

**BALIK DERİSİNDEN İZOLE EDİLMİŞ
KOLLAJENDEN KRİYOJEL DOKU İSKELESİ
ÜRETİMİ**

ZEYNEP ÇETİNKAYA

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MERSİN
TEMMUZ-2015**

**BALIK DERİSİNDEN İZOLE EDİLMİŞ
KOLLAJENDEN KRİYOJEL DOKU İSKELESİ
ÜRETİMİ**

ZEYNEP ÇETİNKAYA

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE**

**MERSİN
TEMMUZ-2015**

Zeynep Çetinkaya tarafından Doç. Dr. Nimet Karagülle danışmanlığında “Balık Derisinden İzole Edilmiş Kollajenden Kriyojel Doku İskelesi Üretimi” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


İmza

Doç.Dr. Nimet KARAGÜLLE

Yrd.Doç.Dr. Rükân GENÇ

Yrd.Doç.Dr. Rozelin AYDIN


.....

.....

.....

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 31/07/2015 tarih ve 2015.20/799 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof.Dr. Ayla ÇELİK
Enstitü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

BALIK DERİSİNDEN İZOLE EDİLMİŞ KOLLAJENDEN KRİYOJEL DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ

Zeynep ÇETİNKAYA

ÖZ

Doku mühendisliği; hasar görmüş dokuların, gözenekli bir doku iskelesi ve hücreler kullanılarak rejenere edilmesini amaçlayan bir bilim dalıdır. Çeşitli biyomalzemelerden üretilen ve birbiriyle bağlantılı gözenek yapısı ile hücresel bağlanmayı, farklılaşmayı ve çoğalmayı destekleyen doku iskeleleri; vücutta farklı organ ve dokuların rejenerasyonunda kullanılmaktadır. Kollajen; insan vücudunda bulunan bağ dokusunun en önemli bileşeni olması ve biyoyumluluğu sayesinde son yıllarda doku iskelesi üretiminde tercih edilen doğal bir polimerdir. Kriyojelasyon yöntemi diğer doku iskelesi üretim yöntemlerine göre daha basittir ve bu yöntemle üretilen doku iskeleleri birbiriyle bağlantılı gözenek yapılarına sahiptir. Bu özellikler doğrultusunda bu çalışmada balık derisinden kollajen izole edilmiş ve bundan kriyojelasyon yöntemi ile doku iskelesi üretilerek karakterize edilmiştir. Yapılan SEM analizinde gözenekli yapısı ortaya konulan kollajenin, UV-Vis analizi sonucunda protein yapısı kanıtlanmış ve Zeta potansiyeli ile izole elektrik noktası belirlenerek yapısında bulunan Amit A, Amit B, Amit I, Amit II ve Amit III karakteristik pikleri FTIR analizinde gözlenmiştir. Kollajen izolasyonunda verim hesaplanarak asitte çözünür kollajen (ASC) için %14.53 ve pepsinde çözünür kollajen (PSC için) ise %2.42 bulunmuştur. İzole kollajen kullanılarak kriyojelasyon yöntemi ile üretilen doku iskelesi karakterizasyonu için ise şişme ve degradasyon süreçleri incelenmiştir. FTIR analizi ile; kollajen ve glüteraldehit (GA) reaksiyonuna ait C=N (Schiff bazı) bağı 1655 cm^{-1} dalga boyunda görülmüştür. SEM analizinde; sabit GA konsantrasyonunda artan kollajen konsantrasyonu ile kriyojellerin gözenek çapının ve duvar kalınlığının arttığı, sabit kollajen konsantrasyonunda artan GA konsantrasyonlarına bağlı olarak gözenek çapının azaldığı, duvar kalınlığının önemli ölçüde değişmediği gözlenmiştir. Sabit GA konsantrasyonunda, kollajen konsantrasyonu arttıkça ve sabit kollajen konsantrasyonunda GA konsantrasyonları arttıkça şişme oranlarının azaldığı gözlenmiştir. Sabit GA konsantrasyonunda kollajen konsantrasyonu arttıkça ve sabit kollajen konsantrasyonunda GA konsantrasyonu arttıkça ağırlık kaybı azalmıştır. Bu sonuçların birbirini desteklediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Doku Mühendisliği, Kollajen, Kollajen İzolasyonu, Doku İskelesi, Kriyojel

Danışman: Doç. Dr. Nimet Karagülle, Mersin Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı

CRYOGEL SCAFFOLD PRODUCTION FROM FISH SKIN ISOLATED COLLAGEN

Zeynep ÇETİNKAYA

ABSTRACT

Tissue engineering is a discipline which aims regenerating damaged tissues by using porous scaffolds and cells. Scaffolds produced from various biomaterials and by its interconnected pore structure supporting cell attachment, differentiation and proliferation, are used regeneration of various organs and tissues. Collagen is a natural polymer used for scaffold production in the late years because of its being the most important component of connective tissue and biocompatibility. Cryogelation is a simple technique compared to other scaffold production methods and scaffolds produced with this method have interconnected porous structure. In accordance with these properties, collagen from fish skin was isolated in this study and scaffolds were produced and characterized with cryogelation method. By SEM analysis, porous structure of collagen, and by UV-Vis analysis protein structure was proven with and by Zeta potential iso-electrical point of it was determine, and, Amit A, Amit B, Amit I, Amit II and Amit III characteristical peaks were demonstrated byFT-IR analysis. The collagen isolation yield was, 14,53% for acid soluble collagen (ASC) and 2,42% for pepcin soluble collagen. For scaffold characterisation produced by cryogelation method using isolated collagen, swelling and degradation processes were studied. With FTIR analysis, C=N bond belonging to gluteraldehitreaction with collagen was found to be at 1655 cm^{-1} . In the SEM analysis, it was observed that increasing collagen concentration while GA concentration was constant, increased the pore diameter and the wall thickness; and increasing GA concentration while the collagen concentration was constant, pore diameter was decreased and the wall thickness did not change significantly. When the collagen concentration was increased while GA concentration was constant and GA concentration increased while collagen concentration was constant, the swelling ratio decreased. When the collagen concentration was increased while GA concentration was constant and GA concentration increased while collagen concentration was constant, the weight loss decreased. These results supported each other.

Key Words: Tissue Engineering, Collagen, Isolation of Collagen, Scaffold, Cryogel

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Nimet KARAGÜLLE, Mersin University, Department of Chemical Engineering

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının oluşmasında katkısı bulunan, bilgi ve tecrübesinden yararlanmama olanak sağlayan, çalışmalarım boyunca desteğini benden esirgemeyen, değerli danışmanım Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE' ye,

Çalışmalarım boyunca araştırma ve laboratuvar alt yapısını sağlayan Kimya Mühendisliği Bölüm Başkanı ve değerli Öğretim Üyelerine, Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM)' ne, yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Araştırma Görevlilerine, Doktora ve Yüksek Lisans öğrencilerine,

Ve beni her konuda destekleyen Sevgili Aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER KISALTMALAR	xii
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1 DOKU MÜHENDİSLİĞİ	3
2.1.1. Doku Mühendisliği Yaklaşımı	3
2.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE HÜCRE KAVRAMI	5
2.3. DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE DOKU İSKELELERİ KAVRAMI.....	6
2.3.1. Doku İskelesi Özellikleri.....	6
2.3.2. Doku İskelesi Üretim Yöntemleri	7
2.3.3. Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Biyomalzemeler	10
2.3.3.1. Sentetik Polimerler	11
2.3.3.2. Doğal Polimerler	11
2.4. KOLLAJEN	12
2.4.1. Kollajen Temelli Doku İskelelerinin Doku Mühendisliğinde Uygulamaları.....	16
2.5. KRIYOJELASYON	21
2.5.1. Kriyojel Hazırlanması	22
2.5.2. Kriyojel Yapısına Etki Eden Faktörler	22
2.5.3. Doku Mühendisliğinde Kriyojel Uygulamaları.....	23
2.6. ÇAPRAZ BAĞLANMA	25

3. MATERYAL ve YÖNTEM	27
3.1. MATERYAL.....	27
3.1.1. Köpek Balığı Derisinden Kollajen İzolasyonunda Kullanılan Materyaller	27
3.1.1.1. Kollajen	27
3.1.1.2. NaOH	27
3.1.1.3. Butil Alkol.....	27
3.1.1.4. NaCl	28
3.1.1.5. Asetik Asit.....	28
3.1.1.6. Diyaliz Membran.....	28
3.1.2. Kriyojel Üretiminde Kullanılan Materyaller	28
3.1.2.1. Gluteraldehit.....	28
3.1.2.2. Etanol	28
3.2. YÖNTEM.....	29
3.2.1. Köpek Balığı Derisinden Kollajen İzolasyonu.....	29
3.2.1.1. Köpek Balığı Derisinin Hazırlanması	29
3.2.1.2. Köpek Balığı Derisinde Bulunan Yağların Arındırılması.....	29
3.2.1.3. Asitte Çözünen Kollajen (ASC) Ekstraksiyonu	30
3.2.1.4. Pepsinde Çözünen Kollajen (PSC) Ekstraksiyonu.....	31
3.2.2. Kollajen Karakterizasyonu	32
3.2.2.1. Kollajenin FTIR Analizi.....	32
3.2.2.2. UV-Vis Analizi	32
3.2.2.3. Zeta Potansiyel Ölçümü	32
3.2.2.4. Kollajenin SEM Analizi	33
3.2.3. Kollajen Kriyojellerin Üretimi	33
3.2.4. Kollajen Kriyojellerin Karakterizasyonu	34
3.2.4.1. Kriyojellerin FTIR Analizi.....	34
3.2.4.2. Kriyojellerin SEM Analizi	34
3.2.4.3. Şişme Özelliğinin İncelenmesi.....	34
3.2.4.4. In Vitro Degredasyon Profillerinin İncelenmesi	34

4. BULGULAR ve TARTIŞMA	36
4.1. KÖPEK BALIĞI DERİSİNDEN KOLLAJEN İZOLASYONU	36
4.1.1. Kollajenin FTIR Analizi.....	37
4.1.2. UV-Vis Analizi	39
4.1.3. Zeta Potansiyel Ölçümü	40
4.1.4. Kollajenin SEM Analizi	41
4.2. KOLLAJEN KRIYOJELLER.....	42
4.2.1. Kriyojellerin FTIR Analizi.....	42
4.2.2. Kriyojellerin SEM Analizi	43
4.2.3. Şişme Özelliğinin İncelenmesi.....	46
4.2.4. In Vitro Degredasyon Degredasyon Profillerinin İncelenmesi	48
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Sabit GA (%0.5) konsantrasyonunda, farklı kollajen konsantrasyonlarında üretilen kriyojel doku iskelelerinin gözenek boyutları ve duvar kalınlıkları..... 44

Çizelge 4.2. Sabit konsantrasyonda (%8) kollajen, farklı GA konsantrasyonlarında üretilen kriyojel doku iskelelerinin gözenek boyutları ve duvar kalınlıkları..... 46



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Doku mühendisliği yaklaşımı .	4
Şekil 2.2. Kollajenin yapısı	13
Şekil 2.3. Kollajen tipleri ve doku mühendisliğinde kullanım alanları	14
Şekil 2.4. Kollajenin biyomalzeme olarak avantajları ve dezavantajları	15
Şekil 2.5. (a) Elastik yapıdaki kriyojel, (b,c) kriyojele kademeli uygulanan güç, (d) uygulanan gücün kaldırılması ile kriyojelin eski halini alması	21
Şekil 2.6. Kriyojelasyon yönteminin temel basamakları	22
Şekil 2.7. Gluteraldehitin molekül yapısı	25
Şekil 2.8. Kollajenin gluteraldehitle çapraz bağlanma reaksiyonu	26
Şekil 3.1. Kesilmiş balık derisinin NaOH çözeltisi ile muamele edilmesi	29
Şekil 3.2. Yağlarından ve kollajen dışındaki proteinlerinden arındırılmış balık derisi	30
Şekil 3.3. Deri ve çözeltiden oluşan karışımın filtre edilmesi	30
Şekil 3.4. Karşı diyaliz sisteminin görüntüsü	31
Şekil 3.5. Liyofilizasyon işlemi sonrası elde edilen kollajen	32
Şekil 4.1. ASC için FTIR spektrumu	37
Şekil 4.2. PSC için için FTIR spektrumu	37
Şekil 4.3. ASC ve PSC için UV-Vis Spektrumu	39
Şekil 4.4. ASC ve PSC için kollajenin Zeta Potansiyeli	40
Şekil 4.5. ASC ve PSC' ye ait farklı büyütme ölçeklerinde SEM görüntüleri. (a) ASC, X4041(b) ASC, X1000, (c) ASC, X2000, (d) PSC, X400, (e) PSC, X1000, (f) PSC, X2000	41
Şekil 4.6. Sabit GA (%0.5) ve %3, %6 ve %8 kollajen konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin FTIR spektrumları	42
Şekil 4.7. Sabit kollajen (%8) ve %0.5, %1 ve %2 GA konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin FTIR spektrumları	43
Şekil 4.8. Sabit GA (%0.5) ve %3, %6 ve %8 kollajen konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin gözenek yapılarını ve duvar kalınlığını gösteren SEM görüntüleri (a) %3 Col, X400, (b) %3 Col, X3000, (c) %3 Col, X25000, (d) %6 Col, X400, (e) %6 Col, X3000, (f) %6 Col, X25000, (g) %8 Col, X400, (h) %8 Col, X3000, (i) %8 Col, X25000	44

Şekil 4.9. Sabit kollajen (%8) ve %0.5, 1 ve 2 GA konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin gözenek yapılarını ve duvar kalınlığını gösteren SEM görüntüleri (a) %0.5 GA, X400, (b) %0.5 GA, X3000, (c) %0.5 Col, X25000, (d) %1 GA, X400, (e) %1 GA, X3000, (f) %1 GA, X25000, (g) %2 GA, X400, (h) %2 GA, X3000, (i) %2 GA, X25000	45
Şekil 4.10. Sabit GA (%0.5) konsantrasyonunda artan kollajen konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin şişme oranlarının karşılaştırılması	47
Şekil 4.11. Sabit kollajen (%8) konsantrasyonunda artan GA konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin şişme oranının karşılaştırılması	47
Şekil 4.12. Kriyojellerin degradasyon öncesi görüntüleri a) %6 Col-%0.5 GA, b) %8 Col-%0.5 GA, c) %8 Col-%1 GA, d) %8 Col-%2 GA, Kriyojellerin degradasyon sonrası görüntüleri e) %6 Col-%0.5 GA, f) %8 Col-%0.5 GA, g) %8 Col-%1 GA, h) %8 Col-%2	48
Şekil 4.13. Sabit GA (%0.5) konsantrasyonunda artan kollajen konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin degradasyon oranının karşılaştırılması	49
Şekil 4.14. Sabit kollajen (%8) konsantrasyonunun da artan GA konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin degradasyon oranının karşılaştırılması	50

SİMGELER KISALTMALAR

Col	Kollajen
GA	Gluteraldehit
ASC	Asitte Çözünen Kollajen
PSC	Pepsinde Çözünen Kollajen
FTIR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi
UV-Vİs	Ultraviyole ve Görünür Işık Absorpsiyon Spektroskopisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
Y	Kollajen Verimi
V	Çözelti Hacmi
C	Liyofilizasyon Sonrası Kollajen Ağırlığı/Ekstrakte Edilen Çözelti Hacmi
W	Balık Derisi Ağırlığı
M _d	Kriyojellerin Şişme Çalışması Öncesi Kuru Halde Ağırlığı
M _w	Kriyojellerin Şişme Çalışmasında Islak Ağırlığı
Sr	Kriyojellerin Şişme Oranı
Deg	Kriyojellerin Degredasyon Oranı
W _i	Kriyojellerin Degredasyon Öncesi Kuru Ağırlığı
W _s	Kriyojellerin Degredasyon Sonrası Kuru Ağırlığı

1.GİRİŞ

Günümüzde geniş ölçekteki yanık, yaralanma, hastalık ve enfeksiyon gibi travmalar sonucu hasara uğramış organ ya da dokunun onarımı amacıyla geliştirilen doku mühendisliği bilimi alanındaki çalışmalar; doku veya organa spesifik hücrelerin doku iskelesi ile bir araya getirilerek yeni dokunun oluşmasını ve o dokuların rejenere edilmesini sağlar. Doku mühendisliği yaklaşımı kapsamında vücudun bağ dokusuna benzer yapay bir doku iskelesi üretilir ve onarımı yapılacak dokunun hücreleri ile bir araya getirilir. Farklı doku hücrelerinin doğal veya sentetik biyobozunur matrislerle bir araya getirilmesi ve yaşayan yapıların üretilmesi doku mühendisliği alanında en yaygın kullanılan girişimdir.

Doku iskelelerinin en önemli özelliği birbiriyle bağlantılı geniş gözenek yapısına sahip olmalarıdır. Bu gözenekler içinde hücrelerin ilerleyebilmesi ve 3 boyutlu doku benzeri yapılar oluşturmaları beklenir. Doku iskelesi malzemesi biyobozunur olmalıdır. Vücuda yerleştirildikten sonra bozunarak yok olması (vücut tarafından elimine edilmesi), yerini yeni oluşan dokuya bırakması istenir. Hem kendisinin hem de bozunma ürünlerinin biyoyoumlu olması ve herhangi bir olumsuz yan etkiye yol açmaması gerekir. Doku iskelesi üretiminde birçok sentetik ve doğal polimer denenmiştir.

Kollajen; doğal dokuda bulunan bağ dokusunun en önemli bileşeni olan, doğal bir polimerdir. Kollajenden üretilen doku iskeleleri doku mühendisliği uygulamalarında son yıllarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Kollajenin mevcut araştırma ve uygulama alanları; mekanik destek malzemesi olarak üroloji, yapay deri, hücresel bağlanmayı kolaylaştırması için kaplama, ilaç taşıma sistemi, ortopedik uygulamalar, yumuşak doku iyileştirmesi, yara kapama, kan damarlarını yeniden yapılandırmada yapı iskelesi olarak kullanılmasıdır. Ülkemizde kollajen üretimine rastlanmaması ve insan, sığır, tavşan ya da tavuk gibi hayvanlardan elde edilen kollajen maliyetinin (buzağı derisinden elde edilen 250 mg kollajen fiyatı 569 Avro olmak üzere) yüksek olması doku mühendisliğinin gelişmesi alanında önemli bir engel oluşturmaktadır. Bu çalışma kapsamında, ülkemizde üretilen yapılmayan ve oldukça pahalı bir ürün olan kollajen, atık olan köpek balığı derisinden izole edilmiş ve bundan doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere kriyojel doku iskeleleri üretilerek karakterize edilmiştir.

