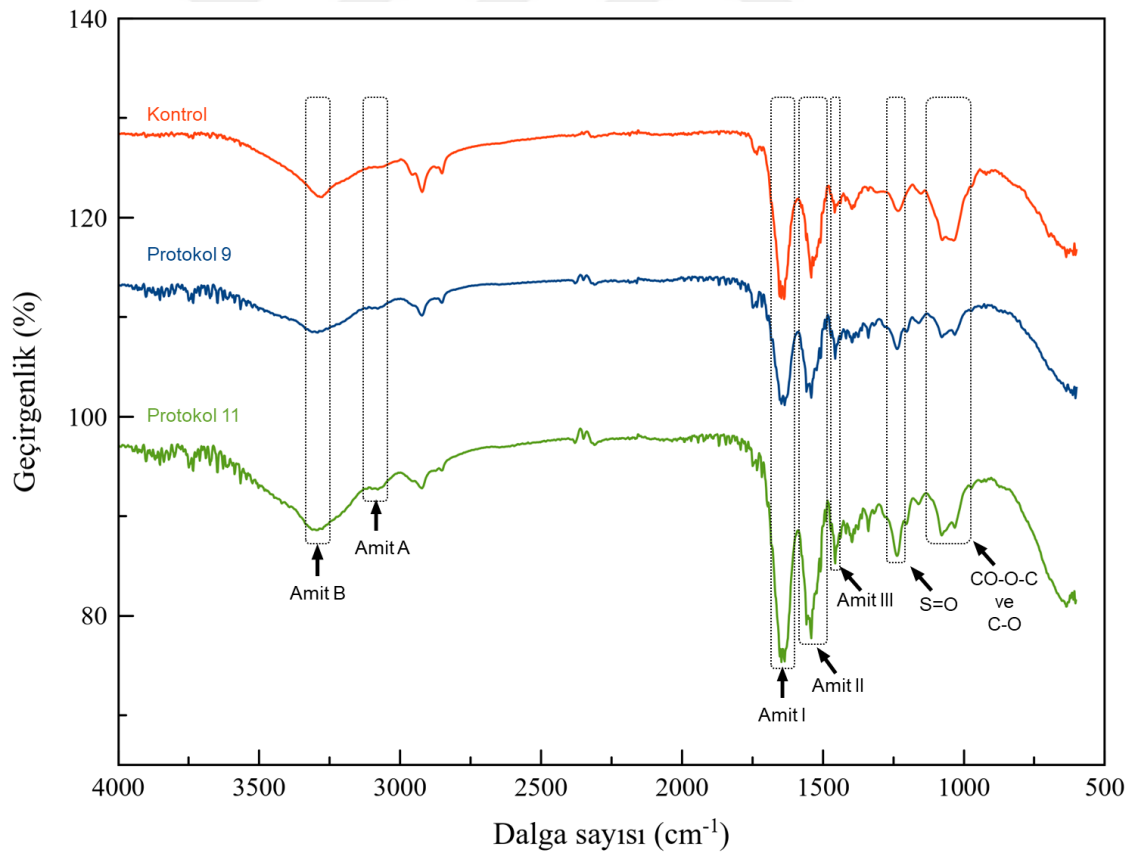


Şekil 4.16 Protokol 11'den elde edilen deselülerize karaciğer 3B doku iskelesine ait elektron mikroskobu görüntüleri

4.2.2.2 Kimyasal analiz (FT-IR) bulguları

Kontrol olarak kullanılan doğal karaciğer ve deselülerizasyon sonrasında 9 ve 11 numaralı protokollerin HDM'lerindeki kimyasal bileşenlerinin belirlenmesi ve birbirleri arasında kıyaslanması amacıyla FTIR analizleri gerçekleştirildi (Şekil 4.17). dkHDM içeriğinde yer alan peptitlerdeki (kollajen) amit bağlarına spesifik $1600-1800\text{ cm}^{-1}$

civarındaki amit I, C=O grubundaki gerilme titreşiminden kaynaklanan $1470-1570\text{ cm}^{-1}$ civarındaki amit II, N-H grubunda bükme ve C-N germe titreşiminden kaynaklanan ve $1250-1350\text{ cm}^{-1}$ civarındaki amit III, C-N germe titreşimi ve N-H bükülme titreşimi ve glisin omurgası ve prolin yan zincir gruplarından CH_2 salınımlı titreşimine özgü pikleri gözlenmiştir. Ayrıca, yine kollajene spesifik amit A ve amit B kaynaklı N-H ve O-H'nin gerilme titreşimi, 3300 ve 3085 cm^{-1} civarındaki piklerle karakterize edilmiştir (Shi vd. 2019, Ji vd. 2020). ATR-FTIR analizi sonucunda $100-1250\text{ cm}^{-1}$ civarında karbohidrat karakterindeki proteoglikanların varlığı ile ilişkilendirilen pikler gözlenmiştir. Buna istinaden CO-O-C ve C-O titreşimlerinden kaynaklı $1050-1150\text{ cm}^{-1}$ civarındaki karbohidrat, nükleik asit ve fosfolipit pikleri karakterize edilmiştir (Bozkurt vd. 2012). Bunların yanı sıra kondroitin sülfat ve heparan sülfata ait 1245 cm^{-1} civarındaki piklerin R-SO_3^{-1} ait S=O absorpsiyon pikine spesifik bir gerilim titreşimine sahip olduğu belirlenmiştir (Camacho vd. 2001, Seif-Naraghi vd. 2012).

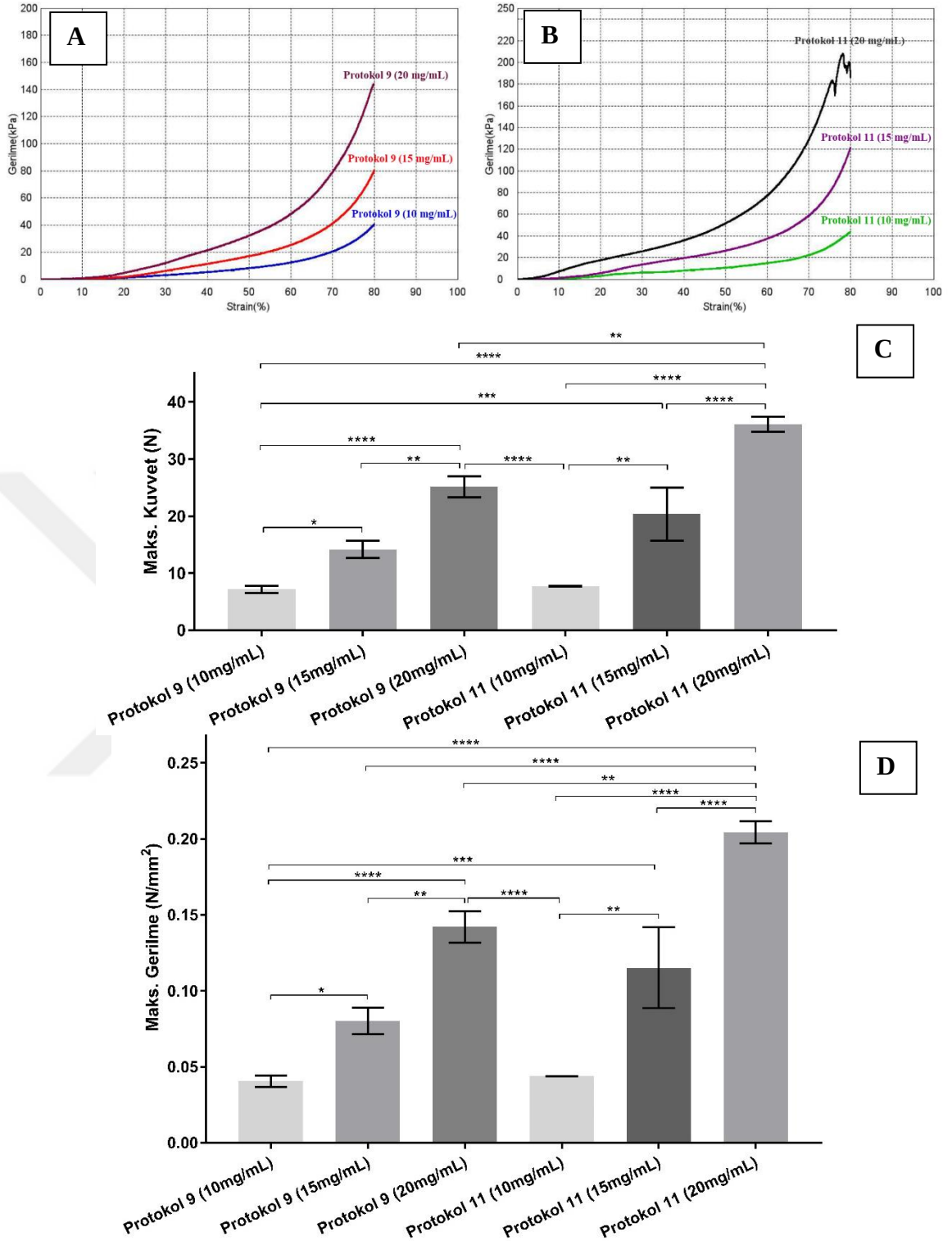


Şekil 4.17 Kontrol grubu, protokol 9 ve 11'e ait ATR-FTIR analizi grafiği

4.2.2.3 Mekanik analiz (Basma testleri) bulguları

Tek eksenli gerçekleştirilen basma testi, 9 numaralı ve 11 numaralı protokol için her biri tek bir standartta hazırlanmış olan 1,5 cm çapında ve 1 cm yüksekliğindeki disk şeklindeki 3B sünger iskeleler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Örnek grupları 10 mg/mL, 15 mg/mL ve 20 mg/mL olarak belirlenmiş ve örnekler mekanik teste tabii tutulmuştur. Örneklerle ilişkin maksimum kuvvet (N) ve maksimum gerilme ($\text{N/mm}^2 = \text{MPa}$) grafikleri de karşılaştırmalı olarak **şekil 4.18**'de gösterilmiştir.

Numunelerin basma dayanımları birbirleri ile kıyaslandığında 20 mg/mL konsantrasyon jel ile hazırlanan 11 numaralı protokole ait 3B doku iskelesinin $36,10 \pm 1,31$ N maksimum kuvvet, maksimum gerilme ise $0,20 \pm 0,01$ MPa olarak belirlenmiş ve diğer iskelelerden mekanik dayanımının daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır. Bunu takiben yine 20 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış 9 numaralı protokol kullanılarak üretilmiş 3B doku iskelesi maksimum kuvvet $25,12 \pm 1,8257$ N ve maksimum gerilmesinin $0,14 \pm 0,0103$ MPa olduğu belirlenmiştir. Diğerleri de sırasıyla 9 numaralı protokol 10 mg/mL için $7,18 \pm 0,6539$ N ve $0,04 \pm 0,0037$ MPa; 9 numaralı protokol ve 15 mg/mL için $14,17 \pm 1,5374$ N ve $0,08 \pm 0,0087$ MPa; 11 numaralı protokol 10 mg/mL için $7,74 \pm 0,0332$ N ve $0,04 \pm 0,0002$ MPa; 11 numaralı protokol 15 mg/mL için $20,36 \pm 4,6939$ N ve $0,12 \pm 0,0266$ MPa olarak belirlenmiştir (**Şekil 4.18**).

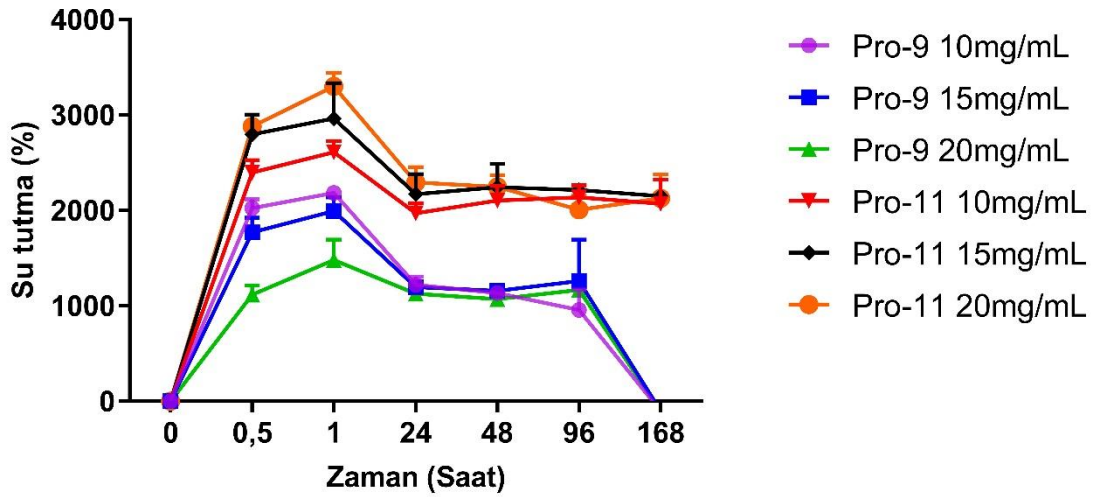


Şekil 4.18 Numunelere ilişkin yapılan basma testine ait veriler

A) Protokol 9'a ait Gerilme (kPa) - zorlama (%); B) Protokol 11'e ait Gerilme (kPa) - zorlama (%); C) Protokol 9 ve Protokol 11 maksimum kuvvet (N); D) Protokol 9 ve Protokol 11 maksimum gerilme (N/mm²) grafikleri (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 n:3)

4.2.2.4 Fiziksel analiz (Su tutma/bozunma) bulguları

Su tutma ya da şişme, çapraz bağlanmış biyomalzemelerin su alarak şişme davranışı göstermesi ve yapılarındaki polar grupların varlığına bağlı olarak kuru ağırlıklarının binlerce katı kadar su alabilmeleri ile karakterize edilir (Ma vd. 2003). Analiz öncesinde örneklerin kuru ağırlıkları daha sonra 30 dakika, 1 saat, 24 saat, 48 saat, 96 saat ve 7 gün sonrasındaki ıslak ağırlıkları tartılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Bulgular **Şekil 4.19**'daki grafikte verilmiştir. Yapılan çalışma sonunda farklı konsantrasyonlarda HDM ihtiva eden yapıların farklı su tutma özelliklerine sahip olduğu gözlenmiştir (**Çizelge 4.1**). Bulgulardan hareketle Protokol 11'in su tutma kapasitesinin Protokol 9'a kıyasla daha fazla olduğu sonucuna varılmış olup her ikisi içinde benzer olarak ortalama 30 dakika ile 1 saat arasında maksimum su tutma kapasitesine ulaştığı daha sonra 24 saate giderken su tutmanın ilk 30 dakikalık seviyesine geri geldiği ve bu seviyenin de Protokol 11'den elde edilen 3B hepatik iskeleler için 7 güne kadar sabit kaldığı belirlenmiştir. Buna kıyasla Protokol 9'da 7. günün sonunda biyobozunma gerçekleştiğinden ölçüm alınamamıştır.

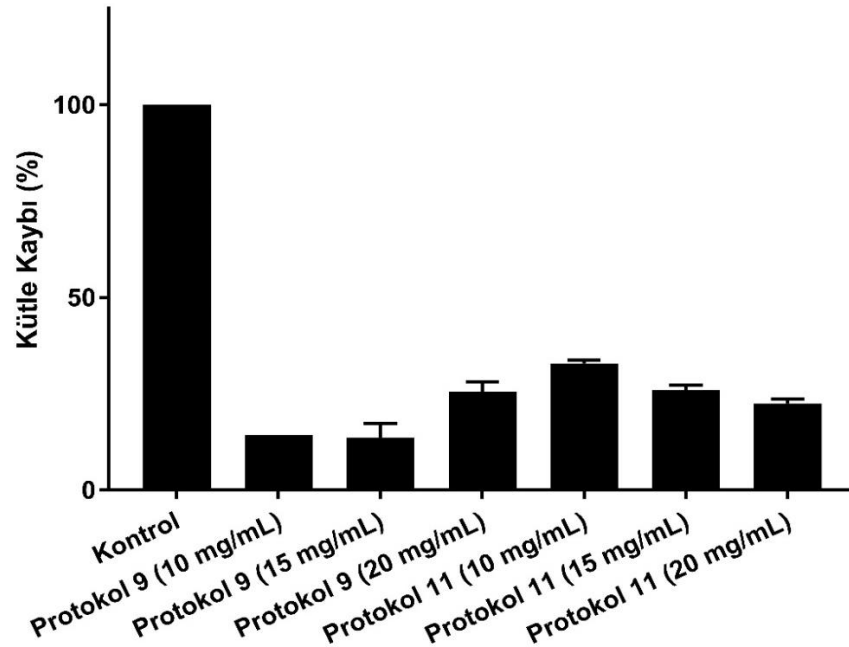


Şekil 4.19 Su tutma (%) analizine ait bulgular

Çizelge 4.1 Su tutma analizine ait sayısal veriler (% Ortalama değer)

Sa	Pro-9 10mg/mL	Pro-9 15mg/mL	Pro-9 20mg/mL	Pro-11 10mg/mL	Pro-11 15mg/mL	Pro-11 20mg/mL
0	0	0	0	0	0	0
0,5	2023,61±93,7	1772,45±154,1	1119,85±99,6	2397,65±129,9	2798,11±207,6	2883,15±23,8
1	2184,48±57,3	1993,57±144,6	1480,63±213,8	2610,36±116,5	2965,03±368,4	3301,06±140,0
24	1223,19±87,7	1197,13±11,4	1129,10±23,5	1971,62±105,8	2173,07±213,0	2294,21±160,4
48	1134,50±31,3	1157,87±55,4	1071,46±59,3	2105,67±155,0	2244,40±243,7	2249,19±125,1
96	958,84±213,7	1261,21±435,1	1167,88±24,8	2138,17±127,5	2216,46±72,0	2007,60±146,0
168	0	0	0	2071,63±252,4	2153,18±47,3	2127,05±251,3

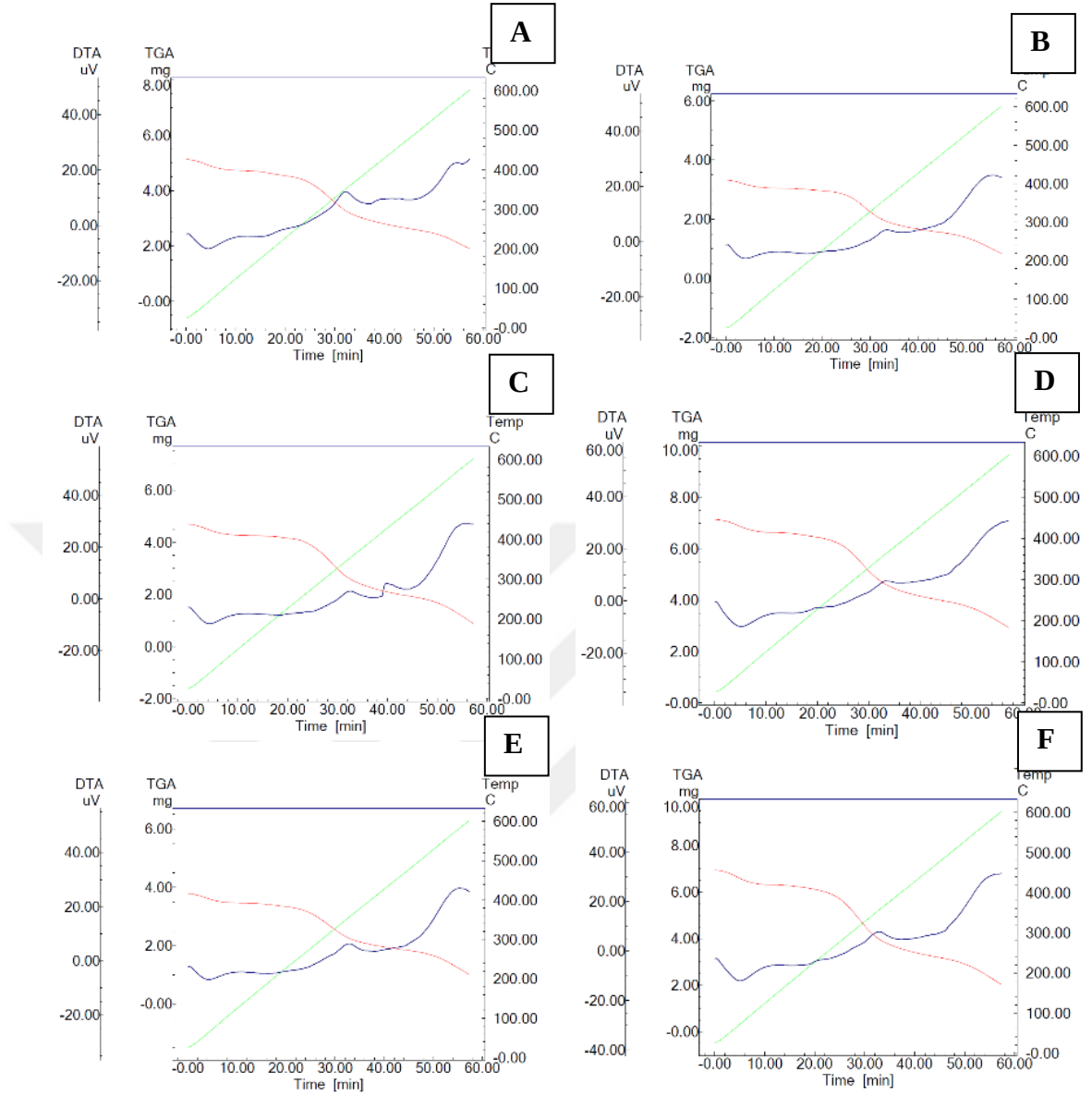
Kuru kütleleri ölçüldükten sonra 7 gün boyunca 37°C’de PBS içerisinde inkübe edilen Protokol 9 ve 11’den elde edilen 3B hepatik doku iskelelerinin biyobozunma grafiği **Şekil 4.20**’de gösterilmiştir. Yapılan çalışma sonunda Protokol 9 (10 mg/mL) %14,38±0,00; Protokol 9 (15 mg/mL) %13,58±3,78; Protokol 9 (20 mg/mL) %25,51±2,55; Protokol 11 (10 mg/mL) %32,90±0,79; Protokol 11 (15 mg/mL) %25,97±1,28 ve Protokol 11 (20 mg/mL) için %22,47±1,24 kütle kaybı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.20 Protokol 9 ve Protokol 11 ile hazırlanmış 3B hepatik doku iskelelerinin 7. güne ait (%) kütle kaybı grafiği

4.2.2.5 Termal analiz (TGA) bulguları

3B doku iskelelerinin artan sıcaklıktaki kütle kayıpları ve termal kararlılıklarının belirlenmesi amacıyla termogravimetrik analiz (TGA) çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İnert azot gazı ortamında 25-600°C sıcaklık aralığında, 10°C/dakika ısıtma hızı ile ölçüm gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde gruplar arasında belirgin benzerlikler izlenmiştir (**Şekil 4.21**). Elden edilen veriler ışığında sünger iskelelerin üretilme yöntemi nedeniyle (dondurup-kurutulan yöntemde) süblimleşen suyun iskelede var olmayışı sebebiyle genelde gözlenen, karakteristik 0-100°C'deki nemin evaporasyonu gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra organik bileşiklerin ayrışmasına bağlı olan 200-400°C'de büyük bir kütle kaybı belirlenmiştir. Farklı kaynaklardan elde edilen kollajenlerin termal denatürasyon sıcaklığı, imino asit (prolin ve hidroksiprolin) içeriği ile doğrudan korelasyona sahiptir (Pati vd. 2010). dkHDM içeriğinin aydınlatılmasında yapılan kolorimetrik analizler ışığında 3B hepatik doku iskelelerinin yüksek oranda protein içeriğine sahip olduğu ve bunun çoğunluğunun kollajen olduğu belirlenmiştir (**Şekil 4.8 ve 4.9**). Kollajen molekülünün üçlü sarmal yapısı, moleküller arası çapraz bağlanmayı kolaylaştırdığı bildirilmiştir. Bu sebeple kütle kaybının gerçekleştiği basamağın, HDM içeriğindeki kollajenin denaturasyonu ve stabilitesinin kaybıyla yorumlanabilir. Aynı protokolün farklı konsantrasyonları arasındaki bozunma farkı, artan konsantrasyonla doğru orantılı arttığı tespit edilmiştir. Sıcaklığın yükselmesiyle devam eden bozunmada ise inorganik bileşiklerin mevcudiyeti ile ilişkilendirilebilir.



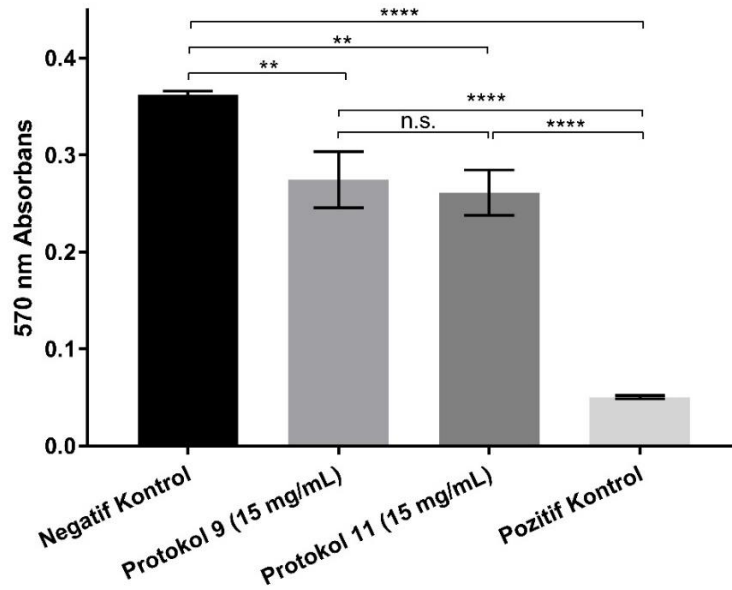
Şekil 4.21 TGA analizine ait grafikler

A) Protokol 9 (10 mg/mL); B) Protokol 9 (15 mg/mL); C) Protokol 9 (20 mg/mL); D) Protokol 11 (10 mg/mL); E) Protokol 11 (15 mg/mL) ve F) Protokol 11 (20 mg/mL) ait grafikler (Eğriler kırmızı renkle gösterilmiştir)

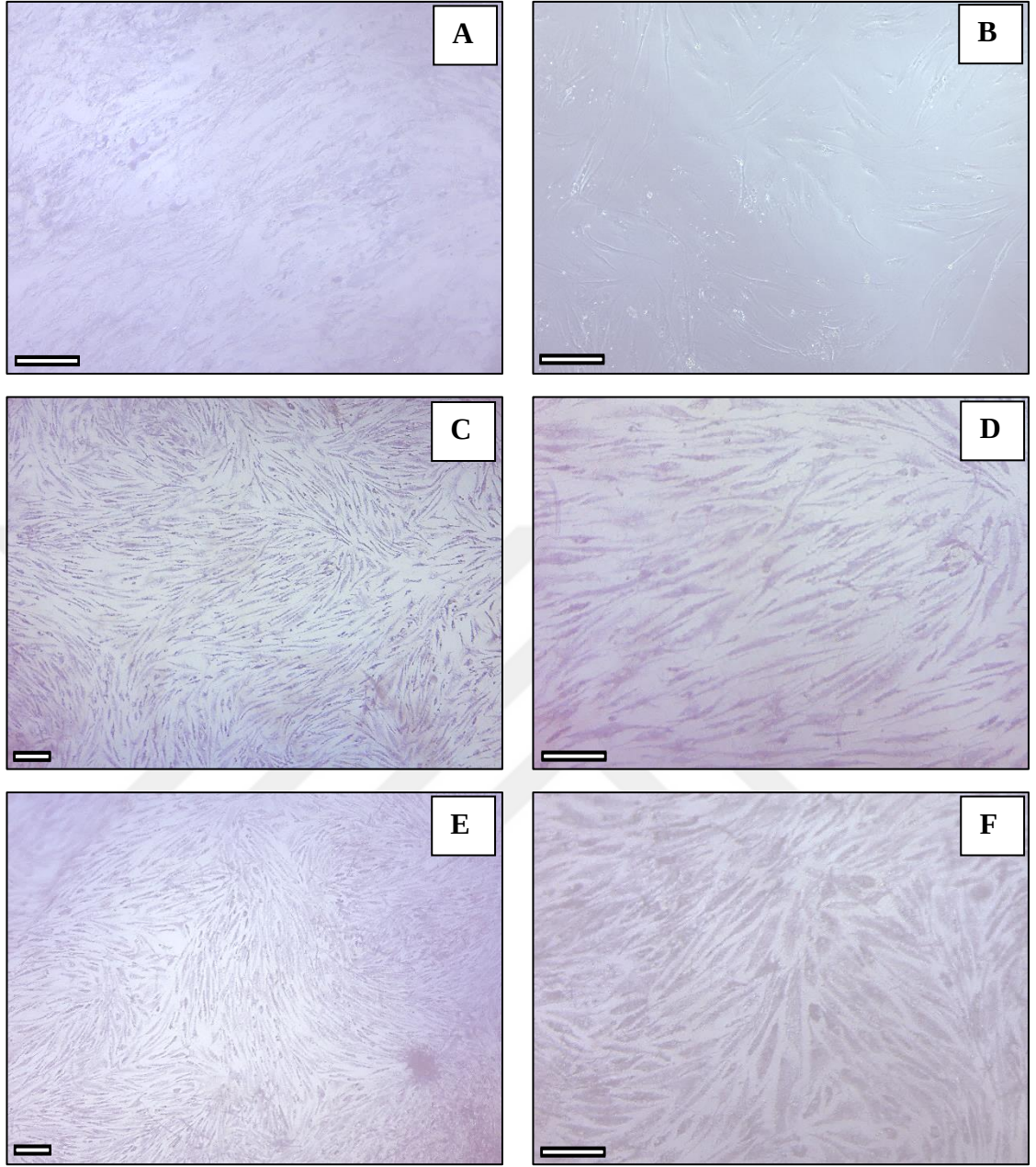
4.2.2.6 *In Vitro* sitotoksosite testi analiz bulguları