Doku mühendisliğinde doku iskelelerinin hazırlanmasında çeşitli yöntemler önerilmiş ve kullanılmıştır. Kriyojelasyon yöntemi bunlar arasında nispeten en yenilerindedir. Kriyojeller, geniş ve birbiriyle bağlantılı gözenek yapılarına sahiptir ve diğer doku iskelesi yöntemlerine göre çok basit bir yöntemle üretilirler. Su absorpsiyon kabiliyetleri çok yüksektir, çok hızlı şişerler. Elastik bir yapıdadırlar, mekanik özellikleri de birçok uygulama için yeterlidir. Dolayısıyla bu çalışma sayesinde doku iskelesi üretimi yöntemi olarak kriyojelasyon yöntemi uygulanmış ve doku iskelesi uygulamalarında kollajenin çok başarılı bir hammadde olması nedeniyle balık derisinden izole edilen kollajen kullanılmıştır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1 DOKU MÜHENDİSLİĞİ

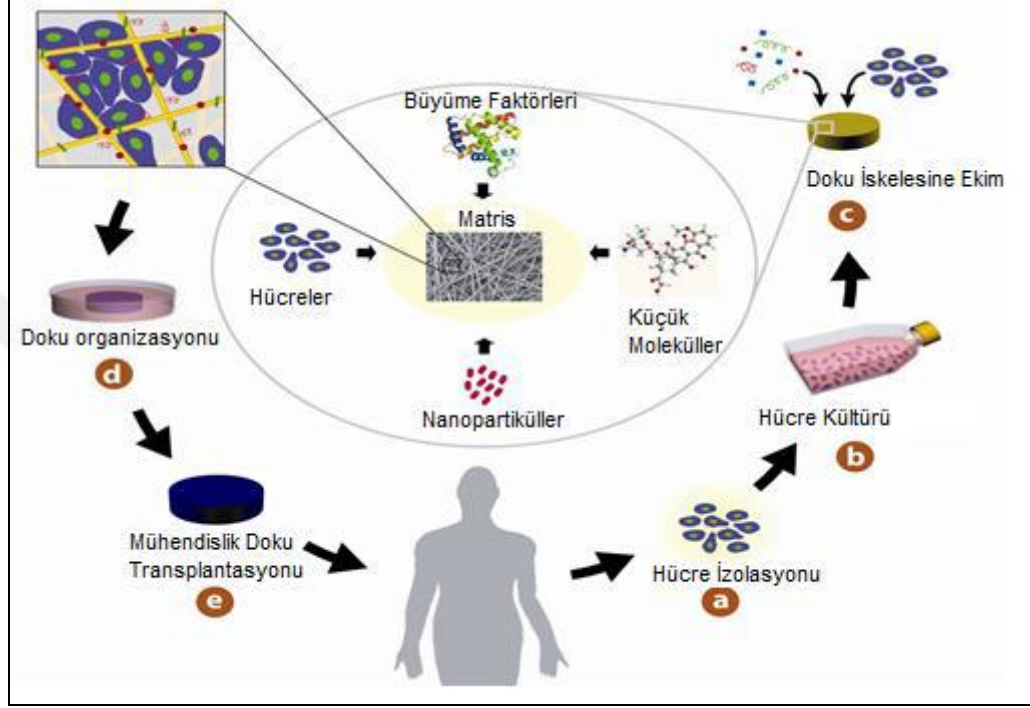
2.1.1. Doku Mühendisliği Yaklaşımı

Doku mühendisliği; kaybedilmiş veya hastalıklı dokuların onarılması veya değiştirilmesi amacıyla vücuda nakledilmek üzere yeni biyolojik eşdeğerlerinin geliştirilmesi temeline dayanan biyoteknoloji alanıdır.

Doku mühendisliği, multidisipliner bir alan olup, makine mühendisliği, malzeme mühendisliği, genetik bilimi ve yaşam bilimlerinin ortak çalışması sonucu ortaya çıkmıştır. Doku mühendisliği terimi ilk olarak 1987'de California Üniversitesi'nden Dr. Y.C. Fung tarafından NSF'nin (National Science Foundation) bir toplantısında dile getirilmiş ve bilimsel çevrelerin "doku mühendisliği" konusunda odaklanmasında ise iki makale çok etkili olmuştur. Bunlardan biri Nerem tarafından 1991'de "hücre mühendisliği" (Nerem, 1991), diğeri ise Langer ve Vacanti tarafından 1993'te Science dergisinde "doku mühendisliği" (Langer ve ark., 1993) başlığı altında yayınlanmıştır.

Doku mühendisliği; doğal dokunun işlevini taklit etmeye çalışır. Bu nedenle, işlevsel biyolojik destek yapıların geliştirilmesinin en iyi hale getirilmesi için, taklit edilen dokunun doğal koşullarının tam olarak anlaşılması gerekir (Moroni ve ark., 2008). Bu alanda çalışmalar yürüten araştırmacılar, deriden yapay sinirlere ya da kalp dokusuna kadar çok farklı vücut dokusu üzerinde çalışarak çeşitli derecelerde başarılar elde etmektedir. Buna bağlı olarak doku mühendisliği alanında geliştirilen ürünlerin gelecekte organ nakli ihtiyacını azaltacağı ve hatta ortadan kaldıracağı üzerinde durulmaktadır (Priya ve ark., 2008). Doku mühendisliğinde tedaviler üç farklı yaklaşım ile yürütülebilir. İlk yaklaşım olarak; molekül, örneğin büyüme faktörü hasarlı doku veya organa enjekte edilir veya uygun biçimde yerleştirilir (örneğin kontrollü salım sistemi). Bu molekül, hastanın kendi hücrelerinin yaralı bölgeye hareketini sağlar ve onları istenilen tür hücreye dönüştürerek dokuyu rejenere eder. Bu yaklaşım, küçük doku hasarları durumunda geçerlidir. İkinci yaklaşımda, çeşitli kaynaklardan izole edilen hücrelerin uygun polimerik taşıyıcılardaki kapsülleri (mikrokapsül veya makrokapsül) hazırlanarak vücuda verilir ve doku onarımının gerçekleşmesi sağlanır. Doku mühendisliğinin üçüncü ve en çarpıcı yaklaşımında ise, hastanın kendisinden veya uygun bir vericiden alınan sağlıklı hücreler uygun besi ortamında kültüre alınarak çoğaltılır. Çoğaltılan hücrelerin biyosinyal moleküllerle

birlikte, gerçek doku mikroçevresini taklit eden üç boyutlu doku iskelesi üzerine ekimi yapılır. Burada elde edilen yapı, doku hasarının olduğu bölgeye implante edilir. Ayrıca, hücre üremesini ve işlevini gerçekleştirmek üzere; gerçek doku mikroçevresindeki mekanik kuvvetlere benzer etkilerin sağlanabilmesi için çeşitli biyoreaktörler de kullanılabilir (Gümüşderelioğlu, 2007).



Şekil 2.1. Doku mühendisliği yaklaşımı (Dwir ve ark., 2011).

Hücreler ve doku iskelelerinin geliştirilmesi doku mühendisliği alanının en önemli konularındandır. Doku mühendisliğinde istenilen dokuyu oluşturabilecek işlevselliğe sahip hücreler, uygun bir malzemeden hazırlanan doku iskeleleri ile birleştirilerek hibrid sistemler oluşturulmaktadır. Bu yaklaşım; ayrıştırılmış hücrelerin ex vivo şartlarda üç boyutlu hücre dışı matris (extracellular matrix, ECM) yapılarıyla aynı olarak tasarlanmış iskeleler üzerine ekilmesi, ekilen hücrelerin farklılaştırılarak çoğaltılmaları ve oluşan yapıların hastaya nakledilmesi prensibine dayanmaktadır.

Doku iskelesi, hücrelerin yapışmasına ve farklılaşmasına olanak sağlayan hücre dışı matris olarak bir destek oluşturmaktadır (O'Brien, 2011, Agrawal ve ark.; 2001, Sachalos ve ark.; 2003). Doğal ECM, hücreleri bir doku oluşturmak üzere bir araya getirmekte, doku yapısını kontrol etmekte ve hücre fenotipini düzenlemektedir (Alberts ve ark., 1994). Yapay ECM'ler olarak görev yapan doku iskeleleri ise hücrelerin ve biyoaktif faktörlerin vücutta istenilen bölgelerde lokalizasyonunu ya da

taşınımını sağlamaktadır. In vivo (vücut içi) güçlere karşı mekanik destek vererek doku büyümesi süresince önceden belirlenmiş yapının sürdürülmesine katkıda bulunur (Kurtalan, 2013).

2.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE HÜCRE KAVRAMI

Doku mühendisliğinde başarıyı belirgin düzeyde etkileyen en önemli faktör kullanılacak hücrenin özelliğidir. Hücreler, proliferasyon, farklılaşma, hücre-hücre etkileşimi, biyomoleküler üretim ve hücreler arası matriks oluşturma karakteristiklerine bağlı olarak doku rejenerasyonu ve iyileşmesinde kritik bir rol oynarlar. Hücreler elde edildiği kaynaklara göre otolog, allojenik ve zenojenik olmak üzere üç grupta incelenmektedir (İkada, 2006; Bölgen, 2008). Hastanın kendisinden elde edilen hücreler otolog hücreler olup immünolojik reaksiyona neden olmamaları nedeniyle doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır. Hastadan alınan hücrelerin az sayıda olması ve hücre eldesi sırasında hastanın vücudunda yeni bir hasar oluşturulması nedeniyle doku mühendisliğinde otolog hücre kullanımı kısıtlıdır. Aynı türdeki farklı bir bireyden elde edilen hücreler allojenik hücrelerdir. Uygun maliyetle daha fazla sayıda hücrenin elde edilebilmesine olanak tanınması, allojenik hücrelerin kullanımını avantajlı kılmaktadır. Bu uygulamanın hastada immün cevap oluşturma ve enfeksiyon unsurlarının hastaya transfer riski bulunması dezavantaj oluşturmaktadır. Bir diğer hücre kaynağı ise farklı türdeki canlılardan elde edilen zenojenik hücrelerdir. Bu hücre grubu da uygun maliyetle ve kolaylıkla ulaşılabilme avantajının yanısıra, immün cevap oluşturma, hastalık ve hayvansal virüs gibi patojen faktörleri hastaya taşıma riski gibi önemli dezavantajlara sahiptir.

Onarılması hedeflenen dokuya bağlı olarak kullanılacak olan hücre tipinin, sayısının, hücre morfolojisinin, gen ifadesinin, hücresel gelişiminin orijinal doku ile eşdeğer olması beklenir (Pachance ve ark., 2000).

Doku mühendisliği için ideal donör hücrelerin özellikleri; kaynağına kolay ulaşılabilmesi, hücrelerin popülasyonları, fenotipleri ve fonksiyonları değişmeden artırılabilmesi ve türe spesifik patojenleri geçirmemesi, bir çok organa veya dokuya spesifik hücrelere farklılaşacak veya trans farklılaşacak multipotent yapıya sahip olması, en az immünolojik cevaba neden olmasıdır (Bölgen, 2008).

2.3. DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE DOKU İSKELELERİ KAVRAMI

Doku mühendisliği uygulamalarında; hedef dokunun oluşturulması için kullanılan hücrelerin, büyüme ve farklılaşma faktörlerinin etkinlikleri büyük oranda içinde buldukları doku iskelesinin özelliklerine bağlıdır. Doku iskelesi, üç boyutlu bir yapı oluşturarak elde edilecek hedef dokunun formunu belirler, hücrelere fiziksel destek oluşturur ve hücrelerin tutunarak fonksiyonlarını gerçekleştirebilmesi için uygun bir ortam sağlar (Salgado ve ark., 2004; Nakahara ve ark., 2004).

Doku iskeleleri doğal materyaller (kollajen, aljinat, hidroksi apatit) veya sentetik polimerlerden (poliglikolid, polilaktit, polilaktat glikolat) üretilebilirler. Doğal materyaller doğal hücrel çevreyi yakın olarak taklit edebilirler, sentetik polimerlerin ise materyal özelliklerinin daha iyi kontrol edilebilmesi gibi avantajları vardır. Genel olarak, ideal bir doku iskelesi, 3-boyutlu, yüksek gözeneklilikte, birbiri ile bağlantılı gözenek ağına sahip, biyouyumlu, kontrol edilebilir degradasyon hızına sahip, hücre adezyonu, proliferasyonu ve farklılaşması için uygun yüzey özelliklerine sahip ve uygun mekanik özellikleri sürdürebilir nitelikte olmalıdır (Bölgen, 2008).

2.3.1. Doku İskelesi Özellikleri

Doku iskeleleri hücre büyümesine olanak sağlayabilmek için, besinlerin ve metabolik atıkların geçişine fırsat verecek şekilde gözenekli yapıya sahip olmalıdır (O'Brien, 2011). Hücrelerin, gözenekler içine yerleşmesi, uygun bir dağılım göstermeleri ve çevre dokulardan kaynaklanan yeni damar oluşumu gözenekli yapı sayesinde sağlanabilir. Birbirine bağlı gözeneklerden oluşan doku iskelesinin yapısı, metabolizma ile ilgili besin ve ürünlerin giriş çıkışını sağlar. Böylece doku iskelesi içerisinde yerleştirilmiş olan hücrelerin canlılıklarını koruyabilmeleri sağlanabilir (Salgado ve ark., 2004).

Doku iskelesinde gözenek boyutunun çok küçük olması hücrelerin bu alanlara migrasyonunu, yeni damar oluşumunu ve atık ürünlerin ortamdaki uzaklaştırılmasını engelleyebilir. Bu nedenle doku mühendisliğinde ideal gözenek boyutunun 100-500 µm arasında olması gerekmektedir.

İn vivo uygulamalarda doku iskelesinin mekanik özellikleri, hedef dokuya benzer olmalıdır. Materyalin biyobozunurluğu ise oluşturulması hedeflenen dokunun gelişim hızına paralel olmalıdır. Örneğin; yavaş gelişim gösteren kemik dokusu oluşturmak amacıyla hazırlanan doku iskelesinin erken dönemde yıkıma uğraması

defekt bölgesinin mekanik olarak zayıf kalmasına neden olabilirken, deri dokusu oluşturmaya yönelik doku iskelesinin geç yıkıma uğraması yara iyileşme sürecini olumsuz etkileyebilir (İkada, 2006). Sonuç olarak doku iskelesi; istenilen yapıda kolaylıkla üretilebilmeli ve doku yenilenmesi gerçekleşinceye kadar mekanik özelliklerini koruyabilmelidir (Liu ve ark., 2004; O'Brien, 2011).

Doku iskeleleri; hücre yapışması ve büyümesini sağlayacak bir yüzey kimyasına sahip olmalıdır. Burada doku iskelesinin kimyasal ve yapısal özellikleri, büyüme ve farklılaşma faktörü uygulamalarının etkinliklerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Büyüme faktörlerinin doku içindeki yarılanma sürelerinin çok kısa olması doku iskelesinin uygun bir taşıyıcı olarak fonksiyon görmesini gerektirmektedir. Böylece büyüme faktörlerinin biyolojik aktiviteleri korunmuş olmaktadır. Doku iskelesinin büyüme faktörü için kontrollü salım sistemi oluşturması daha düşük miktarlarda büyüme faktörünün kullanılmasının etkin olması açısından son derece önemlidir. Büyüme faktörü için uygun salım kinetiğini oluşturabilen doku iskelelerinin kullanılması, biyolojik etkileri doz ve uygulama süresine göre değişiklik gösterebilen faktörlerden seçici olarak faydalanılmasını sağlamaktadır (Akman, 2007).

2.3.2. Doku İskelesi Üretim Yöntemleri

Doku iskelesi fabrikasyon teknikleri, doku mühendisliği gereksinimlerini karşılayabilecek doku iskeleleri üretmek için tasarlanmıştır. Polimerik doku iskelelerinin; yüksek porozite ve yüzey alanı, yapısal kuvvet ve üç boyutlu şekiller gibi önemli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu nedenle doku iskelesi; hücre yapışması, yayılması ve bazı durumlarda hücre göçü için uygun substratı sağlamalıdır. Bu gereksinimler doku iskelesi üretimi için uygun materyalin seçilmesiyle karşılanabilir fakat üretim tekniği de bu özellikleri etkilemektedir (Hu ve ark., 2012).

İlk kez Mooney ve ekibi tarafından kullanılan gaz ile köpüklendirme tekniği; bazı üretim yöntemlerinde kullanılan toksik organik çözücülere olan gereksinimi azaltmak için geliştirilmiş bir yöntemdir. Birçok fabrikasyon tekniği organik solventler ve yüksek sıcaklıklar gerektirmektedir. Bunun bir sonucu olarak proses sonrası kalıntı oluşabilmekte, oluşan bu kalıntı hücreler ve dokulara zarar verebilmekte ayrıca doku iskelesine yüklenmiş biyolojik olarak aktif moleküllerin de doğal yapısının bozulmasına yol açabilmektedir. Burada gaz ile köpüklendirme tekniği organik solventler ve yüksek sıcaklıklar gerektirmemektedir. Gaz ile köpüklendirme

teknğinde; basınçlı kalıplama ile üretilmiş disk şeklindeki polimerlerin yüksek basınçlı karbondioksit ile etkileşimi sonucu gözenekler oluşur. Bu yöntem %97 gözeneklilikte, 100 µm çapında gözenek boyutuna sahip yapıların oluşumuna olanak sağlar. Ancak, gaz köpüklendirme tekniği ile doku iskelesi üretiminde yüzeyde polimerik bir film oluşturmakta ve bu film tabakası hücrenin matris boyunca ekimini ve besinlerin yayılmasını zorlaştırmaktadır (Ebnesajjad, 2012; Subia ve ark., 2010).

Yüksek gözenekliliğe sahip olan dondurarak kurutma tekniği, gözenek boyutu kontrol edilebilen doku iskelesi ve ilaç taşıyıcı sistemlerin üretimi için kullanılan bir yöntemdir. Birbirine karışmayan iki ayrı faz halindeki polimer çözeltisi ve saf su homojenize hale getirilerek bir emülsiyon oluşturulur. Emülsiyon içerisinde su dağıtıcı faz iken polimer ise kalıcı faz olarak yer alır. Karışımın kalıba dökülmesinin ardından, sıvı azot altında emülsiyon dondurulur -55 °C sıcaklıkta ve 30 mTorr vakum altında su ve çözücü süblimleştirilerek sünger formunda polimerik doku iskeleleri elde edilir. Çözücü ve polimer türü ve bunların oranları gibi işlem parametreleri üretilen iskelelerin özelliklerini değiştirmektedir (Beşkardeş, 2008;Ebnesajjad, 2012; Sultana ve ark., 2012).