Çalışma kapsamında 3B hepatik doku iskelelerinin biyoyoumluluğunun değerlendirilmesi amacıyla *in vitro* hücre kültürü temelli indirekt sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sitotoksosite analizi mitokondriyel dehidrogenaz

aktivitesindeki değişimin belirlenmesi esasına dayanan MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Canlı hücreler, mitokondriyel dehidrogenaz enzim aktivitesinin bir sonucu olarak tetrazolyum tuzunu formazan kristaline (mor) dönüştürmektedir (**Şekil 4.23**). Yapılan çalışmada Protokol 9 (15 mg/mL) ve Protokol 11 (15mg/mL)'e ait 3B hepatik doku iskeleleri teste tabii tutulmuştur. Pozitif kontrol olarak fenol ve negatif kontrol olarak standart kültür besiyeri kullanılmıştır. Analiz sonuçları incelendiğinde kontrole kıyasla ve gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (**Şekil 4.22**). Elden edilen veriler ışığında sünger iskelelerin 570 nm dalgaboyunda Protokol 9 (15 mg/mL)'ye ait iskelerde ve Protokol 11 (15mg/mL)'ye ait iskelerde hücre canlılığını etkileyen ciddi bir toksisite belirlenmemiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda her iki hepatik doku iskelesinin de sitotoksik bir etkiye sebep olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.22 Protokol 9 (15 mg/mL) ve Protokol 11 (15mg/mL) ve kontrol gruplarının MTT analizine ait grafik
 (**p<0,01, ****p<0,0001 n:3)



Şekil 4.23 3B hepatik iskelelerin, insan dermal fibroblast hücreleri kullanılarak sitotoksitesinin belirlenmesi (tetrazolyum tuzunun formazan kristaline (mor) dönüşümü)

A) Negatif kontrol, B) Pozitif kontrol, C) ve D) Protokol 9 (15 mg/mL); E) ve F) Protokol 11 (15mg/mL)'e ait MTT analizi sonucunda hücre içinde meydana gelen formazan kristallerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü (Boyut çubuğu 50 μ m)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, karaciğer doku mühendisliği uygulamalarına yönelik sığır karaciğer dokusundan hücrelerinden arındırma yöntemi kullanılarak hücre dışı matriksin ayrıştırılması amacıyla protokollerin optimizasyonu ile yeni nesil biyomalzemelerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, hepatik hücre işlevlerini ve doku oluşumunu destekleyen biyoaktif moleküllerin varlığının korunarak immün yanıtın azaltması/ortadan kaldırması, matriksle iç içe bulunan hücrelerin uzaklaştırılması ve DNA içeriğinin büyük ölçüde azaltılmasına yönelik farklı deselülerizasyon yöntemleri karşılaştırmalı olarak incelenip, dokuya özgü protokol optimize edilmiştir. Çalışma kapsamında geliştirilmiş olan deselülerize HDM temelli biyomalzemelerin çeşitli fiziksel, kimyasal ve bazı biyolojik özellikleri karakterize edilmiştir. Sığır karaciğerinin deselülerizasyonuna ilişkin çok sayıda farklı protokolün etkinliği yapılan histokimyasal analizler ve DNA analizleri ile belirlenmiştir. Ayrıca deselülerizasyonlar sonrası hepatik dokunun sGAG, toplam protein, kollajen içeriği gibi biyoaktif içerikleri karşılaştırmalı analizler ile tayin edilmiştir. Protokol süreçlerinin karaciğer doku morfolojisine etkileri de ayrıca taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizleri ile değerlendirilmiştir. Nihai olarak deselülerize karaciğer temelli biyomalzemelerin üretimi için ilk aşamada biyoaktif hidrojellerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda deselülerize karaciğer dokuları pepsin enzimiyle sindirilerek elde edilen farklı protokollere ait hidrojelin özellikleri makroskopik ve turbidimetrik analiz ile fiziksel özellikleri karakterize edilerek incelenmiştir. Akabinde hidrojel biyomalzemenin farklı konsantrasyonlarının hazırlanıp liyofilize edilmesiyle deselülerize karaciğer 3B sünger iskeleleri dondurup-kurutma tekniğiyle elde edilmiştir. Bu 3B iskelelerin SEM ile morfolojik özellikleri, FT-IR ile kimyasal özellikleri, basma testi ile mekanik özellikleri, su tutma/bozunma testleri ile fiziksel özellikleri, TGA ile termal özellikleri ve *in vitro* sitotoksosite testi ile biyolojik özelliklerinin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Deselülerizasyonun temel amacı, hücrelerin ve nükleik asitlerin doku veya organdan bertaraf etmek ve aynı zamanda hücre dışı matriks içeriğinin doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilecek bir biyomalzeme formuna getirmektir. Bu yolla imkansız gibi görünen doğal HDM'nin *in vitro* şartlarda kompleks biyokimyasal ve mikro mimari yapısının taklit edilebilmesinde önemli bir çözüm yolu ortaya çıkmaktadır (Parmaksiz vd. 2019).

Karaciğere özgü deselülerizasyon yaklaşımları göz önüne alındığında literatürde yaygın olarak kullanılan deselülerizasyon ajanlarının, perfüzyon pompası kullanımı ile bütün karaciğer (Baptista vd. 2011) veya karaciğer doku parçalarına (Skardal vd. 2012) uygulandığı görülmektedir. Farklı doku/organ deselülerizasyon yaklaşımlarında çeşitli enzimatik ve diğer yüzeyaktif maddelerin birlikte kullanımı dikkat çekse de sığır karaciğeri gibi yüksek hacimlerde yapılacak çalışmalarda ağırlıklı olarak deterjanların kullanımı ön plandadır. Yapılan çalışmada literatürde sadece karaciğer için değil farklı organ ve doku temelli deselülerizasyon uygulamalarında etkin sonuçlara sahip olduğu gözlenen iyonik olmayan bir deterjan olan ve hafif deterjan olarak bilinen Triton X-100 ve anyonik bir deterjan olan SDS kullanımına karar verilmiştir. Çalışılan 11 farklı protokol, bu söz konusu etkin deterjanların farklı konsantrasyonlarda ve değişen sürelerde uygulamasını kapsamaktadır. Seçilen deterjanlardan Triton X-100'ün bu zamana kadar iskelet kası (Lin vd. 2014), trake (Zhang vd. 2019), aortik kalp kapakçığı (Luo ve Ma 2020) ve karaciğer (Lee vd. 2014) gibi birçok farklı doku veya organda kullanımına literatürde sıkça rastlanmaktadır. Yine aynı şekilde SDS'in böbrek (Tajima vd. 2020), karaciğer (Lewis vd. 2019) ve kornea (Fernández-Pérez ve Ahearne 2019) gibi çok çeşitli doku veya organların deselülerizasyonu için kullanıldığı ve başarılı sonuçlar elde edilebildiği bilinmektedir. Çok basamaklı deselülerizasyon yaklaşımlarında da her iki deterjanın farklı basamaklarda kullanımına da literatürde rastlanmaktadır (Oberwallner vd. 2014, Son vd. 2019). Diğer yandan, her ne kadar bu deterjanların etkin deselülerizasyon protokollerinde kullanıldığı dikkat çekse de, yetersiz kaldıkları doku/organ yaklaşımları da mevcuttur. Bu aşamada deselülerizasyon etkinliğini arttırmak amacıyla PAA ve NH₄OH gibi asit ve bazların veya DNaz ve RNaz

gibi nükleazların kullanımına da literatürde yaygın olarak yer almaktadır (Sellaro vd. 2010, Yamanaka vd. 2020).

Hücreleri uzaklaştırmadaki etkinliklerinin yanı sıra Triton X-100'ün bir diğer avantajı doku HDM yapısındaki biyoaktif bileşenlere verdiği zararın oldukça düşük olmasıdır (Vavken vd. 2009). Bunun temel nedeni. Ancak her ne kadar biyoaktif bileşime etkileri farklı olsa da artan konsantrasyon ve muamele süresinin uzunluğuna bağlı olarak doğal HDM'nin 3B mimari yapısına zarar verdiği belirtilmektedir (Tebyanian vd. 2019). Alternatif olarak, deterjan veya herhangi başka bir kimyasal deselülerizasyon ajanı kullanılmadan fiziksel yöntemler kullanılarak da hücrelerinden uzaklaştırılan doku/organ çalışmalarına literatür de rastlanmaktadır. Ancak, fiziksel yöntem temelli deselülerizasyon yaklaşımlarının başarısı hedef doku/organdan mikrometre mertebesinde doku kesitlerin alınması ile mümkün görünmektedir. Bu yolla toplanan kesitler fiziksel etkiye maruz bırakılarak hücrelerinden uzaklaştırılabilmektedir. Ancak, çok küçük hacimlerde çalışılmasına olanak sağlaması ve uzun preparasyon süreleri nedeni ile özellikle 3B doku mühendisliği uygulamalarına transasyonu oldukça zordur (Shen vd. 2020). Bu bilgiler doğrultusunda tez kapsamında yapılan hücresizleştirme çalışmaları etkinlik değerlendirilmesinin yanı sıra yüksek hacimlerde çalışılabilirlik bakımından da ele alınmıştır. Diğer yandan doğal karaciğer HDM içeriklerinin detaylı karşılaştırmalı kantitatif analizleri ve *in vitro* sitotoksite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Deselülerizasyon çerçevesinde elde edilen bulguların farklı doku/organ çalışmaları da dahil olmak üzere literatür çalışmalarını da destekleyici nitelikte olduğu gösterilmiştir.

Hücresel ve HDM bileşenleri bakımından deselülerize HDM'lerin histokimyasal yöntemler ile incelenmesi deselülerizasyon protokol etkinliklerinin değerlendirilmesi açısından önemli bir yer tutmaktadır. Bu tez çalışmasında farklı protokoller ile geliştirilen dkHDM preparatları, hiçbir işleme tabi tutulmamış kontrol grubu olan doğal karaciğer dokusu H&E boyalamaları ile hücre içeriği bakımından karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Doğal karaciğer dokusunda (Kontrol) mavi-mor renk ile boyanan

hücre çekirdeği ve kırmızı-pembe renkte hücre dışı matriks materyali yoğun olarak gözlenmiştir. Bilindiği gibi deselülerize edilmiş HDM'ler için hücre kalıntıları *in vitro* hücre uyumluluğu problemlerine ve *in vivo* konakçı yanıtına neden olabilmektedir. Ancak deselülerizasyon teknikleri ile hücre materyallerinin tamamının bertaraf edilmesi mümkün değildir. Histolojik olarak DAPI veya H&E gibi histolojik boyalar hücre çekirdeğinin belirgin boyanması ve teşhisi amacıyla literatürde tercih edilen bir histokimyasal karakterizasyon yöntemi olarak öne çıkmaktadır (Lee vd. 2014) ve bu tez çalışması kapsamında da H&E boyaması tercih edilmiştir.

Negatif immünolojik etkisinin ortadan kaldırılması için deselülerizasyonda temel hedef hücre içi organeller ve nükleik asit gibi yapıların uzaklaştırılmasıdır. Farklı kaynaklardan elde edilen dokulara özgü birçok farklı bilgi literatürde yer alsa da dHDM içeriğinde mevcut DNA içeriğinin mümkün olduğunca elimine edilmesi ve mümkünse <50ng DNA/mg kuru ağırlık veya <200 baz çifti (uzunluk) limitlerine sahip olması beklenmektedir (Crapo vd. 2011). Bu tez çalışmasında, hücre fizyolojisinde önemli bir rol oynayarak doku fonksiyonu için temel olan HDM içeriğinin mümkün mertebe korunması açısından tercih edilen deselülerizasyon ajanlarının mümkün olduğunca düşük konsantrasyonda ve kısa süreli uygulamaları kapsayan protokol optimize edilmeye çalışılmıştır. Çalışan protokoller sonrasında sürdürülen karakterizasyon çalışmaları ışığında histokimyasal açıdan en etkin protokollerin SDS kullanımını kapsayan 9, 10 ve 11 numaralı protokoller olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, Triton X-100 kullanımını içeren protokollerin de literatür bilgilerine uygun olarak umut vadeci histokimyasal sonuçlara sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada özellikle NH₄OH ile kombinlenen Triton X-100 temelli protokollerde histokimyasal açıdan uygun olan hücre çekirdeğinin uzaklaştığı sonucu belirlenmişse de DNA içeriği analizlerinde nispeten yüksek sonuçlar gözlenmiştir. Benzer çalışmalarda temel alınan <50 ng/mg DNA limit değeri göz önüne alındığında Protokol 1, Protokol 5, Protokol 6, Protokol 7, Protokol 9 ve Protokol 11'in optimal DNA içeriklerine sahip olduğu gözlenmiştir. DNA içeriği analizlerinden en etkili sonucun kontrole kıyasla toplam DNA içeriğinin %80,34'ünü bertaraf eden protokol 5'e ait olduğu bulunmuştur ancak H&E boyaması incelendiğinde yer yer de olsa hücre çekirdeklerinin görüldüğü bölgeler de belirlenmiştir. Bu sonuçtan hareketle Triton X-100 ve sonrasında dekontaminant

olarak NH_4OH veya PAA kullanılmasına rağmen elde edilen sonuçların bu protokollerde deselülerizasyon etkinliğinin, yalnızca SDS kullanılan protokollerden daha zayıf olduğu sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla, deselülerizasyonun etkinliğinin belirlenmesinde histokimyasal analizlerin ve DNA içeriğinin birlikte değerlendirilmesinin mutlak önem arz ettiği dikkat çekmiştir.

Deselülerizasyon ajanlarının sitotoksik veya immünolojik etkileri ortadan kaldırırken aynı zamanda HDM'nin doğal biyoaktif içeriğine olan negatif etkisi bilinmektedir (Shen vd. 2020). Dolayısıyla, belirlenen deterjanların muamelerinin ardından 3B hepatik doku iskelelerin üretimine yönelik olarak optimizasyonu gerçekleştirilen protokollerin, HDM içeriğinin belirlenmesi gereklilik arz etmektedir. Bu doğrultuda HDM aktif içeriğini değerlendirilmesi amacıyla çalışmada, deselülerizasyon etkinliği kapsamında sGAG, protein içeriği ve kollajen gibi temel HDM bileşenlerinin analizleri de gerçekleştirilmiştir. Karaciğer HDM'sinin temel olarak kollajen I, III, IV, V ve VI ile birlikte fibronektin, laminin ve glikozaminoglikanları da içerdiği bilinmektedir (Ueno vd. 2003). Dolayısıyla başta hücre proliferasyonu, migrasyonu hatta ileri reselülerizasyon ve neovaskülerizasyonun başarısı bu doğal içeriğinin deselülerizasyon sonrasında HDM'de olabildiğince korunmasına bağlıdır. Nitekim dHDM'den elde edilecek olan doku mühendisliği iskelelerinin kullanmanın temel faydalarının başında diğer doğal veya sentetik polimerden üretilenlere kıyasla doğal dokuları daha yakından taklit eden birden çok HDM bileşenini içerebilmesidir (Fernández-Pérez ve Ahearne 2019). Bu tez çalışmasında histokimyasal boyama ve DNA sonucundan hareketle tercih edilen dört farklı etkin deselülerizasyon protokolü seçilmiş ve HDM bileşenleri özelinde kantitatif olarak sGAG, toplam protein ve kollajen miktarı belirlenmiştir.

HDM yapısı detaylı incelendiğinde birbirine geçen lifli proteinleri ve glikosaminoglikanları içeren bir ağdan oluşmaktadır. HDM, hücreler için destek sağlar, salgılanan büyüme faktörleri için bir depo görevi görür ve hücre içi sinyal yollarını indükler, böylece hücrelerin çevresine adaptasyonu, proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşma gibi hücre davranışlarını etkilediğinden kritik öneme sahiptir (Daley vd.

2008, Ishii vd. 2008, Uygun vd. 2012). Bu bileşenlerden sGAG'ın HDM'deki çeşitli proteinlerle etkileşime girdiği ve bu tür etkileşimlerin büyüme faktörlerini, kemokinleri ve sitokinleri proteolize karşı koruduğu bilinmektedir. GAG'lar ayrıca FGF, HGF, VEGF ve PDGF ilişkili sinyal yollarında rol almaktadır. Dolayısıyla, deselülerizasyonda GAG'ların hedef doku HDM'sinde korunması dolaylı olarak büyüme faktörlerini ve biyolojik aktivitenin de taklit edilmesi için anahtar rol oynamaktadır (Meglio vd. 2017). Bu çalışmada deselülerizasyon etkinliği göz önüne alınarak belirlenen dört etkin protokolün sGAG içeriğinin değerlendirilmesi açısından yapılan kantitatif ölçümler, seçilen protokollerin uygulanması sonrasında sGAG'ın etkin bir biçimde deselülerize HDM'lerde koruduğunu göstermiştir. Elde edilen bulgulara, en yüksek sGAG içeriğinin ($100,69 \pm 0,74$ ($648,72 \pm 4,74$ mg/mL)), dilim sığır karaciğer dokusunun 48 saat süre ile %2 Triton X-100 ve 24 saat %0,15 PAA uygulamasını içeren Protokol 5 ile elde edilen HDM'lerde olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubu olan doğal karaciğer dokusuna kıyasla sGAG miktarındaki nispi yükseklik literatürde karşılaşılan, olağan bir durum olarak ortaya çıkmaktadır (Damania vd. 2018). Literatürde yine kollajen ve sGAG miktarı, deselülerize dokunun doğal dokuya oranla fazla olduğu bildirilmiş ve bu hücrel içeriğin açığa çıkmasıyla ilişkilendirilmiştir (Baptista vd. 2011, Hussein vd. 2016). Benzer biçimde, doğal pankreasa kıyasla deselülerize pankreasta daha yüksek kollajen ve sGAG miktarları, hücrel bileşenlerin iskelelerden etkin bir biçimde uzaklaştırıldığı şeklinde de yorumlanmıştır (Yu vd. 2018). Çalışmada sGAG içeriği analiz edilen diğer protokollerde ise az miktarda düşüş olduğu belirlenmiş olmakla birlikte yüksek oranda sGAG içeriğinin deselülerize yapılarda korunabildiği belirlenmiştir.

Doku mühendisliğiyle üretilecek olan iskelelerin etkin bir biçimde fonksiyon göstermesinde 3B fizyolojik ortamın taklit edilmesi çok önemlidir. Karaciğer rejenerasyonu için ideal ortamın belirlenmesi için etkin deselülerizasyon protokolleri arasından seçilmiş olan dört farklı protokolün HDM içeriğinde önemli miktarda yer alan proteinin kantitatif analizleri mutlak önem teşkil etmektedir. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen toplam protein analizleri bulgularında, küp şeklinde kesilmiş sığır karaciğer dokusunun 24 saat süre ile %1 SDS ile muamelesini içeren Protokol 9'un

diğer protokollere kıyasla daha yüksek protein içeriğinde ($88,52 \pm 10,52 \mu\text{g/mL}$) sahip olduğu belirlenmiştir. Öte yandan diğer protokollerin birbirleriyle arasında ciddi bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Kontrol: $174,65 \pm 1,44 \mu\text{g/mL}$). Literatürde toplam protein miktarı farklı dokularda ve sığır karaciğeri dışında farklı kaynaklardan izole edilerek deselülerize edilmiş karaciğer dokusuyla çalışılmış ve elde edilen sonuçların benzerlik gösterdiği dikkat çekmiştir (Geerts vd. 2016).

HDM içeriğinde, karaciğer hücrelerinin fonksiyon göstereceği temel bileşenlerden biri olan kollajen miktarı, elde edilen toplam protein bulgularıyla olan ilişkisi gerçekleştirilen dHDM'deki tam kollajenin kantitatif analizi ile desteklenmiştir. Sert deterjanların HDM'nin özellikle temel yapısal bileşenlerine olan negatif etkisi bilinmektedir (Zhao vd. 2020). Bu çerçevede karaciğer HDM'sinde yer alan temel bileşenlerden biri olan kollajen de bu tez çalışmasında etkin deselülerizasyon protokollerinin belirlenmesinde biyoaktif içerik kapsamında kantitatif olarak analiz edilmiştir. Literatürle uyumlu olarak, %2 Triton X-100 ve %0,15 PAA kullanımını kapsayan protokollerde potansiyel olarak birbiri arasında anlamlı bir istatistiksel fark gözlenmemiştir ($p=n.s.$). Diğer yandan, %1 SDS kullanımını içeren Protokol 9'daki kollajen miktarının diğer protokollere kıyasla önemli ölçüde farklı olduğu ve kontrol grubu doğal karaciğerle de karşılaştırıldığında %81,06 oranında azaldığı görülmüştür. Ancak, sert bir deterjan olmasına rağmen daha düşük konsantrasyonda kullanımını (%0,1 SDS) kapsayan Protokol 11'de kontrol grubuyla kıyaslandığında kollajen içeriğinin %64,22 oranında korunabildiği belirlenmiştir. Nitekim, bu sonuç düşük konsantrasyonlarda SDS uygulamalarının Triton X-100 uygulamış protokoller ile benzer oranda kollajen içeriği muhafaza edebildiğini işaret etmektedir. Literatürde, deselülerize karaciğerin kollajen içeriği açısından bu tez çalışmasına kıyasla sonuçların karşılaştırılabilir olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada deselülerizasyonu, dilim şeklinde kesilmiş keçi karaciğeri, 72 saat 4°C 'de 2% Triton X- 100, 0.05 mM EDTA ve %0.025 NH_4OH uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Kontrole kıyasla GAG içeriği yüksek iken kollajen içeriğinin %80 oranında azaldığı bildirilmiştir (Agarwal vd. 2019). İnsan karaciğeriyle yapılan bir diğer çalışmada ise insan doğal karaciğer dokusundaki kollajen miktarının elde edilen deselülerize sığır karaciğer dokusuyla

karşılaştırıldığında anlamlı bir bağlantı kurulabileceği görülmüştür (Mazza vd. 2015). Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen dHDM'nin tam protein analizi ve kollajen miktarı arasında paralel bir ilişki olduğu da dikkat çekmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deselülerize sığır karaciğeri HDM'sinin yüzey morfolojisini mikrometre skalasında belirlemek, ultra-yapısını değerlendirmek ve yapılan deselülerizasyonun etkinliğini yorumlamak amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Deselülerizasyon sırasında deselülerizasyon ajanlarının hücre materyalleri uzaklaştırırken HDM bileşenine olan zararı vurgulanmıştır. Deselülerizasyonun etkinliği açısından ayrıca sGAG, toplam protein ve kollajen miktarı bakımından etkinlikleri ispatlanmış olan protokollerin HDM yapısına etkileri incelenmiştir. Elde edilen SEM analizi bulgularında, yapısal bozulmalar ve bazı bölgelerde gözenekler arasındaki bağlantılar dikkat çekmiştir. Birbirleri arasında kıyaslandığında SDS ile muamele edilen protokollerin nispeten Triton X-100 ile muamele edilen protokollere kıyasla yapısal bütünlüğün bozulduğu ve çok sayıda gözenekli doku bölgelerinin varlığı gözlenmiştir. Triton X-100 ve PAA ile muamele edilen gruplarda ise katı, sabit veya düz alanların hakim olduğu yapısal bütünlükle birlikte belirgin bir gözeneklenme veya bozunma tespit edilmemiştir. Gözeneklerin boyutu, dağılımı ve derinliğinin yetersizliği, kullanılan deselülerizasyon ajanlarının doku parçalarının içerisine nüfuz edebilecek kuvvete sahip olmadığını işaret etmektedir. Buradan hareketle, histokimyasal bulgulara da görüleceği üzere yer yer hücre kalıntılarının varlığının tespit edilmiş olması ile de desteklenebilmektedir. Nitekim literatür sonuçlarına paralel olarak, Triton X-100 ve PAA ile ayrı ayrı muamele edilmiş hepatik ve renal doku temelli benzer deselülerizasyon çalışmasında da yer yer hücre kalıntılarının varlığı dikkat çekmiştir (Wang vd. 2015).

Çalışmada, farklı formlarda biyomalzeme geliştirmeye yönelik ilk aşamada deselülerize edilen ve yüksek biyoaktif içeriğe sahip karaciğer HDM'si temelli hidrojel geliştirilmiştir. İlk olarak deselülerizasyon etkinliği histokimyasal ve DNA analizleriyle karakterize edildikten sonra biyoaktif içeriği ve ultra-yapısı aydınlatılan dört protokolün

pepsin muamelesiyle sindirimi literatüre uygun metotla gerçekleştirilmiştir (Freytes vd. 2008, Lee vd. 2014, Saheli vd. 2018). Yöntemin temel prensibi, pepsin enziminin asidik ortamında dHDM'nin sindiriminin gerçekleştirilmesiyle viskoz jelin elde edilmesi esasına dayanmaktadır (Freytes vd. 2008). Farklı protokollerden elde edilen hidrojenlerin makroskopik olarak incelenmesi ile yalnızca Protokol 9 ve Protokol 11 ile hazırlanan deselülerize HDM'lerinin sindiriminde belirgin bir çözünme ve vizkozite artışı gözlenmiştir. Makroskopik gözlemlere paralel olarak türbidimetrik jelleşme kinetiği analizleri ayrıca her dört protokol için de çalışılmıştır (Fernández-Pérez ve Ahearne 2019, Výborný vd. 2019). Türbidimetrik jelleşme kinetiğinin, matriksin katılığının ve bulanıklığının başlangıçta üssel bir artış sergilediği ve sonunda jelleşme süreci tamamlandığında, platoya ulaşmasıyla karakterize edildiği bildirilmiştir (Wedgwood vd. 2013). Elde edilen bulgularda, karaciğer HDM hidrojenine ait jelleşme kinetiği analizlerinde Protokol 9 ve Protokol 11'in katılmış olduğu gözlenmiştir. Türbidimetrik analizden birbirleri arasındaki olası yapısal farklılıkların hidrojenlerin katılması hakkında ek bilgiler edinmemize de yardımcı olmuştur. Bu süreci, hem sürecin erken aşamalarında gelişen t_{lag} fazı ve %50 jelleşmeye kadar geçen süre t_{50} fazı bağlamında, jel katılığının bir ölçüsü olarak jel bulanıklığının ölçülmesi ve normalize edilen sonuçların yorumlanmasıyla elde edilmiştir. Türbidimetrik jelleşme analizi verileri Protokol 9 ve Protokol 11'in tüm grupları için katılması/fiziksel çapraz bağlanması hemen hemen aynı zaman noktasında meydana gelen bir süreçte gerçekleştiğini göstermiştir (**Şekil 4.13**). Buna rağmen konsantrasyonlar ve protokoller arasındaki farklılık jelleşme hızıyla karakterize olduğu belirlenmiştir. Tüm protokoller için 37°C'de dkHDM hidrojenlerinin maksimum katılığa ulaştığı zaman noktası ortalama 85-90 dakika civarında olduğu gözlenmiştir. Sığır karaciğerinin SDS ile deselülerizasyonundan elde edilen Protokol 9 ve Protokol 11'e ait hidrojenin, t_{50} zaman noktasında literatürdeki birçok farklı deselülerize doku hidrojenine benzer jelleşme hızına sahip olduğu belirlenmiştir (Wolf vd. 2012, Sawkins vd. 2013, Zhao vd. 2019). Buna kıyasla t_{lag} fazı literatürdeki benzerlerine kıyasla neredeyse görülmemiştir ve bu sebeple hiperbolik bir eğri ile karakterize edilmiştir (Wolf vd. 2012, Sawkins vd. 2013, Zhao vd. 2019).

Doku mühendisliği iskelesi üretim yöntemlerinden biri olan dondurup-kurutma yöntemiyle 3B hepatik doku iskelelerinin elde edilmesi hedeflenmiştir. Günümüzde, dondurup-kurutma teknolojileri ilaç endüstrisi, gıda endüstrisi, malzeme mühendisliği, biyomalzeme mühendisliği, nanoteknoloji vb. birçok uygulama alanı mevcuttur. Su veya organik çözücü olabilen çözücü, düşük sıcaklık ve basınçta süblimleşme işlemi ile doğrudan buzdan buhara dönüşür (Fereshteh 2018). Bu yöntemle istenilen özelliklere sahip bir iskelenin üretilmesi için, yapının gözenekliliğinin, gözenek morfolojisinin ve bileşenlerin homojen bir dağılıma sahip olması gerekir (Loh ve Choong 2013). Aynı zamanda doku mühendisliği uygulamaları için üretilen 3B doku iskelesinin maksimum gözenekliliğinin yanı sıra bu gözenekliliğin birbiri arasında bağlantıları da önem teşkil etmektedir. İskelelerin gözenek boyutu ve gözenekliliği, büyüme faktörlerinin yayılmasında önemli bir rol oynar ve vaskülerizasyonu indükler, böylece karaciğere özgü fonksiyonların korunmasına yardımcı olmaktadır. Gözenek büyüklüğü, oksijen ve besin maddelerinin, iskelenin iç kısımlarına toplu olarak taşınmasını kontrol eden, böylece bölgedeki hücresel büyümeyi destekleyen önemli bir faktördür (Ma vd. 2007). Karaciğere özgü olarak hepatositlerin kültürü için birbirleri ile bağlantılı ve boyutları 50 ila 150 μm arasında değişen gözenekli yapı iskeleleri arzu edilmektedir (Wu vd. 2007). Gözenekli yapı iskeleleri, yeterli hücre tohumlama ve çoğalması için gerekli olan yüksek yüzey/hacim oranı sağlamaktadır. Ayrıca, hepatositler diğer hücrelere kıyasla 5 ila 10 kat daha fazla oksijen tükettikleri için besin transferi, oksijen ve diğer metabolik değişimleri gerçekleştirirler (Park 2002, Park ve Bae 2002). Bu tez çalışması kapsamında da bu amaçla ilk aşamada 3B doku iskelelerinin morfolojik özelliklerinin karakterizasyonu amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda optimal jelleşme kinetiğine sahip protokoller ile geliştirilen 3B hepatik doku iskelelerinin 100 ila 200 μm arasında değişen uygun gözenek boyutu ve dağılımı karakterize edilmiştir, hücrelerin gaz ve besin alışverişine elverişli gözeneklerin yüksek yüzey/hacim oranına sahip olduğu belirlenmiştir (Fan ve Yang 2017). Bu bağlamda 3B hepatik doku iskelesine entegre edilecek hücrelerin, dondurup-kurutma tekniği sayesinde birbirleriyle büyük ölçüde bağlantılı mikro/makro gözenekler üzerinde, proliferasyonu, migrasyonu, farklılaşması ve sürdürülebilirliği açısından elverişli ortamı sağlayacağı düşünülmektedir (Fan ve Yang 2017). Literatürde karaciğer doku mühendisliği doku iskeletlerinin gözenek boyutları, 100 μm 'den büyük gözenek

boyutunun, kütle aktarım sınırlamaları olmaksızın optimum canlılık ve fonksiyon sağladığı kanıtlanmıştır (Seo vd. 2006, She vd. 2010). Nitekim, geliştirilen 3B hepatik doku iskelelerin hücre morfolojisinin devamlılığı, metabolik aktivite ve neovaskülerizasyona elverişli ortamı sağlayacağı düşünülmektedir.