Polimer çözeltisini iki faza ayıran sıcaklık değişiminden yararlanılan faz ayrılması tekniğinde biri düşük diğeri yüksek polimer konsantrasyonuna sahip iki ayrı faz oluşur. Polimer uygun bir çözücüde çözünür ve elde edilen çözeltiliye biyolojik olarak aktif moleküller disperse edilir. Bu çözelti likit-likit faz ayrımı gerçekleşene kadar kontrollü olarak soğutulur ve ardından iki katı faz oluşması için su ile muamele edilir. Katılaştıran çözücü süblimasyonla uzaklaştırıldıktan sonra biyoaktif moleküller içeren porlu doku iskeleleri elde edilmiş olur. Faz ayrılması tekniğinin avantajı; kontrol edilebilir por morfolojisine sahip üç boyutlu doku iskeleleri dizaynında diğer fabrikasyon teknikleriyle kolaylıkla kombine edilebilmesidir. Ayrıca bu teknik doku mühendisliği uygulamaları için nanofibröz doku iskeleleri yapımında hızlı prototipleme tekniğiyle de kombine edilebilmektedir (Subia ve ark., 2010).

Katı ve boşluklu içyapılı, uzun boylarda, homojen çapta ve çeşitli bileşimlerde nanofiber üretimi sağlayan yöntem ise elektro-eğirme yöntemidir. Elektro-eğirme teknolojisi sol-jel yöntemi ile birleştirildiğinde, polimer veya seramik çözeltiliden belirli bir elektrik alan altında sürekli nanofiber, nanotüp ve dolgulu nanofiber üretimi gerçekleştirilmektedir (Dan ve ark., 2004). Elektro-eğirme, doğal ya da sentetik polimerler kullanılarak 2 nm'den mikrometre boyutlarına kadar çeşitli çaplarda

polimer fiberleri üretmek için elektriksel güçten yararlanan elektrostatik fiber oluşumu için yaygın şekilde kullanılan bir teknolojidir. Normal fiberlerden daha küçük çaplara ve daha yüksek yüzey alanına sahip elektroğrılmış fiberler, çeşitli alanlarda başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. İpek, kollajen, kitosan, jelatin gibi 200'den fazla polimer elektroğirme yönteminde kullanılabilir (Subia ve ark., 2010). Eşsiz özellikleri ve üretim kolaylığı nedeniyle elektro-ğirme yöntemi ile üretilen nanofiberler son yıllarda nanoteknolojik uygulamalarda yoğun ilgi görmektedir. Elektro-ğirme ile üretilmiş tipik bir nanofiber matrisi %90'dan daha fazla gözeneklilik ve 100 µm'ye kadar gözenek çapı dağılımı göstermektedir (Christenson ve ark., 2007).

Çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma yönteminde polimer uygun çözücü içinde çözüldürüldükten sonra oluşan çözeltinin içine porojen adı verilen katı parçacıklar ilave edilir (Mikos ve ark., 1993). Bu karışım, yapışmayacağı düz bir yüzeye dökülür ve çözücü uzaklaştırılır. Böylece içinde porojenlerin bulunduğu membran formunda katı polimerik yapı elde edilir. Bu yapı porojen maddenin içinde çözüneceği herhangi bir çözücü ile etkileştirildiğinde porojen yapıdan uzaklaştırılır. Bu işlem sonrasında porojenlerin terk ettiği bölgeler yerini gözeneklere bırakır (Mikos ve ark., 2000; Lendlein ve ark., 2006). Böylece bu yöntemle, gözenek boyutu ve özellikleri kontrol edilebilen membran formundaki doku iskeleleri üretilmiş olur.

Membran laminasyon yönteminde ise kıkırdak ve kemik gibi işlevi kısmen geometriye dayanan sert dokuların yenilenmesi için üç-boyutlu anatomik yapıda doku iskelelerine ihtiyaç vardır. Bu yöntem ile oldukça yüksek gözenekliliğe sahip üçboyutlu doku iskeleleri üretilmiştir (Mikos ve ark., 1993). Bu yöntemde, polimer için uygun olan bir çözücü, çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile üretilmiş olan polimerik membranların arasına sürülüp üst üste dizilerek üç boyutlu doku iskeleleri elde edilir. Üst üste dizilerek birbirine yapıştırılan membranların por özellikleri aynı olmalı ve yapıştırma bölgeleri ayırt edilmeyecek kadar düzgün olmalıdır. Yapıştırma için kullanılan bazı organik çözücülerin çok toksik olması ve doku iskelesinin biyouyumluluğunu etkilemesi bu yönetime bazı sınırlamalar getirmektedir.

3-boyutlu doku iskelelerini hazırlamak için kullanılan eriyik kaplama yönteminde çözücü kullanılmadan polimer ve porojen katı halde karıştırıldıktan sonra, karışım istenilen geometriye sahip kalıba dökülür. Kalıba ısı uygulanarak polimer eriyik hale getirilir. Sonrasında doku iskelesi, porojenin içinde çözüneceği çözücü ile

etkileştirilerek porojen yapıdan uzaklaştırılır ve istenilen geometriye sahip, üç boyutlu ve porlu doku iskeleleri üretilmiş olur (Thomson ve ark., 2000).

Fiber bağlama yöntemi; bu yöntemde poli glikolik asit (PGA) fiberleri istenilen biyomalzeme yapısına göre dizilir ve PLLA/metilen klorür çözeltilisine daldırılır. Çözücünün buharlaşmasından sonra, PLLA-PGA bileşimi her iki polimerin erime sıcaklığının üstündeki sıcaklığa kadar ısıtılır. Poli L-laktik asit (PLLA), soğutmanın ardından seçici ayrışmayla uzaklaştırılır, ayrışan PGA fiberleri fiziksel olarak çapraz noktalarda bağlanır. Yöntemin en önemli avantajı gözenek kontrolünü sağlayabilmesidir. Çözücü seçimi, iki polimerin karıştırılabilirliği ve erime sıcaklıkları proses için önemli parametreler arasındadır. Fakat, biyomalzemede artakalan çözücü atıklarının hücre ve organlara zararlı olabileceği unutulmamalıdır (Şaşmazel, 2007).

2.3.3. Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Biyomalzemeler

Biyolojik sistemlerle temas halinde olup, bulunduğu ortamın doğal etkinliğini tedavi etmek, iyileştirmek ya da vücuttaki herhangi bir fonksiyonun, dokunun veya organın yerini almak için kullanılan doğal ya da sentetik malzemelere biyomalzeme denir (Williams ve ark., 1986). Doku iskelesi üzerine hücre popülasyonunun yapışması ve göç etmesini sağlayan substrat, özel hücre tipleri ile kombine edilen üç boyutlu implant, hücre salan bir vesikül, lokalize bölgelerde özel hücresel fonksiyonların aktive edilmesi için bir ilaç taşıyıcısı, yenilenen dokuların biçimini belirleyen bir mekanik yapı ve fibroblast oluşumunu engellerken doku rejenerasyonu için alan temin eden bir bariyer membran olarak görev yapan biyomalzemeler bu özellikleri ile doku mühendisliğinde önemli bir yere sahiptir (Karahaliloğlu, 2009).

Biyomalzemenin sahip olması gereken özellikler şunlardır:

- ✓ Biyoyumluluk,
- ✓ Toksik özellik,
- ✓ Bozunma hızı,
- ✓ Şekillendirilme özelliği,
- ✓ Yüzey morfolojisi ve porozitesi,
- ✓ Korozyona dayanıklı olması,
- ✓ Dokularda alerjik reaksiyon oluşturmaması,
- ✓ Vücut ağırlığı göz önüne alındığında fiziksel olarak basma ve çekme dayanımlarına sahip olması,

- ✓ Vücut tarafından iletilen yükleri taşıyacak düzeyde bulunması (Pachance ve ark., 2000).

Malzeme seçimi, doku mühendisliği ürünlerinin tasarımı ve gelişimi açısından çok önemli bir rol oynamaktadır. Geçmişte güvenilir ve kararlı malzeme seçim kriteri, malzemenin inert olmasıyken, günümüzde hücre cevabından mekanik özelliklere kadar birçok kriter göz önünde bulundurulmaktadır (Peppas ve ark., 1994). Doku mühendisliği yaklaşımı ile geliştirilen yapay doku ve organlarda, sentetik ECM görevi üstlenerek hücrelere destek sağlayan ve yapay organ ya da dokunun iskeletini oluşturan biyomalzemeler; sentetik ya da doğal polimerler, metaller, seramikler ve bunların karışımı olan kompozit malzemeler olarak gruplandırılmaktadır.

2.3.3.1. Sentetik Polimerler

Sentetik polimerler genellikle biyolojik olarak inerttirler, spesifik uygulamalar göre özellikleri kararlıdır ve değiştirilebilir. Bu polimerler, kontrol edilebilir şartlarda üretilen malzemelerdir. Dolayısıyla polimerin molekül ağırlığı, konfigürasyonu veya konformasyonu, fonksiyonel grupların içeriği gibi özellikleri değiştirilerek, istenilen mekanik ve fiziksel özelliklere sahip sentetik polimerler üretilebilmektedirler. Doku iskelelerinin hazırlanmasında çok sayıda sentetik biyobozunur polimer denenmiştir. Bunlar içinde en başarılı olanları poli laktik asit (PLA), poli glikolik asit (PGA), polikaprolakton ve bunların kopolimerleridir. Bu polimerler biyolojik sistem üzerinde özellikle hızlı bozunma durumunda olumsuz etkiler gözlenmiştir (Akdemir, 2009).

Sentetik polimerler, doğal polimerlerde olduğu gibi kuvvetli hücre-malzeme etkileşimlerine sahip değildir. Dolayısıyla hücre fonksiyonlarının malzeme üzerindeki kontrolü zorlaştığı gibi, hücre-dışı matris oluşumları ve biyobozunma karakteristikleri de kontrolsüzdür. Bununla beraber, malzemelerin bozunma sonrası ürünleri toksik etki yaratabileceğinden doku çevresinde enflamasyon oluşabilir (Chung and Burdick, 2008).

2.3.3.2. Doğal Polimerler

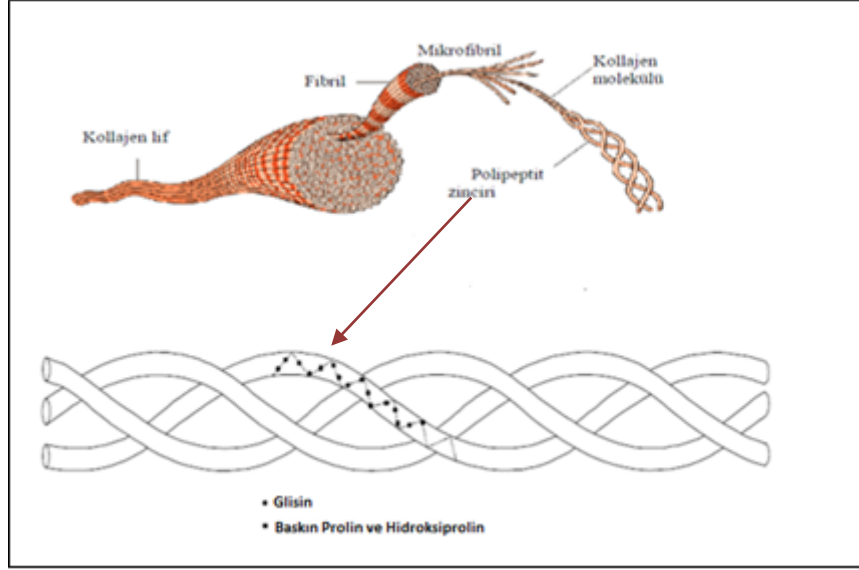
Doğal polimerler, vücuttaki hücre dışı matrise (extracellular matris, ECM) olan benzerlikleri ve yüksek biyouyumlulukları nedeniyle doku iskelesi malzemesi olarak sıkça tercih edilmektedir (Demirbilek, 2011). Doğal polimerler, sahip oldukları işlevsel özellikleri nedeniyle jel yapıcı, bağlayıcı, dağıtma ajanı, kayganlaştırıcı,

yapıştırıcı ve biyomalzeme gibi değişik kullanım alanlarına sahiplerdir. Kollajen, selüloz, nişasta, kitin ve kitosan başlıca doğal biyobozunur polimerlerdendir. Bu grupta yer alan polimerlerin ilk uygulaması; yara iyileşmesinde hayvan bağırsağı, ipek ve patates nişastasının kullanılmasıyla gerçekleşmiştir (Çabuk, 2012). Günümüzde ise doğal polimerler yara iyileşmesi (membran, süngerimsi ve hidrojel yapısında), ilaç salım sistemleri (mikroküre, süngerimsi ve hidrojel matriks yapısında), ameliyat iplikleri (fiber yapısında), hücre kültürü (membran, örgülü/örgüsüz matriks yapısında) gibi birçok tıbbi uygulamada kullanılmaktadır. Biyolojik ortamdaki makromoleküllere büyük benzerlik gösterirler ya da aynıdır. Sentetik polimerlerde karşılaşılan toksisite ve kronik iltihaplanma sorunları yoktur. Ayrıca biyolojik ortamlardaki enzimlerle bozunurlar (Bölgen, 2008).

2.4. KOLLAJEN

İnsan ve hayvanlarda en çok bulunan proteinlerinden biridir ve bağ dokunun, tendonların, kıkırdak deri ve kemiğin yapısında bulunur (Ulery ve ark., 2011). Kollajenin ana işlevi içinde bulunduğu dokuya yapısal destek sağlamakken, doku sürekliliği ve rejenerasyonu için gerekli olan birçok faktörü de muhafaza ettiği bilinmektedir. Bu yüzden doku mühendisliğinde alanında ideal doku iskelesi materyali olarak değerlendirilmektedir (Uzunalan, 2011).

Kimyasal kompozisyonlarının farklılıkları, morfolojik özellikleri, dağılımları, fonksiyonları ve patolojileri ile fark edilen kollajen omurgalılarda bulunan bir protein grubu olup, birkaç hücre tipi tarafından üretilirler. Kollajen proteininin ana yapısını glisin (%35,5), prolin (%12) ve hidroksiprolin (%10) amino asitleri oluşturmaktadır ve Şekil 2.2’de kollajenin yapısı sunulmaktadır. Yapıda ayrıca az miktarda lizin ve hidroksilizin amino asitleri de dikkati çekmektedir (Emin, 2006). Temel kollajen molekülü her biri 1000’den fazla aminoasit içeren üç polipeptid zinciri içermektedir. Kollajenin yapısında; herhangi bir aminoasit olan X ve Y motiflerinin (Gly-X-Y, Gly: Glisin) tekrarlanmasıyla karakterize edilen üçlü polipeptid zincirleri bulunmaktadır. Bu motifler; zincirleri sağa dönen üçlü sarmal yapı şekline ve glisin molekülünü protein içinde gömülü duruma getirir, X ve Y ise yüzeyde açığa çıkar. Eşsiz üçlü heliks formunun içinde bu şekilde düzenlenir (Ulery ve ark., 2006; Emin, 2006).



Şekil 2.2. Kollajenin yapısı

Kollajen diğer proteinlere göre daha az immunojeniktir. Ana antijenik etkenler molekülün telopeptid bölgelerinde bulunmaktadır ve pepsin muamelesi ile elimine edilebilmektedirler. Diğer etkenler ise üçlü heliks ve α zincirinin amino asit dizilişlerinden oluşmaktadır. Kollajen biyomateryallerin antijenitesi çapraz bağlama işlemi ile azaltılabilmektedir. Kollajen, protein yapısı göz önüne alındığında, biyobozunur bir moleküldür. Kollajenazlar ve fagositozlar tarafından parçalanarak katabolik proses ile dokularda parçalanırlar. Kollajenin biyobozunurluğu polipeptid zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturularak azaltılabilir ya da tamamen ortadan kaldırılabilir. Ayrıca bozunma oranı implantın yerleştirildiği bölgeye de bağlıdır (Ulery ve ark., 2006; Uzunalan, 2011).

Kollajen; hücre dışı matrisin ana bileşeni ve insan vücudunda en bol bulunan protein olarak doku mühendisliği için ideal bir polimerdir. Bugüne kadar 29 farklı kollajen tipi karakterize edilmiş ve üçlü sarmal yapıda oldukları belirlenmiştir. Kollajen çeşitlerinin (tip I, II, III, V ve XI) kollajen liflerine bağlı olduğu bilinmektedir. Kollajen farklı tiplere sahip olsada kollajen temelli biyomalzemelerin üretilmesinde genellikle birkaç tip kullanılır ve tip I altın standart olarak kabul edilir. Şekil 2.3' de genel olarak kollajen tipleri ve doku mühendisliğinde kullanım alanları verilmiştir.

	Tip	Moleküler Formül	Polimerize Formu	Dokularda Dağılımı
Fibril Formu	I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	Fibril	Kemik, Deri, Kornea, Tendon
	II	$[\alpha 1(II)]_3$	Fibril	Kıkırdak, Göz
	III	$[\alpha 1(III)]_3$	Fibril	Deri, Kan damarları
	V	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ ve $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$	Tip I fibril yapısı	Kemik, Deri, Kornea, Tendon
	XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	Tip II fibril yapısı	Kıkırdak, Göz
Fibril ile ortak	IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	Tip II fibril yapısı yaklaşımı	Kıkırdak
	XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	Tip I fibril yapısı yaklaşımı	Tendon, Ligament
Ağsı Form	IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$	Tabaka benzeri ağsı yaklaşım	Bazal lamina
	VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	Fibril bağlama	Epitel Hücre

Şekil 2.3. Kollajen tipleri ve doku mühendisliğinde kullanım alanları (Berth F., 2010; Ramshaw F.A.M., 1995)

Kollajen, doku ve organ oluşumunda ve hücrelerin birçok biyolojik işlevinde çok önemli rol oynayan bir proteindir. Birçok doğal polimer ya da sentetik analogları biyotıp alanında ve biyomalzeme olarak kullanılmıştır, ancak kollajenin özellikleri onu biyomalzeme olarak daha ön plana çıkarmaktadır. Kollajen çok iyi bir yüzey aktif özelliğe sahiptir. Bu nedenle lipidden yoksun yapılara çok daha kolay girebilmektedir. Kollajen başarılı biyobozunum özelliğinin yanı sıra düşük antijenikliğe ve albumin gibi diğer doğal polimerlerle karşılaştırıldığında daha üstün biyouyumluluk

özelliklerine sahiptir. Biyotıp uygulamalarında avantajlı olan kollajenin en önemli özelliği, fiberler oluşturarak ekstra sağlamlık ve stabilite sergilemesidir (Berth F., 2010). Bunlara ek olarak, kollajen doku iskelelerin immunolojik ve mekaniksel özellikleri, matriks özelliklerinin (porozite, yoğunluk) modifikasyonu veya bozunma oranını etkileyen kimyasal işlemlerle değiştirebilmektedir. Kollajenin in vivo bozunma oranını ya da mekaniksel özelliklerini değiştirmek için çeşitli çapraz bağlama ve sterilizasyon metodlarından yararlanılabilmektedir. Bu metodlar glutaraldehid muamelesi, karbodiimid muamelesi, kuru ortamda fotooksidasyon, poliepoksi bileşiklerine maruz bırakmak ve gliserol muamelesidir. Genel olarak bir biyomateryal olarak kollajenin avantajları ve dezavantajları Şekil 2.4' de verilmiştir (Uzunalan, 2011).