Geliştirilen 3B hepatik doku iskelelerinin kimyasal yapısının kantitatif değerlendirilmesi amacıyla hepatik iskelelerin işlevinin değerlendirilmesi için FTIR tekniği kullanılarak karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, ATR-FTIR tekniği ile sığır kaynağından izole edilerek deselülerizasyon yöntemiyle elde edilen 3B hepatik doku iskelelerinin bileşenleri, kontrolle ve kendi aralarında karşılaştırmalı analiz gerçekleştirilmiştir. Bu teknik, hücresizleştirilmiş biyo-iskelelerde kollajen lif ve proteoglikanın içeriği ve dağılımı dahil olmak üzere daha ayrıntılı bilgiler sağlamıştır. Nitekim elde edilen bulgular, kolorimetrik biyoaktif içerik analiz bulgularını destekler niteliktedir. Yapılan bu çalışmada dkHDM'den elde edilen 3B hepatik doku iskelesine ait spektrumundaki pikler, proteoglikanlar ve kollajeni karşılaştıran daha önce kıkırdak ve perikardium üzerinde yapılan yayınlanmış çalışmalara benzer şekilde, sGAG'lerin ve karbohidratların karakteristik spektral özellikleriyle paralellik göstermektedir (Camacho vd. 2001, Seif-Naraghi vd. 2012). Deselülerize domuz karaciğeriyle yapılan bir başka çalışmada yine benzer şekilde HDM bileşenlerine ait ayırt edici piklerin varlığı rapor edilmiştir (Zhao vd. 2020). Çalışmada elde edilen bulgular, 3B doku iskelelerindeki biyoaktif içeriğin belirlenmesine yönelik farklı bir yaklaşım sunmaktadır. Hem literatürdeki benzer çalışmalarla hem de kendi aralarında kıyaslandığında Protokol 11'e ait sünger iskelelerin Protokol 9'a kıyasla spesifik noktalardaki görece yüksek piklerin varlığı, barındırdıkları yüksek HDM bileşenleri ile ilişkilendirilmiştir.

Doku mühendisliği uygulamalarında matriksin mekanik özellikleri, doku iskelesine tohumlanan hücrelerin spesifik biyolojik işlevlerini yönlendirerek fonksiyon, proliferasyon ve farklılaşma gibi özelliklerini önemli ölçüde etkilediği bilinmektedir (Ang vd. 2006). Birçok farklı karmaşık fonksiyonu yerine getiren karaciğer dokusunun mekanik özellikleri bakımından da taklit edilebilmesi önem arz etmektedir. Kollajen ve

polyesterler gibi birçok farklı doku iskelesi, hücre büyümesini ve bazı karaciğere özgü işlevleri destekleyebilmektedir. Ancak karaciğer temelli yenileyici tıbbın karşı karşıya kaldığı başlıca zorluklar arasında, klinik transplantasyon için hazırlanan doku iskelelerinde aranan işlevsellik, fonksiyonellik ve biyomekanik stabilite gereksinimleridir (Zhou vd. 2015). Deselülerizasyon yöntemiyle doğal karaciğer dokusundan biyomalzeme elde edilmesi ve karakterizasyonlarla desteklenmesi zaten fonksiyonel dokuya en yakın içeriğe ve işlevselliğe sahip yapıların üretimine olanak sağlama potansiyeline sahiptir. Buna ek olarak çalışmada bir diğer kritik parametre olan mekanik özellikler ayrıca ele alınmıştır. Bu amaçla, elde edilen farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 3B hepatik iskeleler detaylı mekanik karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve optimal HDM konsantrasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Böylelikle farklı konsantrasyondaki jellerden üretilen 3B sünger iskelelerin mekanik dayanımı *in vitro* ve *in vivo* uygulamaları için uygunluğu, yapılan basma testleriyle belirlenmiştir. Literatürle kıyaslandığında doğal karaciğer dokusuyla ve diğer deselülerize maktriiks iskelelerle benzer mekanik özellikler gösterdiği tespit edilmiştir (Pervin vd. 2011, Mattei vd. 2014, Tirella vd. 2014). Hem literatürdeki benzer örnekliklerle hem de kendi aralarında kıyaslandığında Protokol 11'e ait iskelelerin Protokol 9'a kıyasla mekanik dayanımının daha elverişli olduğu sonucuna varılmıştır.

Su tutma karakteri doku mühendisliği iskelelerinin, sıvıları absorbe etme ve besin maddeleri ile atıkları değiştirme yeteneği, biyomedikal uygulamalarda iskelelerin en önemli özelliklerinden birisidir (Nasiri ve Mashayekhan 2017). Çapraz bağlanmış biyomalzemeler su alarak şişme davranışı gösterirler ve yapılarındaki polar grupların varlığına bağlı olarak kuru ağırlıklarının binlerce katı kadar su alabilirler. Sünger iskeleler daha önce açıklandığı üzere 37°C'de dHDM hidrojellerin fizikokimyasal özelliğinden faydalanılarak katılaştırıldıktan sonra sünger iskele üretilmiştir. Yapılan bu çalışmada 9 numaralı ve 11 numaralı protokol için her biri tek bir standartta hazırlanmış olan 3B sünger iskeleler kullanılmıştır. Literatürde su tutma özelliklerinin temel olarak kimyasal bileşimlerine ve konsantrasyonlarına bağlı olduğu ayrıca polar grupların çapraz bağlanmaya katılmasıyla orantılı olarak da azaldığı vurgulanmıştır (Ma vd. 2003, Vurat vd. 2020b). Her iki protokol için de 3B hepatik doku iskelelerinde

konsantrasyona ve içerik farkına bağlı olarak kendi içerisinde tutarlı sonuçlar elde edildiği görülmüştür.

Doku mühendisliği iskeleleri, *in vitro* kültür koşullarında veya *in vivo* ortamda 37°C'lik sabit fizyolojik sıcaklıkta sürekli olarak ısı enerjisiye maruz kalmaktadırlar. Bununla birlikte, termal bozunma, malzemenin bu ısı işlem süreci sırasında, malzemenin kimyasal bileşimini bozabilecek ve sitotoksitesini ve biyouyumluluğunu değiştirebilecek bozunma yan ürünleri gibi daha küçük moleküler parçaların oluşmasına neden olabilmektedir (Lih vd. 2016). Dolayısıyla, biyomalzemelerin termal stabilitesi, absorblanabilir yapı iskeleleri üretmek için önemli bir özelliktir. Çalışmada farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 3B hepatik doku iskelelerine ait termal kararlılığın karşılaştırmalı analizlerden elde edilen bulgularda büyük ölçüde benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Elden edilen veriler ışığında sünger iskelelerin üretilme yöntemi nedeniyle (dondurup-kurutulan yöntemde) süblimleşen suyun iskelede var olmayışı sebebiyle genelde gözlenen karakteristik 0-100°C'deki nemin buharlaşma basamağı beklenildiği üzere gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra çoğunluğu kollajenden oluşan organik bileşiklerin ayrışmasına bağlı olan 200-400°C'de büyük bir kütle kaybı basamağı belirlenmiştir. Sıcaklığın yükselmesiyle devam eden bozunmada büyük çoğunluğu dkHDM hidrojelinin üretimi sırasında kullanılan PBS içeriğinden kaynaklanan tuzların sebep olduğu inorganik bileşiklerin mevcudiyetinden kaynaklanmaktadır (Lih vd. 2016, Feng vd. 2020). 3B hepatik doku iskelesinin termal kararlılığına ait bulgular, çeşitli deselülerizasyon teknikleri kullanılarak üretilen dHDM iskeleleri ile karşılaştırılabilir veriler sunmuştur (Au-Yeung vd. 2017, Feng vd. 2020, Wang vd. 2020).

3B hepatik doku iskelelerinin doku mühendisliği ve yenileyici tıp alanındaki potansiyel kullanımı açısından bir diğer etken olan *in vitro* veya *in vivo* olarak biyouyumluluğunu gerekli kılmaktadır. Sitotoksite testi, hücre büyümesini, çoğalmasını ve morfolojik etkilerini gözlemlemek için *in vitro* ortamda hücreler kullanan biyolojik olarak değerlendirilmesi mümkündür. Yapılan pek çok çalışmadaki gibi biyomalzemelerin besiyeri, serum fizyolojik veya PBS içerisinde ekstraksiyonu yoluyla hücreler ile

etkileştirilmesi sağlanabilir (Li vd. 2015). Literatür incelendiğinde çok çeşitli doku mühendisliği iskelelerinin sitotoksikite testine tabi tutulduğu görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, ipek fibroin ve süperparamagnetik demir oksit nanopartikül (SPION) kompozitinin elektroegirme yöntemiyle elde edilen bir doku iskelesinin, 3B hepatik doku iskeleleriyle yapılarına benzer şekilde hücre canlılığına sahip olduğu gösterilmiştir (Lalegül- Ülker vd. 2019). Domuz karaciğerinin deselülerizasyonu ve ardından pepsin ile parçalanması ile elde edilen benzer bir çalışmada ise hücre canlılığı değerlendirilmiş ve toksik olmadığı bildirilmiştir (Coronado vd. 2017). Yapılan bir başka çalışmada ise deselülerize sıçan karaciğeri HDM'si ve kollajen kıyaslanarak 35 güne kadar hücre canlılığı takip edilebilmiştir (Lin vd. 2004).

Deselülerize matriksin kimyasal bileşiminin, nano/mikro yapısının veya mekanik özellikleri açısından değerlendirildiğinde *de novo* sentezlenmesi mümkün olamamaktadır. Doku/organların hücresizleştirilmesi, böyle karmaşık bir yapının *de novo* sentezlenmesinin zorluğu nedeniyle gereklidir. Karaciğer dokusu, karaciğer dHDM'sinin mevcut içeriğine en yakın olduğu düşüncesiyle, halihazırda mevcut bulunan yapay, doğal ve hibrit biyopolimerlere göre daha iyi taklit edebileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak, sıgır karaciğeri dokusunun farklı yöntemler kullanılarak deselülerizasyonu; deselülerizasyon etkinliğinin ve etkin deselülerize matrikslerin biyoaktif içeriğinin aydınlatılması açısından gerçekleştirilen karakterizasyonu ve fonksiyonel 3B hepatik doku iskelesinin üretilmesi amacıyla geliştirilen biyoaktif içeriğe sahip deselülerize karaciğer HDM hidrojelinin karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Etkin deselülerizasyon protokollerinden elde edilen hidrojellerin ve 3B iskelelerin karakterizasyonunda birbirleriyle ve literatürdeki benzer doku mühendisliği iskeleleriyle uyumlu sonuçların elde edildiği belirlenmiştir.

Kendine özgü içeriği, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve fonksiyonunun devamlılığını sağlayan önemli ipuçları içermesi bakımından hücrelerinden arındırılmış ve doku taslağı olarak kullanım potansiyeli açıktır. Reselülerize edildiğinde hücrelerin tutunması ve uzaysal organizasyonun temini için substrat olarak bir niş oluşturan 3B

hepatik doku iskelelerinin, karaciğer rejenarasyonu için hedefe yönelik kullanılabilirliğine ilişkin bulgular dikkat çekmektedir. Bu hedef doğrultusunda gerçekleştirilen analiz ve karakterizasyonlar ışığında biyoaktif içeriğini muhafaza edilen doğal dokuya benzer potansiyeli ve doku mühendisliği açısından yüksek katma değerli bir tıbbi cihaz olarak faydalanılabilecek ürün geliştirildiği savunulabilir. Geliştirilen 3B iskele *in vitro* uygulamalarından *in vivo* implantasyonlara pek çok farklı amaçla kullanım potansiyeli sunabileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra sadece 3B hepatik doku iskelesi olarak değil, elde edilen karaciğer dHDM hidrojelinin biyobasım ve çip üzeri organ sistemlerinde; kişiselleştirilmiş tıp/ilaç sistemleriyle farmasötik uygulamalarda; enjekte edilebilir biyomalzemelerle yenileyici tıp alanında; yüzey kaplama veya doku mühendisliği yamalarının üretimleri gibi çok çeşitli geniş bir yelpazede kullanılabilirliği öngörülmektedir. Bu tez çalışmasının devamı niteliğinde, ilerleyen çalışmaların bahsi edilen bu alanlarda çalışmaların bir devamı şeklinde geliştirilmesi ve farklı yöntemler denenerek deselülerizasyon yönteminin farklı dokular için geliştirilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Misih, S.R. and Bloomston, M. 2010. Liver anatomy. *Surgical Clinics*, 90(4); 643-653.
- Agarwal, T., Maiti, T.K. and Ghosh, S.K. 2019. Decellularized caprine liver-derived biomimetic and pro-angiogenic scaffolds for liver tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 98; 939-948.
- Agrawal, V., Johnson, S.A., Reing, J., Zhang, L., Tottey, S., Wang, G., Hirschi, K.K., Braunhut, S., Gudas, L.J. and Badylak, S. F. 2010. Epimorphic regeneration approach to tissue replacement in adult mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8); 3351-3355.
- Andez, A.M.H. and Amenta, P.S. 1995. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *The FASEB journal*, 9(14); 1401-1410.
- Ang, K. C., Leong, K.F., Chua, C.K. and Chandrasekaran, M. 2006. Investigation of the mechanical properties and porosity relationships in fused deposition modelling-fabricated porous structures. *Rapid Prototyping Journal*.
- Asrani, S.K., Devarbhavi, H., Eaton, J. and Kamath, P.S. 2019. Burden of liver diseases in the world. *Journal of hepatology*, 70(1); 151-171.
- Atala, A., Bauer, S.B., Soker, S., Yoo, J.J. and Retik, A.B. 2006. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *The lancet*, 367(9518); 1241-1246.
- Aterman, K. 1986. The parasinusoidal cells of the liver: a historical account. *The Histochemical Journal*, 18(6); 279-305.
- Au-Yeung, G.C.T., Sarig, U., Sarig, H., Bogireddi, H., Bronshtein, T., Baruch, L., Spizzichino, A., Bortman J., Freddy, B.Y.C., Machluf, M. ve Venkatraman, S. S. 2017. Restoring the biophysical properties of decellularized patches through recellularization. *Biomaterials science*, 5(6); 1183-1194.
- Badylak, S.F. 2007. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, 28(25); 3587-3593.
- Bañares, R., Catalina, M.V. ve Vaquero, J. 2013. Liver support systems: will they ever reach prime time?. *Current gastroenterology reports*, 15(3); 312.
- Baptista, P.M., Siddiqui, M.M., Lozier, G., Rodriguez, S.R., Atala, A. and Soker, S. 2011. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology*, 53(2); 604-617.
- Beattie, A.J., Gilbert, T.W., Guyot, J.P., Yates, A.J. and Badylak, S.F. 2009. Chemoattraction of progenitor cells by remodeling extracellular matrix scaffolds. *Tissue Engineering Part A*, 15(5); 1119-1125.
- Bedossa, P. and Paradis, V. 2003. Liver extracellular matrix in health and disease. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 200(4); 504-515.
- Bhatia, S.N. and Ingber, D.E. 2014. Microfluidic organs-on-chips. *Nature biotechnology*, 32(8); 760-772.
- Bismuth, H. 1982. Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. *World journal of surgery*, 6(1); 3-9.
- Bonavita, A.G., Quaresma, K., Cotta- de- Almeida, V., Pinto, M.A., Saraiva, R.M. and Alves, L.A. 2010. Hepatocyte xenotransplantation for treating liver disease. *Xenotransplantation*, 17(3); 181-187.

- Bozkurt, O., Severcan, F., Bayari, S.H., Severcan, M., Krafft, C., and Popp, J. 2012. Structural alterations in rat liver proteins due to streptozotocin-induced diabetes and the recovery effect of selenium: Fourier transform infrared microspectroscopy and neural network study. *Journal of Biomedical Optics*, 17(7); 076023.
- Brown, B.N. ve Badylak, S.F. 2014. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. *Translational Research*, 163(4), 268-285.
- Brown, B.N., Valentin, J.E., Stewart-Akers, A.M., McCabe, G.P. and Badylak, S.F. 2009. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials*, 30(8); 1482-1491.
- Butler, D.L. 2000. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *Journal of Biomechanical Engineering*, 122; 570-575.
- Cai, J., Zhao, Y., Liu, Y., Ye, F., Song, Z., Qin, H., Meng, S., Chen, Y., Zhou, Y., Song, X. and Guo, Y. 2007. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology*, 45(5); 1229-1239.
- Camacho, N.P., West, P., Torzilli, P.A., and Mendelsohn, R. 2001. FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 62(1); 1-8.
- Campard, D., Lysy, P.A., Najimi, M. and Sokal, E. M. 2008. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology*, 134(3); 833-848.
- Campoccia, D., Doherty, P., Radice, M., Brun, P., Abatangelo, G. and Williams, D.F. 1998. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials*, 19(23); 2101-2127.
- Chen, G., Ushida, T., and Tateishi, T. 2002. Scaffold design for tissue engineering. *Macromolecular Bioscience*, 2(2); 67-77.
- Chiang, C.H., Chang, C.C., Huang, H.C., Chen, Y.J., Tsai, P.H., Jeng, S.Y. and Lee, F. Y. 2011. Investigation of hepatoprotective activity of induced pluripotent stem cells in the mouse model of liver injury. *BioMed Research International*, 2011.
- Coronado, R.E., Somaraki-Cormier, M., Natesan, S., Christy, R.J., Ong, J. L. and Halff, G. A. 2017. Decellularization and solubilization of porcine liver for use as a substrate for porcine hepatocyte culture: method optimization and comparison. *Cell transplantation*, 26(12); 1840-1854.
- Crapo, P.M., Gilbert, T.W., and Badylak, S.F. 2011. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32(12); 3233-3243.
- Cravedi, P., Farouk, S., Angeletti, A., Edgar, L., Tamburrini, R., Duisit, J. and Orlando, G. 2017. Regenerative immunology: the immunological reaction to biomaterials. *Transplant International*, 30(12); 1199-1208.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S. and Norotte, C. 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell*, 3(3); 301-313.
- Daley, W.P., Peters, S.B. and Larsen, M. 2008. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of cell science*, 121(3); 255-264.
- Damania, A., Kumar, A., Teotia, A.K., Kimura, H., Kamihira, M., Ijima, H., Sarin, S.K. and Kumar, A. 2018. Decellularized liver matrix-modified cryogel scaffolds as potential hepatocyte carriers in bioartificial liver support systems and

- implantable liver constructs. *ACS applied materials & interfaces*, 10(1); 114-126.
- Di Meglio, F., Nurzynska, D., Romano, V., Miraglia, R., Belviso, I., Sacco, A.M., Barbato, V., Di Gennaro, M., Granato, G., Maiello, C., Montagnani, S. and Castaldo, C. 2017. Optimization of human myocardium decellularization method for the construction of implantable patches. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 23(9); 525-539.
- Diekmann, S., Bader, A., and Schmitmeier, S. 2006. Present and future developments in hepatic tissue engineering for liver support systems. *Cytotechnology*, 50(1-3); 163-179.
- Ding, R., Yu, X., Wang, P., Zhang, J., Zhou, Y., Cao, X. and Zhang, P. 2016. Hybrid photosensitizer based on amphiphilic block copolymer stabilized silver nanoparticles for highly efficient photodynamic inactivation of bacteria. *RSC advances*, 6(24); 20392-20398.
- Dixon, L.J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M.T. and Nagy, L.E. 2013. Kupffer cells in the liver. *Comprehensive Physiology*, 3(2); 785-797.
- Du, C., Narayanan, K., Leong, M. F. and Wan, A. C. 2014. Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes and endothelial cells in multi-component hydrogel fibers for liver tissue engineering. *Biomaterials*, 35(23); 6006-6014.
- Duan, B.W., Lu, S.C., Wang, M.L., Liu, J.N., Chi, P., Lai, W. and Zeng, D. B. 2013. Liver transplantation in acute-on-chronic liver failure patients with high model for end-stage liver disease (MELD) scores: a single center experience of 100 consecutive cases. *Journal of surgical research*, 183(2); 936-943.
- Elçin, Y.M. 2017. Organs-on-Chips & 3D–Bioprinting Technologies for Personalized Medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(3); 319-320.
- Elçin, M. 2015. “Kök Hücrelere Bakış: Tanımlar, Kavramlar ve Sınıflandırmalar.” *Tüba Kök Hücre Araştırmaları ve Biyoetik Sempozyumu Raporu*.
- Elçin, Y.M. 2008. *Doku Mühendisliği. Türkiye Klinikleri Hematoloji-Özel Konular*, 1(2); 36-43.
- Esch, M.B., Prot, J.M., Wang, Y.I., Miller, P., Llamas-Vidales, J.R., Naughton, B.A., Applegate, D.R. and Shuler, M. L. 2015. Multi-cellular 3D human primary liver cell culture elevates metabolic activity under fluidic flow. *Lab on a Chip*, 15(10); 2269-2277.
- Fan, J. and Yang, J. 2017. Preparation and characterization of a chitosan/galactosylated hyaluronic acid/heparin scaffold for hepatic tissue engineering. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, 28(6); 569-581.
- Faulk, D.M. and Badylak, S.F. 2014. Natural biomaterials for regenerative medicine applications. In *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation* Academic Press, 101-112
- Faulk, D.M., Johnson, S.A., Zhang, L. and Badylak, S.F. 2014. Role of the extracellular matrix in whole organ engineering. *Journal of cellular physiology*, 229(8); 984-989.
- Fedorovich, N.E., Alblas, J., de Wijn, J.R., Hennink, W.E., Verbout, A.J. and Dhert, W.J. 2007. Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel application in organ printing. *Tissue engineering*, 13(8); 1905-1925.
- Feldmann, G. 1989. The cytoskeleton of the hepatocyte: structure and functions. *Journal of hepatology*, 8(3); 380-386.

- Feng, B., Ji, T., Wang, X., Fu, W., Ye, L., Zhang, H., and Li, F. 2020. Engineering cartilage tissue based on cartilage-derived extracellular matrix cECM/PCL hybrid nanofibrous scaffold. *Materials & Design*, 108773.
- Feng, Z. Q., Chu, X. H., Huang, N.P., Leach, M.K., Wang, G., Wang, Y.C., Ding, Y.T. and Gu, Z.Z. 2010. Rat hepatocyte aggregate formation on discrete aligned nanofibers of type-I collagen-coated poly (L-lactic acid). *Biomaterials*, 31(13); 3604-3612.
- Fereshteh, Z. 2018. Freeze-drying technologies for 3D scaffold engineering. In *Functional 3D tissue engineering scaffolds*. Woodhead Publishing, 151-174, Sawston, Cambridge.
- Fernández-Pérez, J., and Ahearne, M. 2019. The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels. *Scientific reports*, 9(1); 1-12.
- Fiegel, H. C., Kaufmann, P.M., Bruns, H., Kluth, D., Horch, R.E., Vacanti, J.P., and Kneser, U. 2008. Hepatic tissue engineering: from transplantation to customized cell- based liver directed therapies from the laboratory. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(1); 56-66.
- Fong, E. and Tirrell, D.A. 2010. Collective Cell Migration on Artificial Extracellular Matrix Proteins Containing Full- Length Fibronectin Domains. *Advanced Materials*, 22(46); 5271-5275.
- Freytes, D.O., Martin, J., Velankar, S.S., Lee, A.S. and Badylak, S.F. 2008. Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. *Biomaterials*, 29(11); 1630-1637.
- Fuhrman, C., Jougla, E., Nicolau, J., Eilstein, D. and Delmas, M. C. 2006. Deaths from chronic obstructive pulmonary disease in France, 1979–2002: a multiple cause analysis. *Thorax*, 61(11); 930-934.
- Gardner, A.B., Lee, S.K., Woods, E.C. and Acharya, A.P. 2013. Biomaterials-based modulation of the immune system. *BioMed research international*.
- Geerts, S., Ozer, S., Jaramillo, M., Yarmush, M. L., and Uygun, B.E. 2016. Nondestructive methods for monitoring cell removal during rat liver decellularization. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 22(7); 671-678.
- Gilbert, T. W., Stewart-Akers, A. M., Simmons-Byrd, A. and Badylak, S.F. 2007. Degradation and remodeling of small intestinal submucosa in canine Achilles tendon repair. *JBJS*, 89(3); 621-630.
- Gilbert, T.W., Sellaro, T. L. and Badylak, S.F. 2006. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27(19); 3675-3683.
- Glisson, F. 1654. *Anatomia hepatis*. Typis Du-Gardianis, London.
- Grant, R., Hallett, J., Forbes, S., Hay, D., and Callanan, A. 2019. Blended electrospinning with human liver extracellular matrix for engineering new hepatic microenvironments. *Scientific reports*, 9(1); 1-12.
- Gressner, A.M. and Bachem, M.G. 1990. Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. In *Seminars in liver disease*. Thieme Medical Publishers, 10(01); 30-46.
- Gressner, M., and Weiskirchen, R. 2006. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- β as major players and therapeutic targets. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10; 76–99.
- Grisham, J.W. 2009. Organizational principles of the liver. *The liver: biology and pathobiology*, 1-15.

- Hammond, J.S., Beckingham, I.J. and Shakesheff, K.M. 2006. Scaffolds for liver tissue engineering. *Expert review of medical devices*, 3(1); 21-27.
- Hay, E. 1991. *Cell Biology of Extracellular Matrix* New York: Springer Science+Business Media, 1-7, New York.
- Hollister, S.J. 2005. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials*, 4(7); 518-524.
- Huang, H., Oizumi, S., Kojima, N., Niino, T. and Sakai, Y. 2007. Avidin–biotin binding-based cell seeding and perfusion culture of liver-derived cells in a porous scaffold with a three-dimensional interconnected flow-channel network. *Biomaterials*, 28(26); 3815-3823.
- Huh, D., Hamilton, G.A. and Ingber, D. E. 2011. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in cell biology*, 21(12); 745-754.
- Hussein, K.H., Park, K.M., Ghim, J. H., Yang, S.R. and Woo, H.M. 2016. Three dimensional culture of HepG2 liver cells on a rat decellularized liver matrix for pharmacological studies. *Journal of biomedical materials research part B: applied biomaterials*, 104(2); 263-273.
- Hussey, G.S., Dziki, J.L. and Badylak, S.F. 2018. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. *Nature Reviews Materials*, 3(7); 159-173.
- Hyysalo, A., Ristola, M., Mäkinen, M.E.L., Häyrynen, S., Nykter, M. and Narkilahti, S. 2017. Laminin $\alpha 5$ substrates promote survival, network formation and functional development of human pluripotent stem cell-derived neurons in vitro. *Stem cell research*, 24; 118-127.
- Ishii, T., Fukumitsu, K., Yasuchika, K., Adachi, K., Kawase, E., Suemori, H. and Uemoto, S. 2008. Effects of extracellular matrixes and growth factors on the hepatic differentiation of human embryonic stem cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(2), G313-G321.
- Itoh, T. and Miyajima, A. 2014. Liver regeneration by stem/progenitor cells. *Hepatology*, 59(4); 1617-1626.
- Jamieson, G.G. 2006. *Anatomy of general surgical operations*. Elsevier Health Sciences.
- Janorkar, A.V., Rajagopalan, P., Yarmush, M.L. and Megeed, Z. 2008. The use of elastin-like polypeptide–polyelectrolyte complexes to control hepatocyte morphology and function in vitro. *Biomaterials*, 29(6); 625-632.
- Jen, A.C., Wake, M.C. and Mikos, A.G. 1996. Hydrogels for cell immobilization. *Biotechnology and bioengineering*, 50(4); 357-364.
- Ji, Y., Yang, X., Ji, Z., Zhu, L., Ma, N., Chen, D., Jia, X., Tang, J. and Cao, Y. 2020. DFT-Calculated IR Spectrum Amide I, II, and III Band Contributions of N-Methylacetamide Fine Components. *ACS omega*, 5(15); 8572-8578.
- Jović, M., Nikolić, I., Todorović, V., Petrović, A., Petrović, V., Mojsilović, M. and Denčić, T. 2018. Distribution of collagen i, iii, and iv and laminin in the human liver during prenatal development. *Cells Tissues Organs*, 205(3); 164-177.
- Junqueira, L.C. and Mescher, A.L. 2013. *Junqueira's basic histology: text & atlas*/Anthony L. Mescher.
- Kabirian, F. and Mozafari, M. 2020. Decellularized ECM-derived bioinks: Prospects for the future. *Methods*, 171; 108-118.
- Kanel, G.C. and Korula, J. 2010. *Atlas of Liver Pathology E-Book*. Elsevier Health Sciences.