Avantajlar	Dezavantajlar
Yaygın olarak bulunur ve canlı organizmalardan kolayca saflaştırılabilir Antijenik değildir Biyobozunur ve biyoabsorblanabilir Biyoaktif bileşenlerle uyumludur Toksik değildir ve biyouyumludur Farklı formlarda hazırlanabilir Biyobozunurluk çapraz bağlanma ile ayarlanabilir Fonksiyonel gruplarından yararlanılarak istenilen özellikte materyaller üretmek için kolayca modifiye edilebilir Sentetik Polimerlerle birleştirilebilir	Kollajenin yüksek maliyeti İzole edilen kollajenin değişikliği (çapraz bağlanma yoğunluğu, fiber boyutu gibi) Hidrolik bozunma ile karşılaştırıldığında enzimatik bozunma oranının değişkenliği Kompleks kullanım özelliği Yan etkileri (sığır sünger form ensefalopati ve minerilazasyonu gibi)

Şekil 2.4. Kollajenin biyomalzeme olarak avantajları ve dezavantajları

Kollajenin; tabaka, tüp, sünger, köpük, nanofibröz matris, pudra, enjekte edilebilir akışkan solüsyon gibi birçok formu sentezlenmiş ve ticarileştirilmiştir (Berth F., 2010; Ramshaw F.A.M., 1995). Ticarileştirilen birçok malzeme, FDA (Food and Drug Administration) tarafından da onaylanmıştır. Antibiyotikler gibi düşük molekül ağırlıklı ilaçların bölgesel taşınması üzerine de birçok araştırma gerçekleştirilmiştir.

Birçok kollajen bazlı gentamisin preparatı piyasada kullanılmaktadır. Protein ve ilaç taşıma işlevinin yanı sıra, gen ve plazmid DNA'nın taşınmasında da kollajenin kullanılabilirliği araştırılmaktadır. Omurilik cerrahisi uygulamalarında kullanılan üç boyutlu kollajenin matrisler üzerine yapılan çalışmaları da göze çarpmaktadır. Benzer şekilde fibriler kollajen, hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfattan oluşan sentetik kemik grefti de FDA onayı almıştır (Duan ve ark., 2007).

Kollajen izolasyonu; hayvan dokularından ekstrakte edilmesi ve biyomateryaller üretmek için saflaştırılması sonucu elde edilir. Omurgalı bir hayvanın dokularında bulunan tüm kollajenin yaklaşık % 40'ı derisinde yer almaktadır. Hayvan derisi gelişimi, fizyolojik görevi ve kimyasal yapısı farklı olan üç ayrı tabakadan meydana gelmektedir. Epidermis ve hipodermis tabakaları uzaklaştırıldığında geriye asıl tabaka olan dermis tabakası kalmaktadır. Dermis tabakası kollajen ve elastik liflerin ağlarından kurulan kompakt yapılı düzensiz bağ dokudur. Deri yapısında yer alan lifli proteinler arasında kollajen oranı % 98'i bulmaktadır. Dermis içerisinde lifli proteinlerin yanında şekilsiz proteinler, karbonhidrat ve lipid bileşikleri v.b. maddeler de bulunmaktadır. Ancak bunların oranı kollajene oranla çok daha azdır. Bu nedenle kollajen saflaştırılma denemelerinde kollajen proteini dışındaki diğer tüm maddeler mümkün olduğunca uzaklaştırılmaktadırlar. Bugün ticari olarak birçok alanda kullanılan kollajen büyük ölçüde çeşitli hayvan derilerinden (dana, domuz, tavuk, balık vb.) ve hayvanların kıkırdak, bağırsak gibi vücut dokularından saflaştırılarak elde edilmektedir (Phanat K., 2004).

2.4.1. Kollajen Temelli Doku İskelelerinin Doku Mühendisliğinde Uygulamaları

Kollajen temelli malzemelerin kullanımı, hem in vivo hem de in vitro olarak, gerek hücre içinde gerekse de ekstrakte edilmiş kollajen içerisinde oldukça geniş bir uygulama alanına sahiptir. Araştırma grupları; kollajen doku iskelelerini, hücrelerin geçişi ve çoğalmasının yanı sıra, farklılaştırma ve fenotip davranışları çalışmaları için kullanmışlardır. Dahası, hücrelerin nasıl davranacağı ile ilgili temel bulgular, dokuya benzer 3-boyutlu doku iskelesi içerisinde hücrelerin in vitro olarak ne kadar büyüyebileceği ile alakalıdır (Xu, ve ark., 2009). Bir diğer kollajen temelli doku iskeleleri, Schwann hücrelerinin motor nöron miyelinizasyonlarının sinir sistemi modellerinin görselleştirilmesinde kullanılmıştır. 3-boyutlu kollajen iskelelerinin kullanılabilirliği kanser çalışmaları da önemli bir araştırma konusudur. Bu yöntemde,

kanser hücresinin yayılımcı karakteri ve kanser hücrelerinin, diğer kanser hücreleri ve diğer hücreler ile etkileşimi, 3-boyutlu bir ortamda analiz edilebilmektedir. Bu türdeki doku iskelesi aynı zamanda kanser ilaçlarının testlerinde 3-boyutlu ortam olarak da kullanılabilir. İmmünoloji bölümünde ise, in vitro 3-boyutlu analizler, T hücrelerinin taşınma mekanizmalarının anlaşılması için yapılabilmektedir (Inoue, ve ark., 2001). Sonuç olarak, kollajen temelli biyomalzemeler, organların yetiştirilebileceği bir destek malzemesi olarak kullanılabilir ya da osteoartrit gibi hastalıklar için 3-boyutlu model olarak görev alabilir (Berth F., 2010).

Osteokondral hasarlar; kemik ve kırıldak yenilenmesi, gerek estetik gerekse de fonksiyonel ameliyat olarak, modern tıbbın önemli konularından biridir. Kollajen temelli biyomalzemelerin aşılması(implant), osteokondral hasarlarda başka bir dokuyu yerleştirilmesi pratik ya da patolojik nedenlerle mümkün olmadığı durumlarda kullanılır. Kemik dokusu mühendisliğinde doku iskeleleri, kollajen temelli biomalzemenin kalsiyum fosfat ile mineralize edilerek sertleştirilmesi ve/veya hidroksiapatit ya da buşit gibi maddelerle çapraz bağlanmasına dayanır. Kırıldak yenilenmesinde kullanılan kollajen temelli biyomateyaller daha esnek olma eğilimindedirler ve birçok kollajen temelli biyomalzemenin aksine, tip I kollajen yerine tip II kollajen ile yapılmaktadır (Franceschi ve ark., 2005). Ayrıca otolog hücreler ile yüklenmiş film şeklinde kollajenler, osteokondral hasarları doldurmak için kullanılabilir (Yamasaki ve ark., 2008).

Deri ve Kornea; dermis ve stroma da bağ doku olmak üzere aynı doku yapısını paylaşır. Kollajen temelli örtü materyalleri yıllardır yanık ve yara tedavisinde kullanılmaktadır. Kolay sterilize edilebilme, toksik ve alerjik olmaması nedeniyle doku mühendisliğindeki kollajen temelli biyomalzemeler ile oluşturulan yenilikçi deri modellerinin çoğu ticarileştirilmiştir. Kollajen temelli biyomalzeme ve kök hücre kombinasyonu da kornea kusurları tedavisi için değerli bir strateji olabilmektedir. Son on yılda, yoğun hasarlı kornea limbal epitel kök hücrelerin taşınımında kollajen doku iskelelerinin çalışıldığı görülmektedir (Ramshaw ve ark., 1995; Parenteau-Bareil R.. Ve ark., 2010).

Damar Rahatsızlıkları; kardiyovasküler bozukluk ve damar tıkanıklığı gibi damarsal patolojiler olmak üzere iki ana problem söz konusudur. Zenojenik hücrelerin immunolojik potansiyele sahip olması nedeniyle son zamanlarda tamamlanan perfüzyon yöntemi ile hücreleştirme ve damar endotel yenilenmesi fonksiyonu için

rejeneratif tıpta kardiyovasküler alanda kollajenin uygulanması önemli bir yere sahiptir.

Kalp Kapakçığı; ilk kez aort ve mitral kapakçık prrotezleri 1960/1961 de mekanik kapakçıklar kullanılarak geliştirilmiştir (Starr and Edwards, 1961) ve kısa bir süre sonra aort allograft (heterograft) kapakçıklar kullanılarak üretilmiştir (Carpenter ve ark, 1969). Sonrasında çeşitli xenograftlar ticari amaçla geliştirilmiştir. Kollajen temelli araçlar sentetik biyomateryal araçlar ile karşılaştırıldığında gözenekli olma, düşük immunolojite gibi özelliklere sahiptir. Burada gözenekli olmayan yapılar kullanıldığında dokuda yüksek ateş durumu kolaylıkla meydana gelebilmektedir. Bu nedenle kollajen temelli yapılar düşük enfeksiyon riskine sahip olmaları nedeniyle ve gözenekli yapıda olmaları sayesinde tercih edilmektedirler. Bu yapılar fiziksel özelliklerinin doğal yapıya benzemesi nedeniyle en iyi özellik sağlamaktadır. Gerekli uyumluluk çalışmaları geliştirildiğinde kollajen temelli araçlar uzun dönem açıklıklarda avantajlı olabilmektedir (Ramshaw ve ark., 1995).

Ürogenital Sistem; ürogenital hastalıkların ve bozuklukların tedavisinde kullanılan kollajen temelli biyomalzemeler; sık rastlanan komplikasyonlarda kullanılan enterokistoplasti ve gastrokistoplasti yöntemlerinin yerine kullanılmaktadır. Bu nedenle, daha çok sayıda cerrahi prosedür genitoüriner problemleri çözmek için kollajen içeren doku iskelelerinin mesane büyütme ve üretral darlık gibi sorunları çözmek için kullanılmaktadır. Ayrıca ürogenital sistemlerde veziköüreteral reflü (idrarın böbreğe doğru geri akışı) ve idrar tutamama gibi rahatsızlıklarda kollajen içeren biyomateryallerin enjeksiyonu ile çözülebilecek sorunlar arasına girmiştir (Koduri ve ark., 2006).

Dermal Dolgu, Pansuman ve Taşınım Sistemleri; FDA, üç farklı kaynaktan (Sığır Zyderm ®, domuz Evolence™, insan Cosmoderm ® ve Cymetra ®) elde edilen kollajenin yüz gençleştirme ya da rekonstrüktif cerrahi de ortak olarak dermal dolgu olarak kullanımını onaylamıştır. Kollajen temelli biyoygulamalar; yara örtü malzemesi ve taşınım sistemlerinde de rol almaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar; antibiyotik taşınımlı implantların faydalarını ve uygulanabilirliğini göstermiştir. Kollajen temelli biyomalzemelerin taşınım özellikleri de yara tedavisi ve karın duvarı defektinin yenilenmesinde büyük bir potansiyel göstermektedir. Son olarak da; yine yapılan çalışmalarda kollajen matrisin gen üzerindeki etkisi klinik çalışmalarda

uygulanarak; üst solunum yolunda oluşan bir virüs çeşidinin kollajenin jel formu içinde temizlendiği görülmüştür (Berth, 2010).

Quinlan ve ark., yaptığı çalışmanın amacı; daha önce kemik yenilenmesi optimize edilmiş ve in vivo ortamda önemli gelişme sağlamış kollajen-hidroksiapatit (CHA) doku iskelesinden düşük dozda rhBMP-2'nin salınımı için taşıyım sistemi geliştirmek ve dizayn etmektir. Dizaynın kompleksliğini minimize etmek ve klinik çevrim amacıyla geliştirme yapılmış ve böylece mikro parçacık ve kimyasal fonksiyonlar olmadan bir yaklaşım seçilmiştir. RhBMP-2 ve CHA doku iskeleleri birleştirilerek, liyofilizasyon üretim prosesi kullanılmış, yüksek gözenekli CHA doku iskelesi üretilmiş, 21 gün protein salımı kontrol edilmiştir. Doku iskelesi üzerinde preosteblast kültürü in vitro ortamda biyoaktivitesini muhafaza etmiş, alkalın fosfat aktivitesinin ve kalsiyum üretiminin geliştiğini göstermiştir. İn vivo ortama implante edildiğinde; bu materyaller sıçan kalverial hasarlarında 8 hafta sonra iyileşme seviyesinin arttığını göstermiş ve CHA doku iskelesi kemikte hasara neden olmayacak şekilde kaldırılmıştır. Bu sonuçlar; INFUSE® 'dan 30 kat daha az rhBMP-2'nin mevcut klinik altın standart kullanarak kemik rejenerasyonu elde etmenin mümkün olduğunu göstermiştir (Quinlan ve ark., 2015).

Chen ve ark., kalp kapakçıklarının doku mühendisliğinde kullanımı için katmanlı yapının mekanik ve fiziksel özellikleri üzerinde etkilerini araştırarak kollajen-elastin ile iki katmanlı doku iskelesi çalışmışlardır. Doku iskeleleri; doğal kalp kapakçığı ile aynı karakteristik özelliği taklit ederek yüklenme doğrultusuna göre anizotropik bükülme modülü göstermiştir. Doku iskeleleri ile cardiosphere-driven hücrelerinin etkileşimi SEM ve multifoton mikroskopisi ile karakterize edilmiş ve asimetrik hücre dağılımı gözlenmiştir (Chen ve ark., 2013).

Zhang ve ark., doku yenilenmesinde gözenek boyutunun etkisini ve gözenekli yapıların önemini araştırmışlardır. Gözenekli kollajen doku iskeleleri önceden hazırlanmış buz partikülleri ile hazırlanmış, 150–250, 250–355, 355–425 ve 425–500 µm çapında buz partikülleri kullanılmıştır. Doğrudan kırıkta rejenerasyonu üzerindeki gözenek boyutu etkisini incelemek için gözenekli doku iskeleleri sığır eklem kondrosit kültüründe kullanılmıştır. Kondrositler doku iskeleleri boyunca homojen bir dağılım göstermiş ve in vivo sonuçlar dahilinde 150-250 µm buz parçacıklılılarıyla hazırlanmış doku iskeleleri mikro-kırıkta yenilenmesinde en iyi etkiyi göstermiştir (Zhang ve ark., 2013).

Jansen ve ark., sıçanların deri ve damaklarına implante edilen kollajen doku iskelelerini doku reaksiyonlarını karşılaştırmıştır. Çapraz bağlı kollajen doku iskeleleri damak içindeki sub-mukoperiostala implante edilmiştir ve 16 haftaya kadar 25 sıçanın kafatasının üzerindeki deri altı ve arka bölgesi değerlendirilmiştir. H&E-boyalı kesitler üzerindeki hücre yoğunluğu ve büyük hücre sayıları tanımlanmıştır. Kan damarları, inflamatuvar hücreler ve miyofibroblastlar imünohistokimya ile tespit edilmiştir. Derinin ilk hali ile karşılaştırıldığında ilk hafta boyunca damak içindeki kan damarlarında ve miyofibroblastların hızlı bir şekilde büyüdüğü bulunmuştur. Başlangıçta arka deride birkaç inflamatuvar yanıt bulunmuştur. Ayrıca doku iskelelerinde yaklaşık iki katı kadar büyük hücrelerin mevcut olduğu tespit edilmiştir (Jansen ve ark., 2008).

Ma ve ark., deri doku mühendisliği için gözenekli doku iskelelerini kollajen/kitosan kullanarak dondurma-kurutma yöntemi ile üretmiş ve gluteraldehit (GA) ile doku iskelelerinin biyostabilitesini geliştirmişlerdir. Konfokal lazer taramalı mikroskop bu karışımdaki malzemelerin eşit dağılımını doğrulamıştır. GA konsantrasyonlarının doku iskelelerinin morfolojisi ve şişme oranlarına hafif etki oluşturduğunu belirtmişlerdir. Etkin bir şekilde hücre infiltrasyonu ve çoğalmasını hızlandırmak için GA ile muamele edilen kollajenin hücre uyumluluğu in vitro insan dermal fibroblast kültüründe kanıtlanmıştır. İn vivo hayvan testlerinde ise fibroblastların çevre dokudan infiltrasyonlarının hızlandığı görülmüştür. Tüm bu sonuçlar dahilinde; GA ile çapraz bağlı kollajen/kitosan doku iskelelerinin gelişmiş biyouyumluluğu ile dermal eşdeğerliği potansiyel aday olarak görülmüştür (Ma ve ark., 2003).

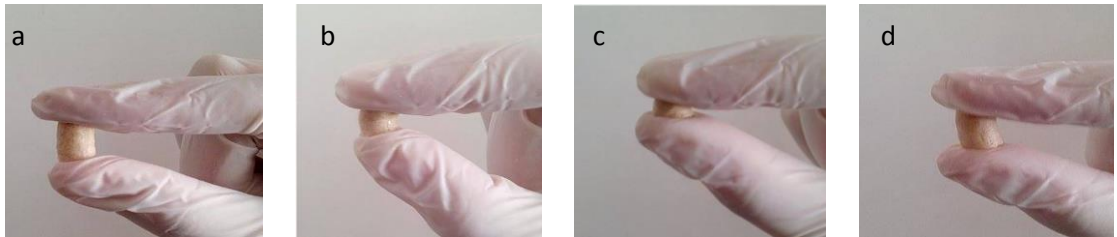
Maeda ve ark., biyobozunur ilaç taşıyıcı olarak kollajen kullanılmış, protein ilaçlarının taşınımı için matris-tipi sistemde minipelet geliştirmiştir. Çalışmada örnek ilaç olarak insan serum albümin (HSA) kullanılmış ve mikroyapısı ile salım profili analiz edilmiştir. Bulgular sonucunda, minipelletlerin erime prosesindeki nozzledan ekstrüzyonunun kollajen fiberlerinde yönlendirilmiş bir yapıya sahip oldukları ve HSA'nın bu lifler arasında homojen dağılımı görülmüştür. Salınım süresince HSA kümeleri çözülmüş ve kollajen matrisi çözeltisi içinde HSA tutulmuştur. Minipelletten HSA salınımının kollajen matris içindeki difüzyon ile kontrol edilmiş ve yoğun kollajen matrisi yapısında salım elde edilmiştir (Maeda ve ark., 1999).