- Karpen, S.J. and Crawford, J.M. 1999. Cellular and molecular biology of the liver. *Current opinion in gastroenterology*, 15(3); 184-191.
- Kaul, H. and Ventikos, Y. 2015. On the genealogy of tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng. Part B Rev.* 21(2); 203–217
- Kikkawa, Y., Sudo, R., Kon, J., Mizuguchi, T., Nomizu, M., Hirata, K. and Mitaka, T. 2008. Laminin $\alpha 5$ mediates ectopic adhesion of hepatocellular carcinoma through integrins and/or Lutheran/basal cell adhesion molecule. *Experimental cell research*, 314(14); 2579-2590.
- Kim, B.S., Park, I.K., Hoshiba, T., Jiang, H.L., Choi, Y.J., Akaike, T. ve Cho, C.S. 2011. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 36(2); 238-268.
- Kim, S.J., Park, K.C., Lee, J.U., Kim, K.J. and Kim, D. G. 2011. Therapeutic potential of adipose tissue-derived stem cells for liver failure according to the transplantation routes. *Journal of the Korean Surgical Society*, 81(3); 176-186.
- Kinasiewicz, A., Dudziński, K., Chwojnowski, A., Weryński, A. and Kawiak, J. 2007. Three-dimensional culture of hepatocytes on spongy polyethersulfone membrane developed for cell transplantation. In *Transplantation proceedings*, Elsevier, 39(9); 2914-2916. New York.
- Kropp, B.P., Badylak, S. and Thor, K.B. 1995. Regenerative bladder augmentation: a review of the initial preclinical studies with porcine small intestinal submucosa. In *Muscle, Matrix, and Bladder Function*, Springer, 229-235, Boston, MA.
- Kuntz, E. and Kuntz, H. D. 2009. *Hepatology: Textbook and atlas*. Springer Science & Business Media.
- Kurita, K. 2006. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8(3); 203-226.
- Lalegül- Ülker, Ö., Vurat, M.T., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2019. Magnetic silk fibroin composite nanofibers for biomedical applications: Fabrication and evaluation of the chemical, thermal, mechanical, and in vitro biological properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(41); 48040.
- Langer, R. and Vacanti, J.P. 1993. Tissue engineering. *Science* 260(5110), 920–926
- Lawler, DM. 2005. Spectrophotometry turbidimetry and nephelometry. In *Encyclopedia of Analytical Science*, Elsevier, 152-163.
- Lee, J.S., Shin, J., Park, H.M., Kim, Y.G., Kim, B.G., Oh, J.W. and Cho, S.W. 2014. Liver extracellular matrix providing dual functions of two-dimensional substrate coating and three-dimensional injectable hydrogel platform for liver tissue engineering. *Biomacromolecules*, 15(1); 206-218.
- Lee, K.Y. and Mooney, D.J. 2001. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical reviews*, 101(7); 1869-1880.
- Leffert, H.L., Koch, K.S., Moran, T. and Williams, M. 1979. Liver cells. In *Methods in enzymology*, 58, 536-544. Academic Press.
- Lelièvre, S., Weaver, V.M. and Bissell, M. J. 1996. Extracellular matrix signaling from the cellular membrane skeleton to the nuclear skeleton: a model of gene regulation. *Recent progress in hormone research*, 51; 417.
- Lewis R. and Downes MN. 2019. Liver. In *Anatomy and Histology of the Laboratory rat in Toxicology and Biomedical Research*. 159-168. Academic Press.
- Lewis, P.L., Yan, M., Su, J. and Shah, R.N. 2019. Directing the growth and alignment of biliary epithelium within extracellular matrix hydrogels. *Acta biomaterialia*, 85; 84-93.

- Li, D. and Friedman, S.L. 2003. Molecular mechanism of stellate cell activation and extracellular matrix remodeling. In *Extracellular Matrix and the Liver*, 155-178. Academic Press.
- Li, K., Wang, Y., Miao, Z., Xu, D., Tang, Y. and Feng, M. 2004. Chitosan/gelatin composite microcarrier for hepatocyte culture. *Biotechnology letters*, 26(11); 879-883.
- Li, W., Zhou, J., and Xu, Y. 2015. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical reports*, 3(5); 617-620.
- Liang, X.J., Chen, X.J., Yang, D.H., Huang, S.M., Sun, G.D. and Chen, Y.P. 2011. Human umbilical cord mesenchymal stem cells by hTERT Gene Transfection can differentiate into hepatocyte-like cells in vitro. *Cell Biol Int*.
- Lih, E., Park, K.W., Chun, S.Y., Kim, H., Kwon, T.G., Joung, Y.K. and Han, D.K. 2016. Biomimetic porous PLGA scaffolds incorporating decellularized extracellular matrix for kidney tissue regeneration. *ACS applied materials & interfaces*, 8(33); 21145-21154.
- Lin, C.H., Yang, J.R., Chiang, N.J., Ma, H. and Tsay, R.Y. 2014. Evaluation of decellularized extracellular matrix of skeletal muscle for tissue engineering. *The International journal of artificial organs*, 37(7); 546-555.
- Lin, P., Chan, W.C., Badylak, S.F., and Bhatia, S.N. 2004. Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering. *Tissue Engineering*, 10(7-8); 1046-1053.
- Loh, Q.L. and Choong, C. 2013. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(6); 485-502.
- Lopresti, S.T. and Brown, B.N. 2015. Host response to naturally derived biomaterials. In *Host Response to Biomaterials*, 53-79. Academic Press.
- Lozoya, O.A., Wauthier, E., Turner, R.A., Barbier, C., Prestwich, G.D., Guilak, F. and Reid, L.M. 2011. Regulation of hepatic stem/progenitor phenotype by microenvironment stiffness in hydrogel models of the human liver stem cell niche. *Biomaterials*, 32(30); 7389-7402.
- Lu, J., Zhang, X., Li, J., Yu, L., Chen, E., Zhu, D., Zhang, Y. and Li, L. 2016. A new fluidized bed bioreactor based on diversion-type microcapsule suspension for bioartificial liver systems. *PLoS one*, 11(2); e0147376.
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V.M. and Werb, Z. 2011. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12); a005058.
- Luo, Y. and Ma, L. 2020. Bioprosthetic heart valves with reduced immunogenic residuals using vacuum-assisted decellularization treatment. *Biomedical Materials*, 15(6); 065012.
- Ma, C.Y.J., Kumar, R., Xu, X.Y. and Mantalaris, A. 2007. A combined fluid dynamics, mass transport and cell growth model for a three-dimensional perfused bioreactor for tissue engineering of haematopoietic cells. *Biochemical engineering journal*, 35(1); 1-11.
- Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., Shen, J., Hu, X. and Han, C. 2003. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*, 24(26); 4833-4841.
- Ma, X., Qu, X., Zhu, W., Li, Y.S., Yuan, S., Zhang, H., and Feng, G.S. 2016. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via

- rapid 3D bioprinting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(8); 2206-2211.
- Mao, M., Alavi, M., Labelle-Dumais, C. and Gould, D. 2015. Type IV collagens and basement membrane diseases: cell biology and pathogenic mechanisms. *Current Topics in Membranes*, 76; 61-116.
- Martinez-Hernandez, A. and Amenta, P.S. 1993. The hepatic extracellular matrix.
- Mase, V.J., Hsu, J.R., Wolf, S.E., Wenke, J.C., Baer, D.G., Owens, J., and Walters, T.J. 2010. Clinical application of an acellular biologic scaffold for surgical repair of a large, traumatic quadriceps femoris muscle defect. *Orthopedics*, 33(7).
- Mattei, G., Di Patria, V., Tirella, A., Alaimo, A., Elia, G., Corti, A. and Ahluwalia, A. 2014. Mechanostructure and composition of highly reproducible decellularized liver matrices. *Acta biomaterialia*, 10(2); 875-882.
- Mazza, G., Rombouts, K., Hall, A.R., Urbani, L., Luong, T.V., Al-Akkad, W. and Fuller, B. 2015. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. *Scientific reports*, 5(1); 1-15.
- McClelland, R., Wauthier, E., Uronis, J. and Reid, L. 2008. Gradients in the liver's extracellular matrix chemistry from periportal to pericentral zones: influence on human hepatic progenitors. *Tissue Engineering Part A*, 14(1); 59-70.
- Muriel, P. 2017. *Liver pathophysiology: therapies and antioxidants*. Academic Press.
- Nasiri, B. and Mashayekhan, S. 2017. Fabrication of porous scaffolds with decellularized cartilage matrix for tissue engineering application. *Biologicals*, 48; 39-46.
- NHS Blood and Transplant, Liver Activity Report 2017/2018. Web Sites: www.odt.nhs.uk Erişim Tarihi: 15.08.2020
- Nieponice, A., McGrath, K., Qureshi, I., Beckman, E.J., Luketich, J.D., Gilbert, T.W. and Badylak, S. F. (2009). An extracellular matrix scaffold for esophageal stricture prevention after circumferential EMR. *Gastrointestinal endoscopy*, 69(2); 289-296.
- Oberwallner, B., Brodarac, A., Choi, Y. H., Saric, T., Anić, P., Morawietz, L. and Stamm, C. 2014. Preparation of cardiac extracellular matrix scaffolds by decellularization of human myocardium. *Journal of biomedical materials research Part A*, 102(9); 3263-3272.
- O'brien, F.J. 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, 14(3); 88-95.
- Okazaki, I., Yonezawa, T., Watanabe, T., Mayne, R. and Ninomiya, Y. 2003. New insights into the extracellular matrix. In *Extracellular Matrix and the Liver*. Academic Press, 3-22.
- Okita, K., Ichisaka, T. and Yamanaka, S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *nature*, 448(7151); 313-317.
- Palakkan, A.A., Hay, D.C., PR, A.K., TV, K., and Ross, J.A. 2013. Liver tissue engineering and cell sources: issues and challenges. *Liver international*, 33(5); 666-676.
- Park, K. H. and Bae, Y. H. 2002. Phenotype of hepatocyte spheroids in Arg-GLY-Asp (RGD) containing a thermo-reversible extracellular matrix. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66(7); 1473-1478.
- Park, T.G. 2002. Perfusion culture of hepatocytes within galactose- derivatized biodegradable poly (lactide- co- glycolide) scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official*

- Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials, 59(1); 127-135.
- Parmaksiz, M., Dogan, A., Odabas, S., Elçin, A. E. and Elçin, Y.M. 2016. Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine, *Biomedical Materials*, 11(2); 022003.
- Parmaksiz, M., Elcin, A.E., Elcin, Y.M. 2015. Decellularization of bovine small intestinal submucosa and its use for the healing of a critical-sized full-thickness skin defect, alone and in combination with stem cells, in a small rodent model, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(6); 1754–1765.
- Parmaksiz, M., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2019. Decellularized bovine small intestinal submucosa-PCL/hydroxyapatite-based multilayer composite scaffold for hard tissue repair. *Materials Science and Engineering: C*, 94; 788-797.
- Pati, F., Adhikari, B. and Dhara, S. 2010. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource technology*, 101(10); 3737-3742.
- Pati, F., Jang, J., Ha, D.H., Kim, S. W., Rhie, J.W., Shim, J.H. and Cho, D.W. 2014. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nature communications*, 5(1); 1-11.
- Pawlina, W. and Ross, M. H. 2018. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Pervin, F., Chen, W. W. and Weerasooriya, T. 2011. Dynamic compressive response of bovine liver tissues. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 4(1); 76-84.
- Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D. and Rautou, P.E. 2017. Liver sinusoidal endothelial cells: physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 66(1); 212-227.
- Power, C. and Rasko, J.E. 2008. Whither prometheus' liver? Greek myth and the science of regeneration. *Annals of internal medicine*, 149(6); 421-426.
- Prestwich, G.D., Marecak, D.M., Marecek, J.F., Vercruysse, K.P. and Ziebell, M. R. 1998. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *Journal of Controlled Release*, 53(1-3); 93-103.
- Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J. and Lemons, J.E. 2006. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. MRS Bull, 31, 59.
- Reing, J.E., Zhang, L., Myers-Irvin, J., Cordero, K.E., Freytes, D.O., Heber-Katz, E. and Badylak, S.F. 2009. Degradation products of extracellular matrix affect cell migration and proliferation. *Tissue Engineering Part A*, 15(3), 605-614.
- Remesz, O. 2013. Web Sitesi: https://en.wikipedia.org/wiki/Lesser_omentum Erişim Tarihi: 27.12.2019
- Ren, H., Shi, X., Tao, L., Xiao, J., Han, B., Zhang, Y. and Ding, Y. 2013. Evaluation of two decellularization methods in the development of a whole- organ decellularized rat liver scaffold. *Liver International*, 33(3); 448-458.
- Riva, M.A., Riva, E., Spicci, M., Strazzabosco, M., Giovannini, M. and Cesana, G. 2011. The city of Hepar: rituals, gastronomy, and politics at the origins of the modern names for the liver. *Journal of hepatology*, 55(5); 1132-1136.
- Roskams, T., Moshage, H., De Vos, R., Guido, D., Yap, P. and Desmet, V. 1995. Heparan sulfate proteoglycan expression in normal human liver. *Hepatology*, 21(4); 950-958.

- Rozario, T. and DeSimone, D.W. 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Developmental biology*, 341(1); 126-140.
- Saheli, M., Sepantafar, M., Pournasr, B., Farzaneh, Z., Vosough, M., Piryaee, A. and Baharvand, H. 2018. Three- dimensional liver- derived extracellular matrix hydrogel promotes liver organoids function. *Journal of cellular biochemistry*, 119(6); 4320-4333.
- Sakai, Y., Yamanouchi, K., Ohashi, K., Koike, M., Utoh, R., Hasegawa, H., and Takatsuki, M. 2015. Vascularized subcutaneous human liver tissue from engineered hepatocyte/fibroblast sheets in mice. *Biomaterials*, 65; 66-75.
- Sancho-Bru, P., Roelandt, P., Narain, N., Pauwelyn, K., Notelaers, T., Shimizu, T. and Verfaillie, C. 2011. Directed differentiation of murine-induced pluripotent stem cells to functional hepatocyte-like cells. *Journal of hepatology*, 54(1); 98-107.
- Sarvazyan, N. 2020. *Tissue Engineering: Principles, Protocols, and Practical Exercises*. Springer Nature.
- Sawkins, M.J., Bowen, W., Dhadda, P., Markides, H., Sidney, L.E., Taylor, A.J. and White, L.J. 2013. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. *Acta biomaterialia*, 9(8); 7865-7873.
- Schuppan, D. 1990. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. In *Seminars in liver disease*. Thieme Medical Publishers, 10(01); 1-10.
- Seif-Naraghi, S. B., Horn, D., Schup-Magoffin, P. J. and Christman, K. L. 2012. Injectable extracellular matrix derived hydrogel provides a platform for enhanced retention and delivery of a heparin-binding growth factor. *Acta biomaterialia*, 8(10); 3695-3703.
- Selden, A. C. and Hodgson, H. J. 1991. Growth factors and the liver. *Gut*, 32(6), 601.
- Sellaro, T.L., Ranade, A., Faulk, D.M., McCabe, G.P., Dorko, K., Badylak, S.F. and Strom, S.C. 2010. Maintenance of human hepatocyte function in vitro by liver-derived extracellular matrix gels. *Tissue Engineering Part A*, 16(3); 1075-1082.
- Seo, S.J., Choi, Y.J., Akaike, T., Higuchi, A. and Cho, C.S. 2006. Alginate/galactosylated chitosan/heparin scaffold as a new synthetic extracellular matrix for hepatocytes. *Tissue engineering*, 12(1); 33-44.
- She, Z., Liu, W. and Feng, Q. 2010. Silk fibroin/chitosan/heparin scaffold: preparation, antithrombogenicity and culture with hepatocytes. *Polymer International*, 59(1); 55-61.
- Shen, W., Berning, K., Tang, S. W. and Lam, Y.W. 2020. Rapid and detergent-free decellularization of cartilage. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 26(4); 201-206.
- Shi, D., Liu, F., Yu, Z., Chang, B., Goff, H.D. and Zhong, F. 2019. Effect of aging treatment on the physicochemical properties of collagen films. *Food Hydrocolloids*, 87; 436-447.
- Shi, D., Zhang, J., Zhou, Q., Xin, J., Jiang, J., Jiang, L. and Sun, S. 2017. Quantitative evaluation of human bone mesenchymal stem cells rescuing fulminant hepatic failure in pigs. *Gut*, 66(5); 955-964.
- Shoulders, M. and Raines, R. 2009. Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78; 929-958.
- Shupe, T., Williams, M., Brown, A., Willenberg, B. and Petersen, B.E. 2010. Method for the decellularization of intact rat liver. *Organogenesis*, 6(2); 134-136.

- Singelyn, J.M., DeQuach, J.A., Seif-Naraghi, S.B., Littlefield, R.B., Schup-Magoffin, P.J. and Christman, K.L. 2009. Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering. *Biomaterials*, 30(29); 5409-5416.
- Skardal, A., Smith, L., Bharadwaj, S., Atala, A., Soker, S. and Zhang, Y. 2012. Tissue specific synthetic ECM hydrogels for 3-D in vitro maintenance of hepatocyte function. *Biomaterials*, 33(18); 4565-4575.
- Smedsrød, B., De Bleser, P.J., Braet, F., Lovisetti, P., Vanderkerken, K., Wisse, E. and Geerts, A. 1994. Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut*, 35(11); 1509.
- Son, H., Jeon, M., Choi, H. J., Lee, H. S., Kim, I. H., Kang, C. M. and Song, J. S. 2019. Decellularized human periodontal ligament for periodontium regeneration. *PloS one*, 14(8); e0221236.
- Spang, M.T. and Christman, K.L. 2018. Extracellular matrix hydrogel therapies: in vivo applications and development. *Acta biomaterialia*, 68; 1-14.
- Spector, M. 2016. Decellularized tissues and organs: an historical perspective and prospects for the future. *Biomedical Materials*, 11(2); 020201.
- Stockert, R.J. and Wolkoff, A.W. 2001. Cellular and molecular biology of the liver. *Current opinion in gastroenterology*, 17(3); 205-210.
- Tajima, K., Kuroda, K., Otaka, Y., Kinoshita, R., Kita, M., Oyamada, T. and Kanai, K. 2020. Decellularization of canine kidney for three-dimensional organ regeneration. *Veterinary World*, 13(3); 452.
- Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T. and Aoyama, S. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 499(7459); 481-484.
- Tanuma, Y., Ito, T. and Shibasaki, S. 1982. Further electron-microscope studies on the human hepatic sinusoidal wall with special reference to the fat-storing cell. *Archivum histologicum japonicum*, 45(3); 263-274.
- Tebyanian, H., Karami, A., Motavallian, E., Samadikuchaksaraei, A., Arjmand, B. and Nourani, M.R. 2019. Rat lung decellularization using chemical detergents for lung tissue engineering. *Biotechnic & Histochemistry*, 94(3); 214-222.
- Tiniakos, D.G., Kandilis, A. and Geller, S.A. 2010. Tityus: a forgotten myth of liver regeneration. *Journal of Hepatology*, 53(2); 357-361.
- Tirella, A., Mattei, G. and Ahluwalia, A.R.T.I. 2014. Strain rate viscoelastic analysis of soft and highly hydrated biomaterials. *Journal of biomedical materials research Part A*, 102(10); 3352-3360.
- Toth, C.A. and Thomas, D.P. 1992. Liver endocytosis and Kupffer cells. *Hepatology*, 16(1); 255-266.
- Traber, P.G., Chianale, J. and Gumucio, J.J. 1988. Physiologic significance and regulation of hepatocellular heterogeneity. *Gastroenterology*, 95(4); 1130-1143.
- Traverse, J.H., Henry, T.D., Dib, N., Patel, A.N., Pepine, C., Schaer, G.L. and Christman, K.L. 2019. First-in-man study of a cardiac extracellular matrix hydrogel in early and late myocardial infarction patients. *JACC: Basic to Translational Science*, 4(6); 659-669.
- Turner, R., Lozoya, O., Wang, Y., Cardinale, V., Gaudio, E., Alpini, G. and Reid, L.M. 2011. Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. *Hepatology*, 53(3); 1035-1045.

- Ueno, T., Sata, M. and Tanikawa, K. 2003. Cells responsible for extracellular matrix production in the liver. In *Extracellular Matrix and the Liver*. Academic Press, 89-103.
- Underhill, G.H., Chen, A.A., Albrecht, D.R. and Bhatia, S.N. 2007. Assessment of hepatocellular function within PEG hydrogels. *Biomaterials*, 28(2); 256-270.
- Ungerleider, J.L., Johnson, T.D., Rao, N. and Christman, K.L. 2015. Fabrication and characterization of injectable hydrogels derived from decellularized skeletal and cardiac muscle. *Methods*, 84; 53-59.
- Uygun, B.E., Soto-Gutierrez, A. and Yagi, H. 2010. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nature medicine*, 16(7); 814.
- Uygun, B.E., Soto-Gutierrez, A., Yagi, H., Izamis, M.L., Guzzardi, M.A., Shulman, C., and Hertl, M. 2010. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nature medicine*, 16(7); 814-820.
- Uygun, B.E., Yarmush, M.L. and Uygun, K. 2012. Application of whole-organ tissue engineering in hepatology. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 9(12); 738-744.
- Valentin, J.E., Badylak, J.S., McCabe, G.P. and Badylak, S.F. 2006. Extracellular matrix bioscaffolds for orthopaedic applications: a comparative histologic study. *JBJS*, 88(12); 2673-2686.
- Valentin, J.E., Stewart-Akers, A.M., Gilbert, T.W. and Badylak, S.F. 2009. Macrophage participation in the degradation and remodeling of extracellular matrix scaffolds. *Tissue Engineering Part A*, 15(7); 1687-1694.
- Van der Linden, H.J., Herber, S., Olthuis, W. and Bergveld, P. 2003. Stimulus-sensitive hydrogels and their applications in chemical (micro) analysis. *Analyst*, 128(4); 325-331.
- Van Eyken, P., Sciort, R. and Desmet, V.J. 1990. Expression of the novel extracellular matrix component tenascin in normal and diseased human liver: an immunohistochemical study. *Journal of hepatology*, 11(1); 43-52.
- Vanderkerken, K., Bouwens, L., De Neve, W., van den Berg, K., Baekeland, M., Delens, N. and Wisse, E. 1993. Origin and differentiation of hepatic natural killer cells (pit cells). *Hepatology*, 18(4); 919-925.
- Vavken, P., Joshi, S. and Murray, M.M. 2009. TRITON- X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. *Journal of orthopaedic research*, 27(12); 1612-1618.
- Ventura, R. D., Padalhin, A. R., Min, Y. K., & Lee, B. T. (2015). Bone regeneration using hydroxyapatite sponge scaffolds with in vivo deposited extracellular matrix. *Tissue Engineering Part A*, 21(21-22); 2649-2661.
- Vurat, M.T., Ergun, C., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2020a. 3D Bioprinting of Tissue Models with Customized Bioinks. In *Bioinspired Biomaterials*, Springer, 67-84, Singapore.
- Vurat, M.T., Şeker, Ş., Lalegül-Ülker, Ö., Parmaksiz, M., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2020b. Development of a multicellular 3D-bioprinted microtissue model of human periodontal ligament-alveolar bone biointerface: Towards a pre-clinical model of periodontal diseases and personalized periodontal tissue engineering. *Genes & Diseases*.

- Výborný, K., Vallová, J., Kočí, Z., Kekulová, K., Jiráková, K., Jendelová, P. and Kubínová, Š. 2019. Genipin and EDC crosslinking of extracellular matrix hydrogel derived from human umbilical cord for neural tissue repair. *Scientific reports*, 9(1); 1-15.
- Wake, K., Decker, K., Kirn, A., Knook, D.L., McCuskey, R.S., Bouwens, L. and Wisse, E. 1989. Cell biology and kinetics of Kupffer cells in the liver. In *International review of cytology*, Academic Press, 118; 173-229.
- Wang, B., Johnson, A. and Li, W. 2020. Development of an Extracellular Matrix-Enriched Gelatin Sponge for Liver Wound Dressing. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.
- Wang, K.L., Burban, J.H. and Cussler, E.L. 1993. Hydrogels as separation agents. In *Responsive gels: volume transitions II*. Springer, 67-79, Berlin.
- Wang, Y. and Wang, J. 2014. Mixed hydrogel bead-based tumor spheroid formation and anticancer drug testing. *Analyst*, 139(10); 2449-2458.
- Wang, Y., Bao, J., Wu, Q., Zhou, Y., Li, Y., Wu, X., and Bu, H. 2015. Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical- scale bioengineering engrafts. *Xenotransplantation*, 22(1); 48-61.
- Wang, Y., Cui, C.B., Yamauchi, M., Miguez, P., Roach, M., Malavarca, R. and Gerber, D.A. 2011. Lineage restriction of human hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue- specific biomatrix scaffolds. *Hepatology*, 53(1); 293-305.
- Wang, Y., Yao, H.L., Cui, C.B., Wauthier, E., Barbier, C., Costello, M.J. and Lobo, E.G. 2010. Paracrine signals from mesenchymal cell populations govern the expansion and differentiation of human hepatic stem cells to adult liver fates. *Hepatology*, 52(4); 1443-1454.
- Watson, C.J. and Dark, J.H. 2012. Organ transplantation: historical perspective and current practice. *Br. J. Anaesth.* 108 (1); 29-42.
- Wedgwood, J., Freemont, A. J., and Tirelli, N. 2013. Rheological and turbidity study of fibrin hydrogels. In *Macromolecular Symposia*, 334(1); 117-125.
- Weiner, F.R., Giambrone, M.A., Czaja, M.J., Shah, A., Annoni, G., Takahashi, S. ve Zern, M. A. 1990. Ito- cell gene expression and collagen regulation. *Hepatology*, 11(1); 111-117.
- Wen, Y.A., Liu, D., Xiao, Y.Y., Luo, D., Dong, Y.F. and Zhang, L.P. 2009. Enhanced glucose synthesis in three-dimensional hepatocyte collagen matrix. *Toxicology in Vitro*, 23(4); 744-747.
- Williams, D., Thayer, P., Martinez, H., Gatenholm, E. and Khademhosseini, A. 2018. A perspective on the physical, mechanical and biological specifications of bioinks and the development of functional tissues in 3D bioprinting. *Bioprinting*, 9; 19-36.
- Wisse, E.V., Van't Noordende, J.M., Van der Meulen, J. and Daems, W.T. 1976. The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood. *Cell and tissue research*, 173(4); 423-435.
- Wolf, M.T., Daly, K.A., Brennan-Pierce, E.P., Johnson, S.A., Carruthers, C.A., D'Amore, A. and Badylak, S.F. 2012. A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. *Biomaterials*, 33(29); 7028-7038.

- Wu, C., Pan, J., Bao, Z. and Yu, Y. 2007. Fabrication and characterization of chitosan microcarrier for hepatocyte culture. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(11); 2211-2214.
- Yamanaka, H., Morimoto, N. and Yamaoka, T. 2020. Decellularization of submillimeter-diameter vascular scaffolds using peracetic acid. *Journal of Artificial Organs*, 1-7.
- Yamanaka, S. 2009. A fresh look at iPS cells. *cell*, 137(1); 13-17.
- You, J., Park, S.A., Shin, D.S., Patel, D., Raghunathan, V.K., Kim, M. and Revzin, A. 2013. Characterizing the effects of heparin gel stiffness on function of primary hepatocytes. *Tissue Engineering Part A*, 19(23-24); 2655-2663.
- Yu, H., Chen, Y., Kong, H., He, Q., Sun, H., Bhugul, P. A. and Zhou, M. 2018. The rat pancreatic body tail as a source of a novel extracellular matrix scaffold for endocrine pancreas bioengineering. *Journal of biological engineering*, 12(1); 1-15.
- Zhang, F., Wang, Z., Zheng, C., Zhao, C., Shi, H., Pan, S. and Zhang, W. 2019. Biocompatibility and cellular compatibility of decellularized tracheal matrix derived from rabbits. *The International journal of artificial organs*, 42(9); 500-507.
- Zhang, W., Tucker-Kellogg, L., Narmada, B.C., Venkatraman, L., Chang, S. and Lu, Y. 2010. Cell-delivery therapeutics for liver regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(7-8); 814-826.
- Zhao, C., Li, Y., Peng, G., Lei, X., Zhang, G. and Gao, Y. 2020. Decellularized liver matrix-modified chitosan fibrous scaffold as a substrate for C3A hepatocyte culture. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1-16.
- Zhao, Y., Fan, J. and Bai, S. 2019. Biocompatibility of injectable hydrogel from decellularized human adipose tissue in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 107(5); 1684-1694.
- Zhou, Q., Li, L. and Li, J. 2015. Stem cells with decellularized liver scaffolds in liver regeneration and their potential clinical applications. *Liver International*, 35(3); 687-694.
- Zhu, L., Xia, H., Wang, Z., Fong, E. L. S., Fan, J., Tong, W. H. and Yu, H. 2016. A vertical-flow bioreactor array compacts hepatocytes for enhanced polarity and functions. *Lab on a Chip*, 16(20); 3898-3908.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Can ERGÜN

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 27.11.1996

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Suzan - Mehmet Gönc Lisesi (2014)

Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2018)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı
(Eylül 2018 - Ocak 2021)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

BİOVALDA Sağlık Teknolojileri Eğitim Araştırma Sanayi Ticaret A.Ş., Ankara
(07/2018 - 07/2020)

Yayınlar (SCI-E)

Vurat, M.T., **Ergun, C.**, Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2020. 3D Bioprinting of Tissue Models with Customized Bioinks. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1249; 67-84.