2.5. KRİYOJELASYON

Kriyojel sözcüğü Yunanca kökenli olup, -kryos- (buz, soğuk) ve -jel- (jel) sözcüklerinin bir araya getirilmesinden meydana gelmiştir. Dolayısıyla soğukta yapılan jel anlamına gelmektedir (Lozinsky ve ark., 2003). Doku mühendisliğinde; hücre büyümesi ve matris içerisinde yeni dokunun oluşumuna olanak sağlaması için, doku iskelelerinin yüksek gözeneklilikte ve kabul edilebilir boyutlarda birbirleri ile bağlantılı gözenek yapısına sahip olması beklenir.

Kriyojelleşme (ya da eksi derecelerde jelleşme) teknolojisi; herhangi bir jel oluşturucu sistemden, değişik büyüklükte gözenekli yapıya sahip makrogözenekli jeller üretmeyi olası kılmaktadır. Kriyojellerde sulu matriks yapısında gözeneklilik suyun buz halini alması ve daha sonra ortamdan uzaklaşması ile buz kristallerinin yerini mikro ve makro gözeneklerin alması ile meydana gelir. Bu birbiri ile bağlantılı mikro ve makro gözenekler difüzyonun ve kütle transferinin etkin bir biçimde gerçekleştirilmesine izin vermektedir. Kriyojellerin diğer bir özelliği ise mekanik ve kimyasal olarak kararlı olmalarıdır (Bölgen, 2008).

Kriyojellerin yapı iskeletine bakıldığında sünger morfolojisine sahip olduğu Şekil 2.5’ de görülmektedir. Yani birbirine bağlantılı gözenekli sürekli bir yapı kriyojellerin temel yapısını oluşturur. Bu sünger şeklindeki gözenek sistemi çözünenlerin kriyojellerin içinden madde kaybı olmadan geçişlerini sağlar. Kriyojellerin temel yapısı, osmotik basınçları, kimyasal ve mekanik dayanıklılığıyla birleştirildiğinde, biyolojik nanopartiküllerin, mikropartiküllerin (plazmidler, virusler, hücre organelleri) ve hatta bütün hücrelerin kromatografisi için bu yapıları ilgi çekici parçacıklar haline getirmektedir (Biçen, 2009).

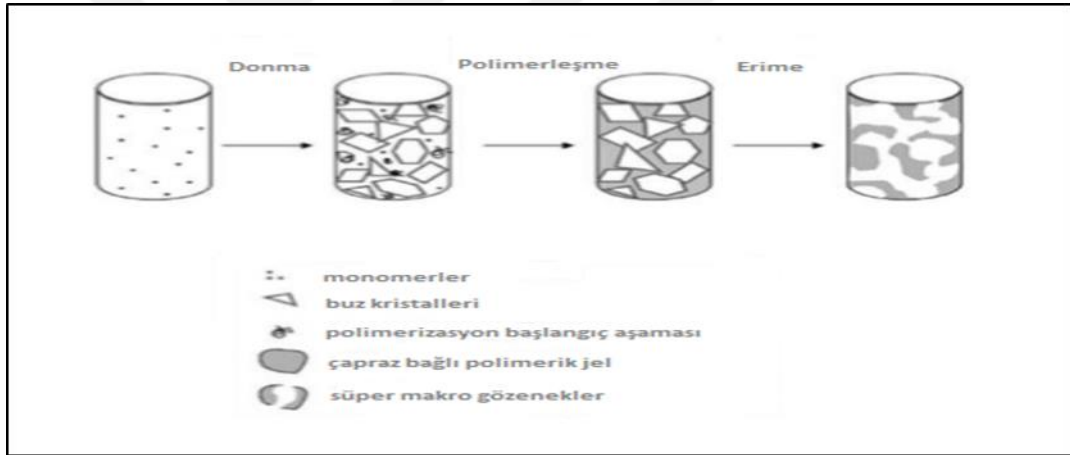


Şekil 2.5. (a) Elastik yapıdaki kriyojel, (b,c) kriyojele kademeli uygulanan güç, (d) uygulanan gücün kaldırılması ile kriyojelin eski halini alması

2.5.1. Kriyojel Hazırlanması

Bir kriyojel üretiminin genel prosedürü maddeler halinde ve yöntemin basamakları Şekil 2.6' de verilmiştir.

- ✓ Makromoleküller, düşük moleküler çözünenler (monomer, monomer karışımı veya polimer) ile çözücü içeren homojen karışım dondurulur.
- ✓ Dondurulmuş sistemde donmuş çözeltinin polikristalleri oluşur. Ancak, ortamda aynı zamanda donmamış bir mikrofaz da bulunur.
- ✓ Bu sistem kontrollü olarak erimeye bırakılır. Bu sırada kriyojellerin polimerik iskeleti oluşur, fakat aynı zamanda çok çok az miktarda çözücüde sistemde bulunmaktadır. Yani kriyojellerin polimer fazı, polimer zincirleri arasında oluşmuş mikrogözenekler içerir. Böylece kriyojeller hem heterofaz hem de hetero gözenekli bir yapıya sahip olurlar.



Şekil 2.6. Kriyojelasyon yönteminin temel basamakları (Biçen, 2009)

2.5.2. Kriyojel Yapısına Etki Eden Faktörler

Kriyojellerin yapısındaki gözeneklerin büyüklüğü, gözenek dağılımı, yapının elastikliği sentez aşamasında kullanılan çapraz bağlayıcı ve başlatıcı miktarlarıyla ve donma işleminin süresiyle değişmektedir. Kullanılan çapraz bağlayıcı ve reaksiyon başlatıcı oranı arttırıldığında daha sert ve sıkı yapıda gözenekler oluşmaktadır (Biçen, 2009).

Dondurma rejimi: Gözenek boyutu kriyojenik rejime bağlı olarak değişir. Dondurma sıcaklığı ne kadar düşük olursa, daha fazla küçük boyutlu çözücü kristalleri oluşur ve böylece daha küçük boyutlu gözenekler oluşur. Düşük sıcaklıklarda, donmamış sıvı mikrofazın hacmi azalır ve böylece daha ince ve fakat daha yoğun gözenek duvarları

oluşur. Bunun nedeni, jel başlatıcının kriyokonsantrasyonun donmamış mikrofazda artması ve hacminin azalmasıdır. Dondurma sıcaklığı ne kadar yüksek ise, büyüyen buz kristallerinin boyutu o kadar büyüktür ve bunun sonucu olarak, daha geniş gözenekli kriyojeller hazırlanır.

Çapraz bağlanma oranı: Kriyojeller hazırlanırken ne kadar az miktarda çapraz bağlayıcı kullanılmış ise, yani yapıdaki çapraz bağ oranı ne kadar az ise, suda şişme o kadar fazladır.

Konsantrasyonun etkisi: Başlangıç reaksiyonunun konsantrasyonu ne kadar yüksek ise daha yoğun ve kırılğan matriksler elde edilir, başlangıç konsantrasyonu azaltıldıkça matriksler daha elastik ve süngerimsi bir yapı göstermeye başlarlar (Bölgen, 2008).

2.5.3. Doku Mühendisliğinde Kriyojel Uygulamaları

Mu ve ark., çalışmada çapraz bağlayıcı olarak dialdehit nişasta (DAS) kullanıp 3 boyutlu süngerimsi kollajen kriyojelleri hazırlamışlardır. Yapılan SEM analizi ile kriyojellerin birbiri ile bağlantılı düzensiz gözenek yapılarının olduğu görülmüştür. Kriyojelin DSC ölçümleri saf kollajen ile karşılaştırıldığında, kriyojelin termal stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca DAS konsantrasyonunun artmasıyla kriyojellerin şişme oranı azalmış, buharlaşma testleri ise kriyojelin uzun süre nem tutabilir olduğunu göstermiştir. Kollajen ve DAS'ın toksik olmaması ve elde edilen kriyojelin kan ile uyumlu olmasından dolayı kriyojelin yara sargısı alanında başarılı olabileceğine değinilmiştir (Mu ve ark., 2010).

Dainiak ve ark., makrogözenekli süngerimsi jelatin fibrinojen (GL-FG) doku iskelelerini, farklı konsantrasyonlarda glutaraldehit (GA) (% 0.05-0.5) ile çapraz-bağlayarak kriyojelasyon yöntemini kullanarak üretmişlerdir. Kriyojellerin şişme kinetiği ve degradasyon oranı çapraz bağlanma derecesine bağlıdır. Bu yöntem ile doku iskelelerinin mekanik özelliklerinden ödün vermeden yüksek gözenekli ve maliyetleri açısından dondurma-kurutma yönteminden düşük olması sağlanmıştır. Bu çalışmada sonuç olarak doku iskelesi içindeki fibroblastların çoğalmasının ve göçünün GA ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda elde edilen doku iskelesinin in vitro kültür içinde 42 gün sonra dağılmaya başlağı gözlemlenmiştir. Yapılan in vitro çalışmalar doku iskelelerinin yaranın iyileşmesi üzerinde olumlu bir etkisinin olduğunu göstermiştir. (Dainak ve ark., 2009).

Rodrigues ve ark., kriyojelasyon tekniğinde; kollajen-nanohidroksiapatit ile 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodimid hidroklorid/N-hidroksisüksinimidi çapraz bağlamış, saf kollajen doku iskelesini kontrol elemanı olarak kullanmışlardır. Yapılan morfoloji analizi sonucunda rasgele dağıldığı gözlemlenen kriyojel gözeneklerinin yüzey alanları kollajen yapısındaki nanoHA yüzdesi arttıkça artmıştır. Doku iskelesinde ise şişme kapasitesi nanoHA yoğunluğu arttıkça azalmıştır. Kimyasal analizler kollajen ve HA'e ait ana piklerin varlığını ve nanoHA agregaları ile kollajen molekülleri arasındaki bağların olduğunu göstermiştir. Kollajen-nanoHA doku iskelesi saf kollajen doku iskelesi ile karşılaştırıldığında yapısında daha fazla hücre çoğalmasına izin vermiştir. Kriyojel üzerine osteoblast hücre ekimi uygulanarak yapılan in vitro çalışmalar sonucunda bu osteoblast hücrelerinin sayısında artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar yenilikçi bir yaklaşım olarak değerlendirilen kollajen-nanoHA kriyojellerin kemik rejenerasyonu için potansiyel bir uygulama alanı olabileceğini göstermiştir (Rodrigues ve ark., 2013).

Sharma ve ark., yaptıkları çalışmada; poli etilen glikol (PEG) ve jelatin ile iki farklı çapraz bağlayıcı (gluteraldehit ve 1-etil-3-[3dimetillaminopropil] karbodimid) kullanarak kriyojelasyon yöntemi ile doku iskelesi üretmişlerdir. Üretilen kriyojeller ortalama 60-100 µm aralığında gözenek çapına sahip olup, %90 lık sıkıştırma oranında deforme olmadan standart uzunluğunu korumuştur. Kriyojellerin mekanik gücü ve visco-elastik davranışları reoloji ve serbest basınç analizi sonucunda belirlenmiştir. Üretilen bu kriyojeller hücre-matris etkileşimi, esneklik, mekanik dayanım, farklı sıcaklıklarda stabilite, biyolojik olarak uyumluluk, doğal parçalanabilme gibi özelliklere sahip olduklarından yumuşak doku mühendisliği adı altında kalp, nöral veya deri gibi birçok alanda uygulanılabileceği sonucuna varılmıştır (Sharma ve ark., 2015).

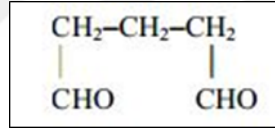
Tan ve ark., dondurma-çözdürme yöntemi ile süngerimsi kollajen kriyojel hazırlamak için çapraz bağlayıcı olarak karboksimetil selüloz (DCMC) kullanmışlardır. Yapılan FTIR analizi sonucunda çapraz bağlama reaksiyonunun ve kriyojenik işlemin kollajenin üçlü heliks yapısına zarar vermediği, SEM görüntüleri sonucunda kriyojellerin heterofaz yapıda birbiriyle bağlantılı gözeneklere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca kriyojellerin hızlı ve denge şişme oranlarının DCMC ile bağımlı olduğunu gösterilmiştir. Yapılan in vitro kan uyumluluk testleri sonucunda saf kollojen gibi DCMC 'nin de hemoliz ve kanın pıhtılaşmasını etkilemediği

görülmüştür. DCMC 'nin düşük maliyetli olması ve toksik olmaması, doku mühendisliği ve diğer biyomedikal uygulamalarda kriyojel doku iskelesinin üretimde tercih edilmesine neden olmuştur (Tan ve ark., 2015).

2.6. ÇAPRAZ BAĞLANMA

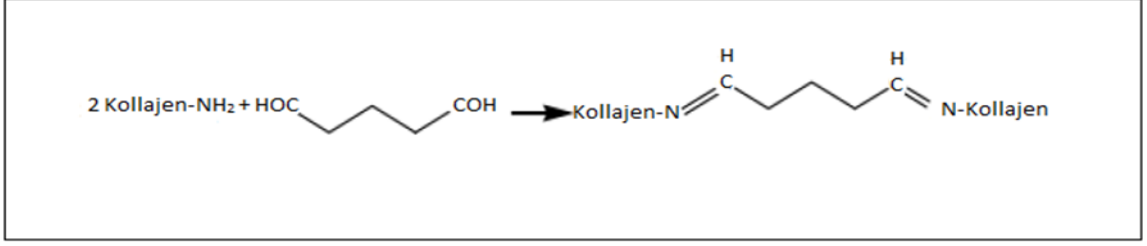
Doku mühendisliğinde kullanılacak olan biyomalzemenin elde edilmesinde, yapının korunması için çapraz bağlanma önemli bir pozisyona sahiptir. Kullanılacak çapraz bağlayıcı polimere; gözenek yapısının korunması, polimer matriksin morfolojik yapısının kontrolü ve mekanik kararlılık gibi özellik kazandırmaktadır (Öncel, 2013). Çapraz bağlayıcılar polimer zincirleri arasında köprüler meydana getirecek en az iki reaktif fonksiyonel gruba sahip moleküllerdir (Özdemir, 2006). Çapraz bağlanmada kullanılan kimyasallara genel olarak; siyanamidler, diisosiyanatlar, aldehytler (gluteraldehit), akril asitler, karbodiimidler, vb. örnek olarak verilebilir (Tosun, 2014).

Gluteraldehit; lineer 5 karbonlu dihaldehit olup $C_5H_8O_2$ formülüne sahip organik bir bileşendir ve molekül yapısı Şekil 2.7' de sunulmuştur (Migneault ve ark., 2004).



Şekil 2.7. Gluteraldehitin molekül yapısı

Keskin kokulu ve saman renkli bir sıvı olan gluteraldehit genellikle sulu çözelti olarak bulunmaktadır ve bu sulu çözeltini içinde aldehit grupları suya karışmış (hidratlaştırılmış) haldedirler. Gluteraldehit çapraz bağladığı maddenin rengini kaybetmesine ve hafif sarımsak bir renge dönüşmesine neden olmaktadır (Okoshi ve ark., 1995). Bilinen çapraz bağlama yöntemleri ile (formaldehit, siyanamid, epoksi bileşenleri, vb.) karşılaştırıldığında gluteraldehit, malzeme ile çok daha fazla çapraz bağ kurmaktadır. Gluteraldehitin sulu solüsyonu; serbest aldehit, mono ve dihidrat gluteraldehit ve monomerik, polimerik hemiasetallerin karışımını içermektedir (Tosun, 2014). Kollajenin gluteraldehit ile çapraz bağlanma reaksiyonu Şekil 2.8' de verilmiştir.



Şekil 2.8. Kollajenin glutrealdehit ile çapraz bağlanma reaksiyonu (Gorgieva ve ark., 2011)



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan materyal ve yöntemler aşağıda verilmiştir.

3.1.1. Köpek Balığı Derisinden Kollajen İzolasyonunda Kullanılan Materyaller

3.1.1.1. Kollajen

İnsan vücudunda en bol bulunan protein olan ve vücudun kuru ağırlığının yaklaşık olarak %30'unu oluşturmasından dolayı kollajen; bağ dokusunun en önemli yapısal elementidir. Ayrıca dokulara ve organların kararlılığına katkı sağladığı ve yapısal bütünlüğü muhafaza etmesi nedeniyle önemli ve yapısal proteinlerin başında gelmektedir.

Kollajen; mekanik destek malzemesi olarak üroloji, dermatoloji, ortopedi, ilaç taşıma sistemi, yumuşak doku iyileştirmesi, yara kapama, kan damarlarını yeniden yapılandırmada yapı iskelesi ya da genel cerrahide kullanılması genel olarak kollajenin mevcut araştırma ve uygulama alanlarıdır.

Kollajen izolasyonu; çeşitli hayvansal kaynakların izole edilerek saflaştırılması sonucu elde edilir. Omurgalı bir hayvanın dokularında bulunan tüm kollajenin yaklaşık % 40'ı derisinde yer almaktadır. Deri yapısında yer alan lifli proteinler arasında kollajen oranı % 98'i bulmaktadır. Bu nedenle bugün ticari olarak birçok alanda kullanılan kollajen büyük ölçüde çeşitli hayvan derilerinden (dana, domuz, tavuk, balık vb.) ve hayvanların kıkırdak, bağırsak gibi vücut dokularından saflaştırılarak elde edilmektedir. Bu çalışmada kollajen köpek balığı derisinden izole edilmiştir.

3.1.1.2. NaOH

Bu çalışmada NaOH; köpek balığı derisinden kollajen izolasyonunda derinin protein olmayan kısmını ayırmak için kullanılmıştır ve kimyasal Emir Kimya firmasından alınmıştır.

3.1.1.3. Butil Alkol

Köpek balığı derisinden kollajen izolasyonu için ekstraksiyon işleminde kullanılan Butil alkol Loba Chemie (İndia) firmasından alınmıştır.

3.1.1.4. NaCl

Bu çalışmada NaCl; kollajen ekstraksiyonu için kullanılmıştır ve kimyasal Merck (Almanya) firmasından alınmıştır.

3.1.1.5. Asetik Asit

Organik bir asit olan asetik asit, %80 çözelti formu kollajen ekstraksiyonu için kullanılmıştır ve kimyasal Emir Kimya firmasından alınmıştır.

3.1.1.6. Diyaliz Membran

Karşı diyaliz işleminde 12000-14000 Da molekül ağırlığı aralığında Spectra/Por selüloz membran (Spectrum Laboratories, USA) kullanılmıştır.

3.1.2. Kriyojel Üretiminde Kullanılan Materyaller

3.1.2.1. Gluteraldehit

Gluteraldehit (GA), doku iskelesi üretiminde çapraz bağlayıcı olarak kullanılırken, tıpta dezenfektan ve deterjanların önemli bileşenlerinden birini oluşturan kimyasal bir madde olarakta kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, gluteraldehit çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır ve %25 sulu çözelti formunda olan kimyasal Merck (Almanya) firmasından alınmıştır.

Tüm çalışmada distile su kullanılmıştır ayrıca silindir şeklinde kriyojel doku iskeleleri şırınga içerisinde (1 ml, 0.5 cm çapında) hazırlanmıştır.

3.1.2.2. Etanol

Etil alkol olarak adlandırılan etanol (Sigma-Aldrich, USA) renksiz organik bir bileşiktir ve bu çalışmada degredasyon sonra kriyojel doku iskelelerinin sterilizasyon işleminde kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

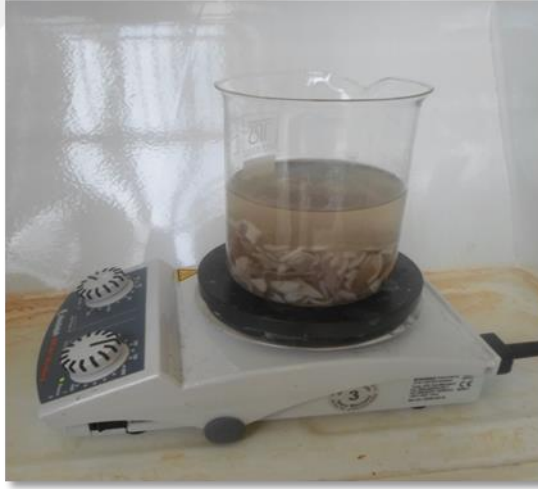
Bu çalışmada; köpek balığı derisinden kollajen izole edilerek, kollajen temelli doku iskeleleri hazırlanmıştır. Kriyojelasyon yöntemi ile üretilen doku iskeleleri için çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehit kullanılmıştır.

3.2.1. Köpek Balığı Derisinden Kollajen İzolasyonu

Köpek balığı derisinden kollajen izolasyonu Singh ve ark., sundukları yöntem modifiye edilerek yapılmıştır (Singh ve ark., 2010). Yöntemin detayları aşağıda sunulmuştur.

3.2.1.1. Köpek Balığı Derisinin Hazırlanması

Köpek balığı derisi; 5-8 °C sıcaklığında su ile yıkanmış ve yaklaşık olarak 0.5x0.5 cm² boyutunda parçalara ayrılmıştır. Şekil 3.1’ de görüldüğü gibi toplamda 50 gram olan köpek balığı derisinden kollajen dışındaki proteinlerin ayrılması için; 500 mL, 0.1 M NaOH çözeltisi kullanılarak, 4 °C sıcaklıkta ve 250 rpm karıştırma hızında toplam 6 saat boyunca manyetik karıştırıcıda 2 saatte bir 0.1 M NaOH (1:10 w/v) çözeltisi değiştirilmek üzere karıştırılmıştır.



Şekil 3.1. Kesilmiş balık derisinin NaOH çözeltisi ile muamele edilmesi

3.2.1.2. Köpek Balığı Derisinde Bulunan Yağların Arındırılması

0.1 M NaOH çözeltisi ile muamele edilen deri; hafif bazik veya nötr olana kadar su ile yıkanmıştır. Deri; %10’ luk (v/v) bütil alkol çözeltisi ile çözelti 12 saatte bir değiştirilerek 48 saat boyunca 4 °C de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Böylece deri içerisindeki yağların uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Deri/bütil alkol oranı

1/10 (w/v) olacak şekilde ayarlanmıştır. Yağlarından ve kollajen dışındaki proteinlerinden arındırılmış balık derisinin görüntüsü Şekil 3.2' de sunulmuştur.



Şekil 3.2. Yağlarından ve kollajen dışındaki proteinlerinden arındırılmış balık derisi

3.2.1.3. Asitte Çözünen Kollajen (ASC) Ekstraksiyonu

Yağından arındırılmış deri; 5-8 °C de su ile yıkanarak 24 saat boyunca 4 °C sıcaklıkta deri/asetik asit oranı 1/15 (w/v) olacak şekilde ayarlanarak 0.5 M asetik asit çözeltisi içinde 250 rpm karıştırma hızında karıştırılmıştır. 0.5 M asetik asit çözeltisi içinde karıştırma işlemi sonrasında deri içerisinde bulunan kollajen asetik asit çözeltisine geçmiştir. Deri kalıntısı ve çözeltiden oluşan karışım Şekil 3.3' de görüldüğü gibi peynir süzme kumaşından hazırlanan filtreden geçirilerek çözelti katı maddesinden ayrılmıştır.



Şekil 3.3. Deri ve çözeltiden oluşan karışımın filtre edilmesi

Süzme sonrası elde edilen filtrata; son konsantrasyon 2,6 M olacak şekilde NaCl tozu eklenmiştir. Oluşan karışım 6000 rpm ile 30 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası oluşan kalıntı; 0.5 M asetik asit ile minimum hacimde çözdürülmüş ve oluşan karışım yaklaşık 50 katı 0.1 M asetik asit ile 24 saat boyunca karşı diyaliz edilmiştir. Daha sonra karışım aynı şekilde saf su ile Şekil 3.4' de sunulduğu gibi 24 saat boyunca karşı diyalize tabi tutulmuştur.



Şekil 3.4. Karşı diyaliz sisteminin görüntüsü

Diyalizat; 24 saat -80 °C de 24 saat dondurularak 24 saat liyofilize (FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dry System - 7670531, Labconco, Amerika) edilmiştir ve kollajen verimi hesaplanmıştır. Kollajen verimi aşağıdaki eşitlik 3.1' e göre hesaplanmıştır

$$Y = \frac{V \times C}{W} \times 100 \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte Y; verim, V; çözelti hacmi (ml), C; liyofilizasyon sonrası kollajen ağırlığı/ekstrakte edilen çözelti hacmi (g/ml), W ise kullanılan balık derisi ağırlığıdır (g).

3.2.1.4. Pepsinde Çözünen Kollajen (PSC) Ekstraksiyonu

Filtre işlemi sonrasında kalan deri (kalıntı) ile kalıntı/çözücü oranı 1/15 (w/v) 0.5 M asetik asit ve pepsin/kalıntı oranı 20U/g kalıntı olacak şekilde oluşan karışım 24 saat ve 250 rpm karıştırma hızında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışım peynir kumaşından oluşan filtreden geçirilerek filtrata son konsantrasyon 2.6 M olacak şekilde NaCl tozu ilave edilir. 6000 rpm de 30 dakika boyunca santrifüjleme sonrası oluşan kalıntı minimum hacimde 0.5 M asetik asitte çözülerek oluşan karışım sonrası hacminin 50 katı olan 0.1 M asetik asit ile 24 saat boyunca karşı diyaliz yapılmıştır.

Daha sonra karışım saf su ile karşı diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Diyalizat 24 saat boyunca liyofilize edilerek pepsinde çözünen kollajen (“pepsin soluble collagen”) (PSC) elde edilmiştir ve PSC verimi eşitlik 3.1 e göre hesaplanmıştır. Liyofilizasyon işlemi sonrasında elde edilen kollajen Şekil 3.5’ de sunulmuştur.



Şekil 3.5. Liyofilizasyon işlemi sonrası elde edilen kollajen

3.2.2. Kollajen Karakterizasyonu

3.2.2.1. Kollajenin FTIR Analizi

Kollajenin kimyasal yapısının analizi; FTIR (Frontier Spectrometer, PerkinElmer, USA) 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında ki, 4 cm^{-1} çözünürlükte olan 32 tarama sonucu elde edilmiştir.

3.2.2.2. UV-Vis Analizi

UV-Vis (Specord 210 Plus, Analytik Jena, Germany) spektrumu ölçümü için, 0.5 M asetik asit temel alınarak, kollajen; konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde asetik asit içinde çözdürülmüş ve ölçümler yapılmıştır.

3.2.2.3. Zeta Potansiyel Ölçümü

Kollajen örnekleri 0.5 M asetik asit ile son konsantrasyon %0.05 (w/v) olacak şekilde 4 °C’ de çözünene kadar karıştırılmış ve pH ayarlamaları 1.0 M KOH ve 1.0 M nitrik asit ile yapılmıştır. Kollajen çözeltilerinin zeta potansiyelleri (Zeta sizer, Malvern, United Kingdom) 2-3-4-5-6 pH aralıklarında ölçülmüştür.

3.2.2.4. Kollajenin SEM Analizi

Kollajenlerin morfolojisi (gözenek yapısı ve boyutu, duvarlarının kalınlıkları) için taramalı elektron mikroskopisi (Zeiss/ Supro 55, Quanta 400F Field Emission, ABD) kullanılmış ve örnekler platin ile kaplanarak x400, x1000 ve x2000 büyütmelemlerde incelenmiştir.

3.2.3. Kollajen Kriyojellerin Üretimi

Doku mühendisliği uygulamalarına uygun kollajen temelli kriyojellerin üretilmesi amacıyla kollajen-gluteraldehit (Col-GA)' in farklı konsantrasyonları denenerek kriyojel doku iskeleleri üretilmiş ve karakterize edilmiştir.

Kollajen, % 3, 6 ve 8 (w/v) konsantrasyonuna sahip olacak şekilde 0,8 ml distile suda çözdürülmüştür. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan gluteraldehit ise % 0.5, 1 ve 2 (v/v) konsantrasyonunda 0,2 ml hazırlanmıştır. Kollajen ve gluteraldehit çözeltileri farklı konsantrasyonlarda karıştırılarak 2,5 ml'lik şırıngalara konulmuş ve donma işlemi için -12 °C ' de 2 saat kriyostatta (WiseCircu WCR – P6 CFC 404 A, Wisd Laboratory Instrument, Korea) bekletilmiştir. Daha sonra donmuş olan reaksiyon karışımı -16 °C buzluğa alınarak 24 saat dondurma işlemine devam edilmiştir. Dondurma işleminden sonra ise donmuş karışım, oda sıcaklığına alınarak çözdürülmüştür. Çözdürme işleminden sonra; kriyojeller distile su ile yıkanarak reaksiyona girmemiş çapraz bağlayıcının kriyojellerden uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Daha sonra kriyojeller -80 °C de 24 saat bekletildikten sonra 24 saat liyofilize edilmiştir.

3.2.4. Kollajen Kriyojellerin Karakterizasyonu

3.2.4.1. Kriyojellerin FTIR Analizi

Kollajen kriyojellerin kimyasal yapısının tayini; FTIR (Frontier Spectrometer, PerkinElmer, USA) 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında ki, 4 cm⁻¹ çözünürlükte olan 32 tarama sonucu elde edilmiştir.

3.2.4.2. Kriyojellerin SEM Analizi

Kollajen kriyojellerin morfolojisini (gözenek yapısı ve boyutu, duvarlarının kalınlıkları) belirlemek için taramalı elektron mikroskopisi (Zeiss/ Supro 55, Quanta 400F Field Emission, ABD) kullanılmış ve örnekler platin ile kaplanarak x400, x3000 ve x25000 büyütmelemlerde incelenmiştir. Kollajen kriyojellerin; 10 gözenekten ölçüm alınarak ortalama gözenek çapları, 5 duvarda ölçüm alınarak duvar kalınlıkları hesaplanmıştır.

3.2.4.3. Şişme Özelliğinin İncelenmesi

Kollajen kriyojellerin şişme özelliklerinin belirlenmesi için liyofilizatörden çıkartılan örneklerin kuru ağırlığı (M_d) tartılarak her bir kriyojel numune kaplarındaki yaklaşık 50 ml olan distile suya bırakılmıştır ve şişmeleri sağlanmıştır. Belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak filtre kağıdı üzerinde hafifçe fazla suları alınarak tartılmıştır (M_w). Daha sonra şişme oranı (S_r) Eşitlik 3.2'e göre hesaplanmıştır. Şişme testi her bir örnek için 3 kez yapılmış olup ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

$$S_r (\%) = [(M_w - M_d) / M_d] * 100 \quad (3.2)$$

3.2.4.4. In Vitro Degredasyon Profillerinin İncelenmesi

Kollajen kriyojellerin degradasyonu distile su ve 37 °C de çalkalamalı su banyosunda (Daihan Scientific CO. LTD., WiseBath WB-22, Korea) günde 1 saat 70 rpm de çalkalanarak izlenmiştir. Kriyojel örnekleri şişme testi sonrasında sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuş ve 10 ml distile su içeren santrifüj tüplerine konulmuştur. Belirli zamanlarda (3, 7, 14, 21 ve 42. günlerde) kriyojel örnekleri ortamdaki 30:70 etanol-su karışımında steril edilerek oda sıcaklığında kurutulmuş ve ağırlıkları ölçülmüştür. Daha sonra degradasyonun devamı için örnekler tekrar taze distile su içine konulmuştur. Degradasyon hesaplaması Eşitlik 3.3' ye göre yüzde ağırlık

kaybına bağlı olarak hesaplanmıştır. Yine bu çalışmada da her bir örnek için 3 kez test yapılmış olup, sonuçların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

$$\text{Deg (\%)} = [(W_i - W_s) / W_i] * 100 \quad (3.3)$$

Bu eşitlikte W_i ; degradesyon öncesi kuru ağırlık, W_s ise belirli zaman aralıklarında degradesyon sonrası kriyojellerin kuru ağırlığıdır.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu bölümde doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere köpek balığı derisinde izole edilen kollajen ve çapraz bağlayıcı (GA) kullanılarak kriyojelasyon yöntemi ile kollajen temelli doku iskelelerinin üretilmesi ile ilgili deneysel sonuçlar sunulmuş ve elde edilen sonuçlar üzerine tartışmalar yapılarak çalışmaların sonuçları değerlendirilmiştir.

4.1. KÖPEK BALIĞI DERİSİNDEN KOLLAJEN İZOLASYONU

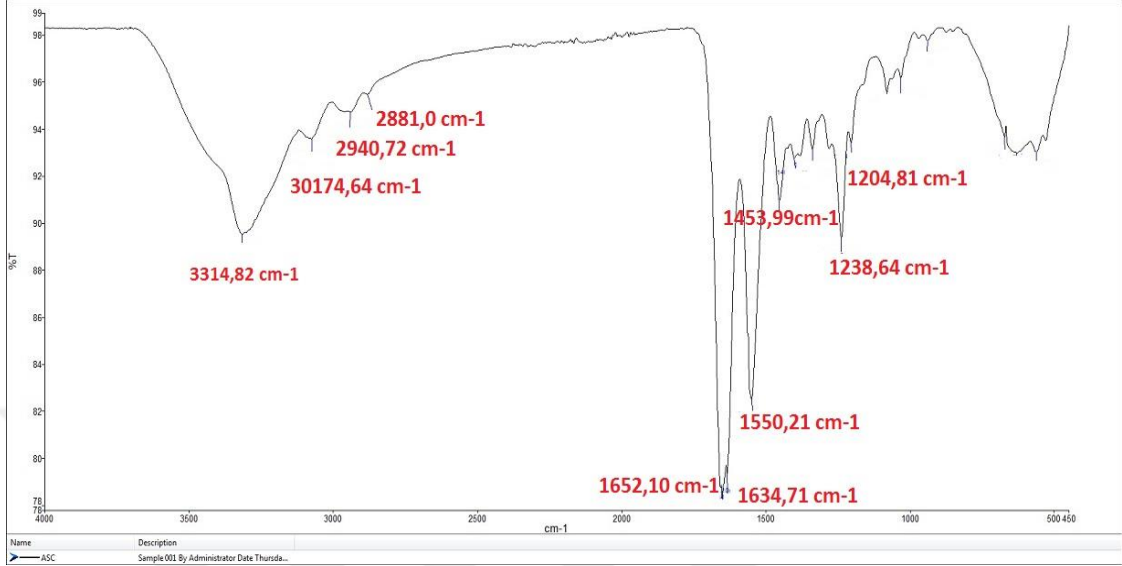
Köpek balığı derisinin kuru ağırlığına göre ASC ve PSC için kollajen verimi hesaplanmıştır. ASC ve PSC verimi %14.53 ve %2.42 iken, toplam verim %16.95' dir. Daha önce literatürde sunulan çalışmalarda, farklı balık derilerinden elde edilen kollajenin verimleri ASC ve PSC için; ağırlıkça nil levreği derisinde %63.1 ve %58.7 (Sinthusamran ve ark., 2013), kolyoz balığı derisinde %58.62 ve %14.43 (Li ve ark., 2013), ıslak ağırlıkta ise kahverengi çizgili köpek balığı derisinde %9.38 ve %8.86, kocagöz balığı derisinde %6.4 ve %1.1 (Jongjareonrak, 2005), kahverengi şeritli kırlangıç balığı derisinde %9 ve %4.7 (Jongjareonrak ve ark., 2005) olarak bulunmuştur.

Kollajen çözünürlüğünde mevcut sonuçlar; köpek balığı derisinden elde edilen kollajenin telopeptid bölgede aldehit gruplarının yoğunlaşmaya başlamasının yanı sıra birçok zincirler arası çapraz bağların kovalent bağlarla bağlandığı gerçeğini açıklamıştır (Prabjeet ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2009) ve literatür çalışmaları sonucunda da koyu renkli balıklarda kollajen oranının yüksek olduğu saptanmıştır (Senaratne ve ark., 2006).

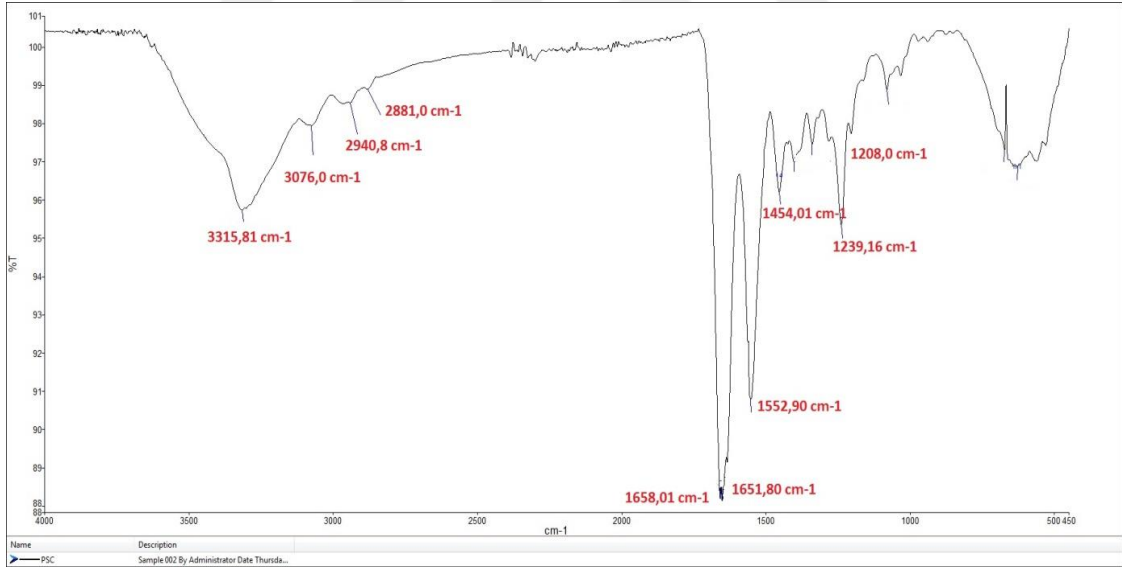
Köpek balığı derisindeki kollajen; pepsin ile özellikle telopeptid bölgede tutunmayı başarmaktadır. Çünkü pepsin; telopeptid bölgesinde çapraz bağlarla üçlü sarmal bütünlüğe zarar vermeden kollajenin çözünürlüğünü artırma özelliğine sahiptir. Bu durum göz önüne alındığında yapılan çalışmalar sonucu pepsinin kollajen izolasyonunda verimi arttırmak için kullanılabileceğini göstermiştir. Yine kuru ağırlık verim hesaplanmasına göre farklı balık dersindeki kollajenin ASC ve PSC verimleri sırasıyla; kedi balığında %16.8 ve %28.0 (Zhang ve ark., 2009), kanal kedi balığında %25.8 ve %38.4 (Liu ve ark., 2007) olarak bulunmuştur.

4.1.1. Kollajenin FTIR Analizi

ASC ve PSC içerisindeki kollajenin kimyasal analizi için FTIR spektrumları Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’ de belirtilmiştir.



Şekil 4.1. ASC için FTIR spektrumu



Şekil 4.2. PSC için için FTIR spektrumu

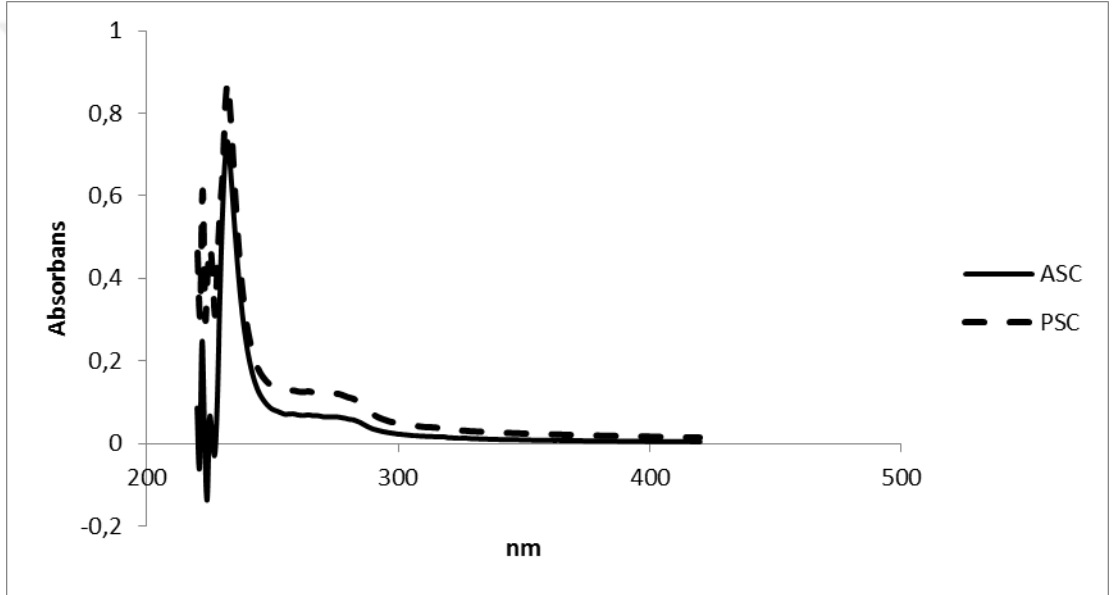
Köpek balığı derisinden elde edilen kollajenin FTIR spektrumları diğer balık türlerinden izole edilen kollajen ile benzer bulunmuştur. ASC ve PSC için Amit A grubu sırasıyla 3314.82 cm⁻¹ ve 3315.81 cm⁻¹ dalga boyunda görülmüştür. Peptidin N-H bükülme titreşimleri ve hidrojen grubu içermesi nedeniyle genellikle dalga boyu 3300.00 cm⁻¹’ dir (Wang ve ark., 2008; Prabjeet ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2009; Kittiphattanabawon ve ark., 2010). Köpek balığı derisinden kollajen izole ettiğimiz bu çalışmada da kollajendeki N-H grupları ve hidrojen gruplarının varlığı görülmektedir.

Amit B grubu kollajen için 2900 cm^{-1} dalga boylarında görülmektedir (Nagai ve ark., 2001). Bu çalışmada Amit B grubu ASC ve PSC için sırasıyla 2940.72 cm^{-1} ve 2940.8 cm^{-1} dalga boyunda görülmektedir. Bu dalga boyları CH_2 'nin asimetrik uzamasını temsil etmektedir.

Amit I grubunun karakteristik frekansları 1600.00 cm^{-1} ve 1700.00 cm^{-1} dalga boyunda değişmektedir. Amit I grubu ASC ve PSC için sırasıyla 1652.10 cm^{-1} ve 1658.30 cm^{-1} dalga boylarında görülmüştür. Bunun nedeni olarak polipeptid boyunca karbonil gruplarının uzaması gösterilmiştir. ASC'nin telopeptid arasında PSC'ye oranla büyük olmayan sarmal yapısı nedeniyle $\text{C}=\text{O}$ ve komşu hidrojen arasındaki hidrojen bağı PSC ile karşılaştırıldığında ASC'nin dalga boyu daha düşük olmuştur. ASC ve PSC için amit II grubu sırasıyla 1550.21 cm^{-1} ve 1552.90 cm^{-1} , amit III grubunun ise dalga boyu sırasıyla 1238.64 cm^{-1} ve 1239.16 cm^{-1} 'dir. Amit II ve amit III grupları sırasıyla N-H bükülme titreşimlerini ve C-H uzamalarını temsil etmektedir. Ayrıca Amit II grubunun 1548 cm^{-1} dalga boyunda varlığını göstermesi N-H bükülme titreşimleri ile CN uzama titreşiminden olduğu, amit III grubunun 1204.81 cm^{-1} dalga boyu ve 1453.99 cm^{-1} dalga boyu arası kollajendeki sarmal yapıları göstermektedir. ASC ve PSC arasında bu dalga boyları göz önüne alındığında pepsin hidrolizi görünüşünün PSC'ye ait üçlü sarmal yapı üzerinde belirgin bir etkisinin olduğu görülmüştür (Prabjeet ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2009; Kittiphattanabawon ve ark., 2010).

4.1.2. UV-Vis Analizi

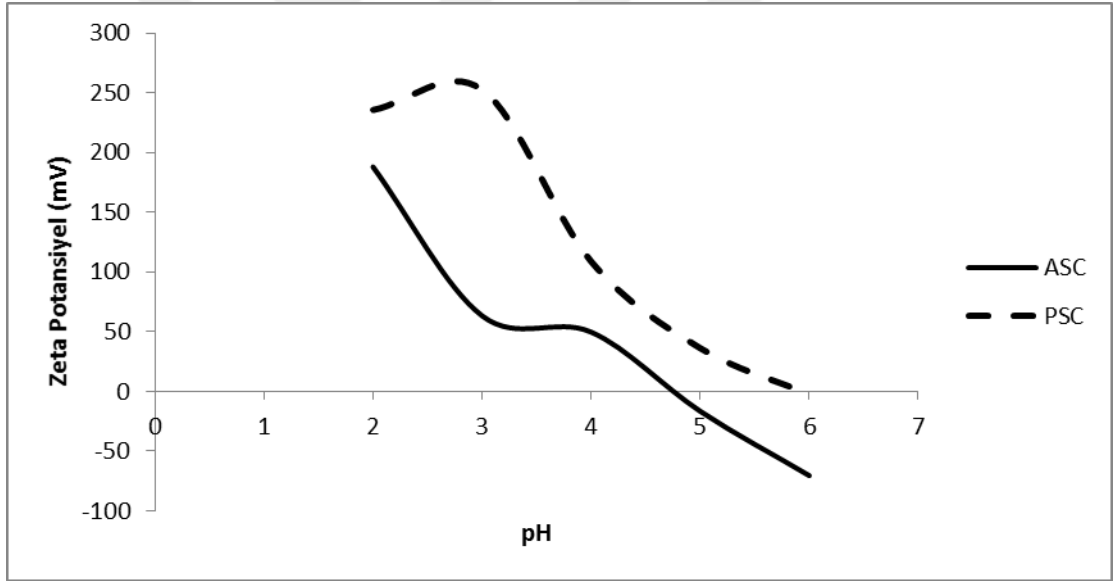
Genel olarak tirozin ve fenilalanine duyarlı kromoforların 251 ve 283 nm de UV ışığını absorbe ettiği görülmektedir (Liu ve ark., 2006). Köpek balığı derisinden elde edilen kollajenin UV-Vis spektrumu Şekil 4.3’ de sunulmuştur. ASC ve PSC için UV-Vis spektrumları 230 nm ile 240 nm arasındaki bölgede yüksek yoğunluk ve saflıkta elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre kollajen olmayan proteinlerin yüksek oranda giderildiği görülmüştür. 280 nm’ de absorbe edilmiş düşük miktarda tirozinin olduğu belirlenmiştir. UV-Vis spektrumları sonucunda izole edilen kollajenin protein yapısında olduğu kanıtlanmıştır (Zhang ve ark., 2009; Huang ve ark., 2011).



Şekil 4.3. ASC ve PSC için UV-Vis Spektrumu

4.1.3. Zeta Potansiyel Ölçümü

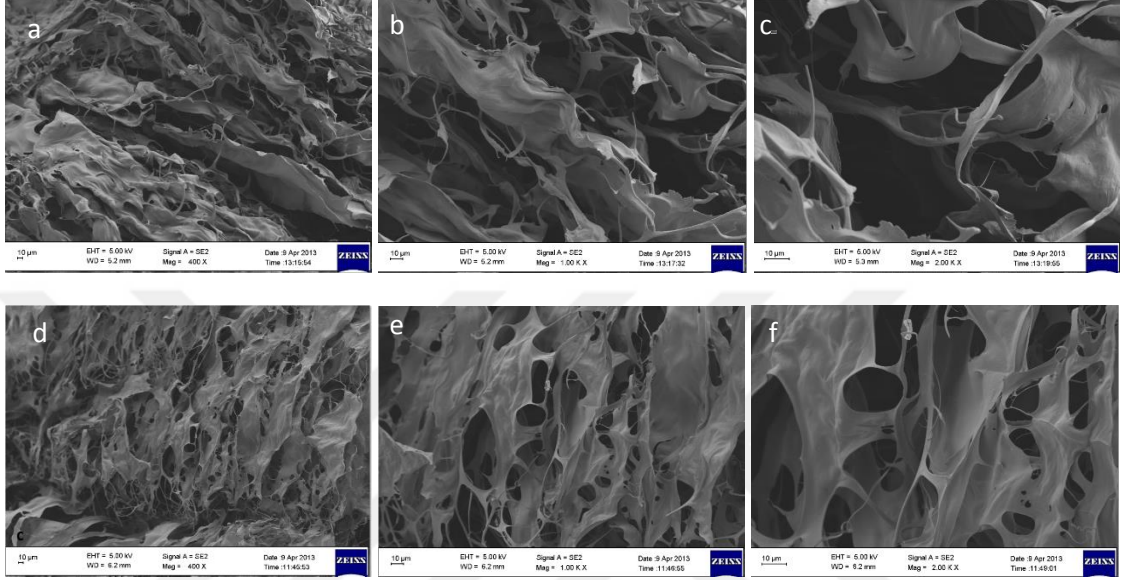
ASC ve PSC için farklı pH değerlerin zeta potansiyeli Şekil 4.4' de sunulmuştur. ASC ve PSC için sıfır yüzeyinde net yük sırasıyla pH 4.8 ve 5.9 da gözlenmiştir. Literatür ile karşılaştırıldığında sulu bir sistemdeki proteinde pozitif yükler ve negatif yükler birbirini dengelediklerinde (izoelektrik nokta) sıfır yüke sahip oldukları sonucu doğrulanmıştır (Prabjeet ve ark., 2011; Kittiphattanabawon ve ark., 2010). Bu noktada proteinler moleküler arası en az gücüne sahiptir. ASC ve PSC için farklı yüzey yüklerinde pepsin içindeki telopeptid bölgelerin taşınmasına neden olarak asit içindeki temel amino asit kalıntıları düşünülmüştür. Özellikle diğer yüzey alanlarında farklı çalışmalar ile karşılaştırıldığında amino asit kalıntılarının dağılım ve bileşenlerini nedeniyle kollajenin izoelektrik noktası değişkenlik gösterebilmektedir. Bu çalışmada genel olarak ASC ve PSC için pH 4' den sonra zeta potansiyelinde düzgün bir azalma görülmüştür (Sinthusamran ve ark., 2013).



Şekil 4.4. ASC ve PSC için kollajenin Zeta Potansiyeli

4.1.4. Kollajenin SEM Analizi

Liyofilize edilmiş kollajenin gözenekli bir yapıya sahip olduğu Şekil 4.5’ de sunulan SEM görüntüleri ile ortaya konulmuştur. ASC ve PSC için sırasıyla, 10 gözenekten ölçüm alınarak ortalama gözenek çapları 61.071 ± 27.51 ve 50.308 ± 22.89 μm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5. ASC ve PSC’ ye ait farklı büyütmelede SEM görüntüleri. (a) ASC, X400, (b) ASC, X1000, (c) ASC, X2000, (d) PSC, X400, (e) PSC, X1000, (f) PSC, X2000

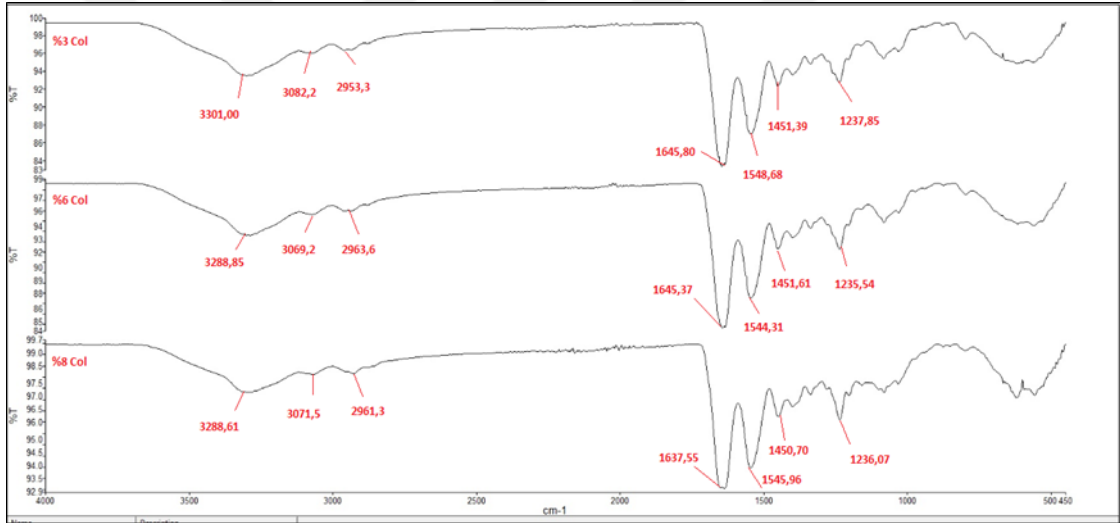
ASC ve PSC için SEM görüntüleri incelendiğinde bu örneklerin gözenekli yapıda olduğu ve gözenek çaplarının ortalama 50 ve 60 μm arasında değiştiği belirlenmiştir. Li Z. ve ark. yaptığı çalışmada ASC ve PSC için gözenek dağılımları incelenmiş, kollajene uygulanan liyofilizasyon işleminin homojen yapıda gözenekler elde edilmesi için önemli bir proses olduğu belirtilmiş ve PSC için daha düzgün yapıda gözenekler elde edildiği ortaya konulmuştur (Li ve ark., 2013).

4.2. KOLLAJEN KRİYOJELLER

Bu çalışmada köpek balığı derisinden izole edilen kollajenden kriyojelasyon yöntemi ile doku iskeleleri üretilmiştir. Çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehit kullanılmıştır. Kollajen ve gluteraldehit konsantrasyonları değiştirilerek yapısal özellikleri farklı kriyojel üretilmiş ve karakterize edilmiştir.

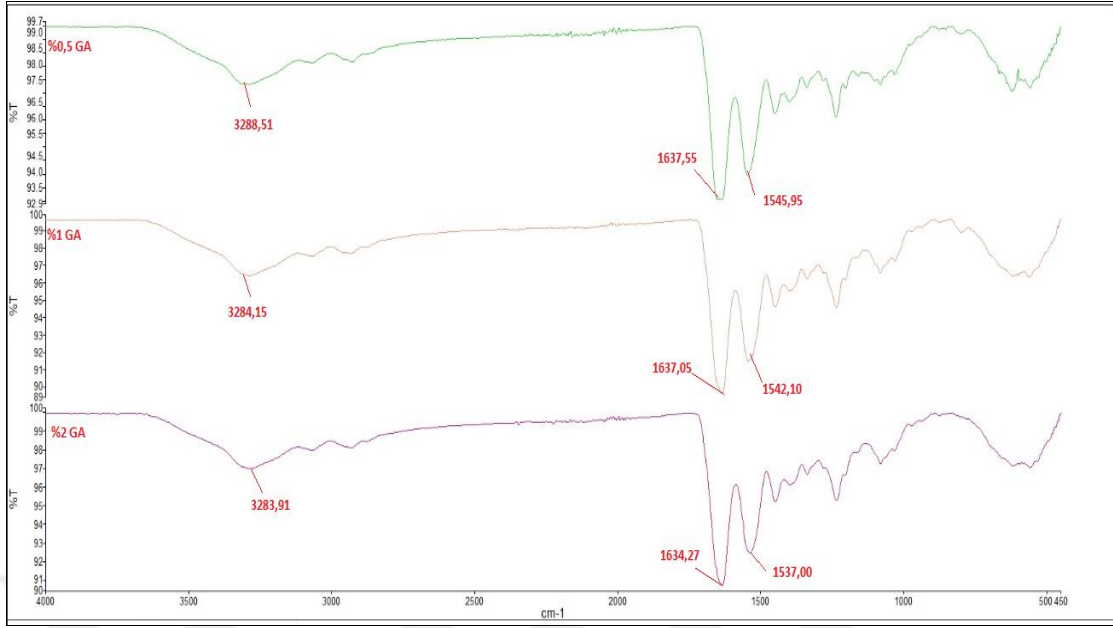
4.2.1. Kriyojellerin FTIR Analizi

Kollajen kriyojellerin fonksiyonel gruplarının tanımlanması, yapısının ortaya konulması ve kullanılan çapraz bağlayıcı ile kimyasal reaksiyonunun belirlenmesi için FTIR spektroskopisinden yararlanılarak elde edilen sonuçlar Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.'de sunulmuştur.



Şekil 4.6. Sabit GA (%0.5) ve %3, %6 ve %8 kollajen konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin FTIR spektrumları

GA; kollajenin serbest amino grupları arasında köprü kurarak çapraz bağlanmasını sağlayan reaksiyonu gerçekleştirmektedir. İzole edilen kollajenin FTIR spektrumundaki dalga boylarında çok fazla değişim gözlenmezken kollajenin aldehit grupla çapraz bağlanmasıyla meydana gelen C=N (Schiff bazı) bağınının dalga boyu 1655 cm^{-1} 'lerde ve Amit I grubunun karakteristik frekanslarının 1600.00 cm^{-1} ve 1700.00 cm^{-1} dalga boyunda geniş dağılımının bu piki maskeleyiği görülmektedir (Prabjeet ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2009; Mu ve ark., 2010).



Şekil 4.7. Sabit kollajen (%8) ve %0.5, %1 ve %2 GA konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin FTIR spektrumları

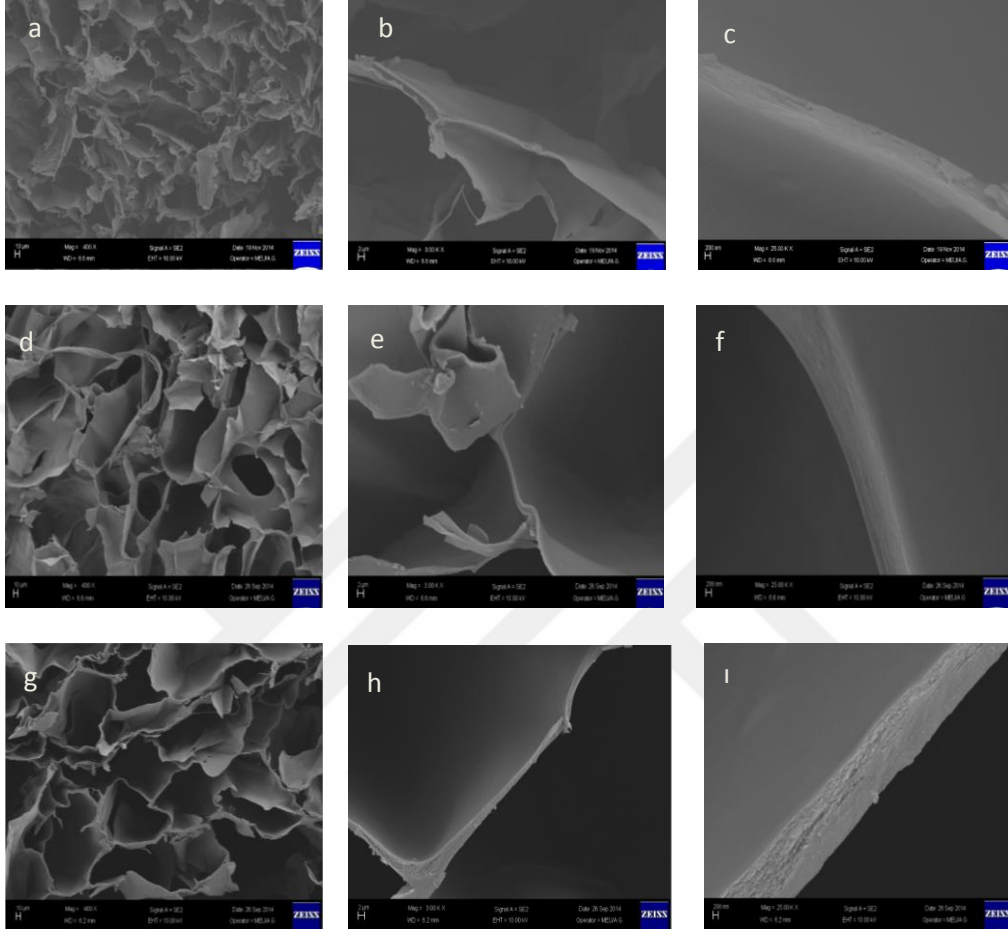
Şekil 4.7.' de benzer şekilde GA konsantrasyonunun değişmesiyle karakteristik piklerin değişmediği ve üçlü heliks yapının bozulmadığı görülmüştür. 1600 cm^{-1} dalga boyundaki pikte NH_2 gruplarının azalmasına neden olarak; aldehit grupları ve kollajenin hidroksilizin yan grupları ya da lizinin e-amino grubu arasında Schiff bazın $\text{C}=\text{N}$ gruplarına dönüştüğü belirtilmektedir (Mu ve ark., 2010).

4.2.2. Kriyojellerin SEM Analizi

Gözenek boyutu ve gözeneklilik doku mühendisliğinde kullanılan doku iskeleleri için önemli parametreler olarak kabul edilmektedir. Bu parametreler üç boyutlu olarak hücre ekimi, göçü, gen ekspresyonu ve yeni doku oluşumu için olanak sağlamaktadır (Song ve ark., 2006). Bu çalışmada kollajen kriyojel doku iskelelerinin morfolojisi SEM analizi ile incelenmiştir.

Şekil 4.8 'de sabit %0.5 GA ve %3, %6 ve %8 kollajen konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin SEM görüntüleri sunulmuştur. %3, %6 ve %8 kollajen konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin gözenek çapları sırasıyla 123.302 ± 35.08 , 145.79 ± 49.37 ve $217.4 \pm 63.96\ \mu\text{m}$ bulunmuştur. Burada artan kollajen konsantrasyonuna bağlı olarak gözenek çapının arttığı gözlenmektedir. Sabit çapraz bağlayıcı ve artan kollajen konsantrasyonunda üretilen kriyojellerde çapraz bağlanabilir grupların artması nedeniyle kriyojel gözenekliliğinin arttığı

düşünülmektedir (Van Vlierberghe ve ark., 2006). Ayrıca Çizelge 4.1’ de verilen duvar kalınlığında; kollajen konsantrasyonu arttıkça duvar kalınlığının da orantılı bir şekilde arttığı görülmüştür.

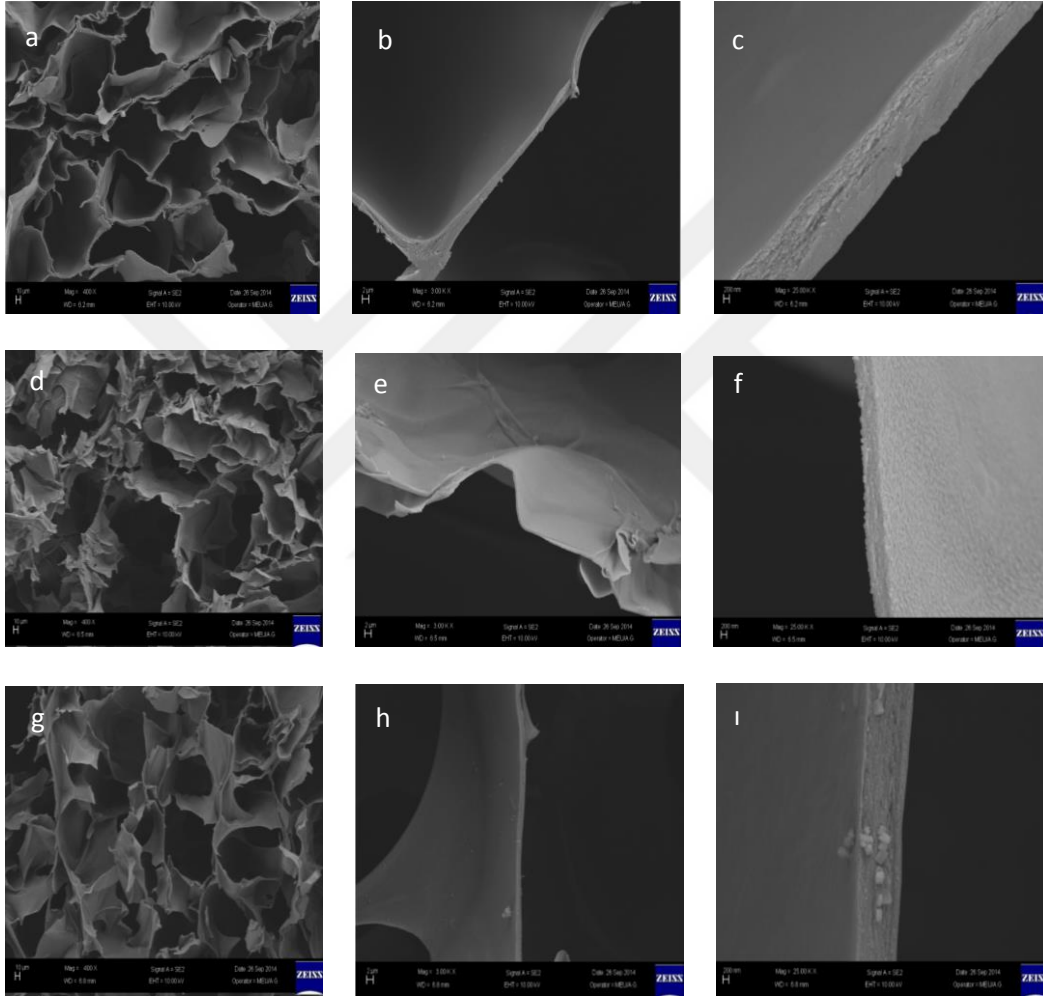


Şekil 4.8. Sabit GA (%0.5) ve %3, %6 ve %8 kollajen konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin gözenek yapılarını ve duvar kalınlığını gösteren SEM görüntüleri (a) %3 Col, X400, (b) %3 Col, X3000, (c) %3 Col, X25000, (d) %6 Col, X400, (e) %6 Col, X3000, (f) %6 Col, X25000, (g) %8 Col, X400, (h) %8 Col, X3000, (i) %8 Col, X25000

Çizelge 4.1. Sabit GA (%0.5) konsantrasyonunda, farklı kollajen konsantrasyonlarında üretilen kriyojel doku iskelelerinin gözenek boyutları ve duvar kalınlıkları

Kriyojel	Gözenek Boyutu (μm)	Duvar Kalınlığı (μm)
%3 Col-%0.5GA	123.302 \pm 35.08	0.96 \pm 0.06
%6 Col-%0.5GA	145.79 \pm 49.37	1.38 \pm 0.09
%8 Col-%0.5GA	217.4 \pm 63.96	1.71 \pm 0.09

Şekil 4.9' de sabit %8 kollajen konsantrasyonunda farklı GA konsantrasyonlarındaki kriyojellerin SEM görüntüleri sunulmuştur. Kollajen kriyojellerin ortalama gözenek çapları %0.5, %1 ve %2 GA için sırasıyla $217,4 \pm 63,96 \mu\text{m}$, $180,88 \pm 73,31 \mu\text{m}$ ve $157,21 \pm 32,05 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. Burada artan gluteraldehit konsantrasyonuna bağlı olarak gözenek çapının azaldığı gözlenmiştir (Ma ve ark., 2003).



Şekil 4.9. Sabit kollajen (%8) ve %0.5, 1 ve 2 GA konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin gözenek yapılarını ve duvar kalınlığını gösteren SEM görüntüleri (a) %0.5 GA, X400, (b) %0.5 GA, X3000, (c) %0.5 Col, X25000, (d) %1 GA, X400, (e) %1 GA, X3000, (f) %1 GA, X25000, (g) %2 GA, X400, (h) %2 GA, X3000, (i) %2 GA, X25000

Çizelge 4.2' de sunulan sabit kollajen konsantrasyonunda gözenek boyutu ve duvar kalınlığı değerlendirilmiştir. Kollajen kriyojellerin duvar kalınlığına bakıldığında; GA konsantrasyonu arttıkça duvar kalınlığında çok fazla değişimin olmadığı görülmektedir. Dainak ve ark., yaptığı bir çalışmada farklı GA konsantrasyonlarının doku iskelesinin duvar kalınlığı üzerinde çok fazla etkisinin olmadığını belirtmişlerdir (Dainak ve ark., (2009).

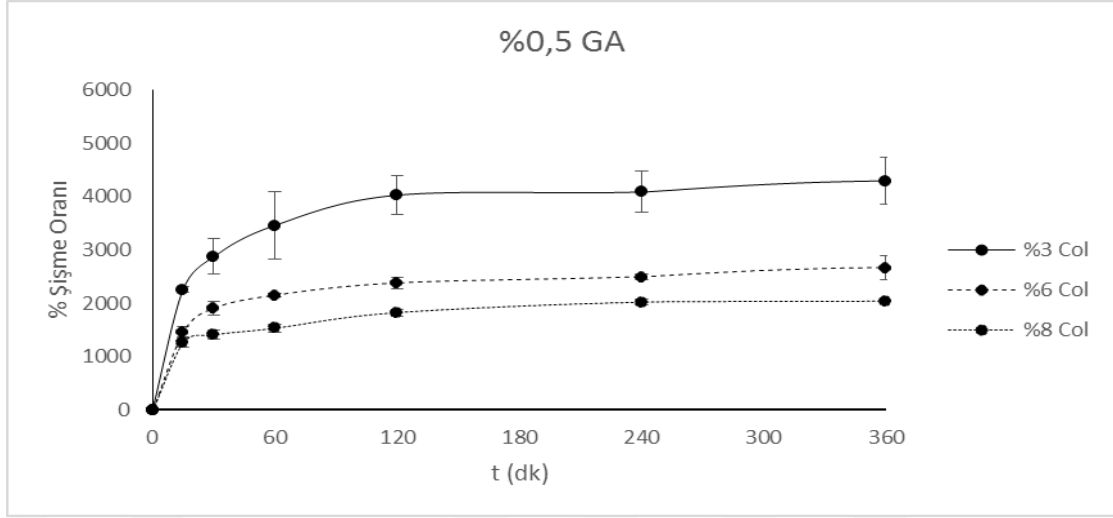
Çizelge 4.2. Sabit konsantrasyonda (%8) kollajen, farklı GA konsantrasyonlarında üretilen kriyojel doku iskelelerinin gözenek boyutları ve duvar kalınlıkları

GA Konsantrasyonu (%, v/v)	Gözenek Boyutu (μm)	Duvar Kalınlığı (μm)
0.5	217.4 \pm 63.96	1.72 \pm 0.09
1	180.88 \pm 73.31	0.07 \pm 0.03
2	157.21 \pm 32.05	1.61 \pm 0.04

4.2.3. Şişme Özelliğinin İncelenmesi

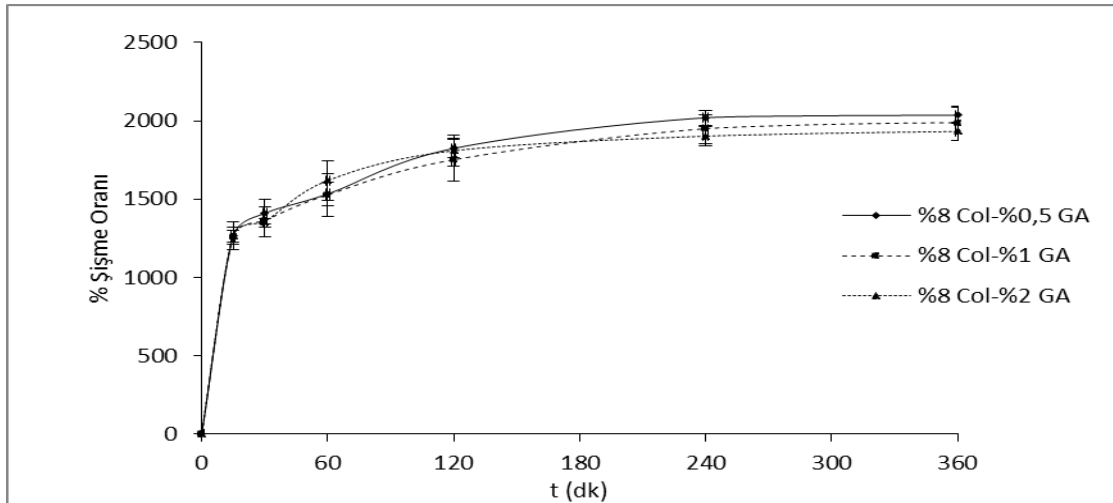
Kriyojellerin su tutabilme yeteneği suyun gözenek ile duvarlar arasındaki difüzyonuna bağlıdır ve doku mühendisliği için önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada üretilen kollajen temelli kriyojel doku iskelelerinin tümü şişme özelliğine sahiptir. Seçilen kuru haldeki kriyojeller oda sıcaklığında sulu ortama yerleştirilmiş ve 15, 30, 60, 120, 240 ve 360. dakikada şişme özellikleri gözlenmiştir. 30 dakikaya kadar hızla su alan kriyojeller 360 dakika sonra dengeye ulaşmışlardır. Yapılan çalışmada Şekil 4.10 ile Şekil 4.11' de kriyojellerin şişme davranışları sunulmuştur.

Şekil 4.10' da görüldüğü gibi sabit %0.5 GA konsantrasyonunda kollajen konsantrasyonu arttıkça şişme oranının düştüğü gözlenmektedir. %3, %6 ve %8 kollajen konsantrasyonundaki kriyojel doku iskelelerinin şişme oranları sırasıyla % 4292.38 \pm 446.68, 2664.89 \pm 227.85 ve 2036.27 \pm 51.95' dir (n=3). Van Vlierberghe ve ark., yaptığı çalışmada sabit çapraz bağlayıcı miktarında artan polimer konsantrasyonu ile şişme oranının düştüğü belirtilmiştir (Van Vlierberghe ve ark., 2006). Artan kollajen konsantrasyonu ile çapraz bağlanabilen grupların sayısı artarken daha sert yapıda kriyojeller elde edilmiştir. Buna neden olarak sert yapıda olan ve duvar kalınlığı artan kriyojellerin daha az şişme oranına sahip olduğu belirtilmiştir (Mu ve ark., 2010; Lozinsky ve ark., 2003).



Şekil 4.10. Sabit GA (%0.5) konsantrasyonunda artan kollajen konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin şişme oranının karşılaştırılması

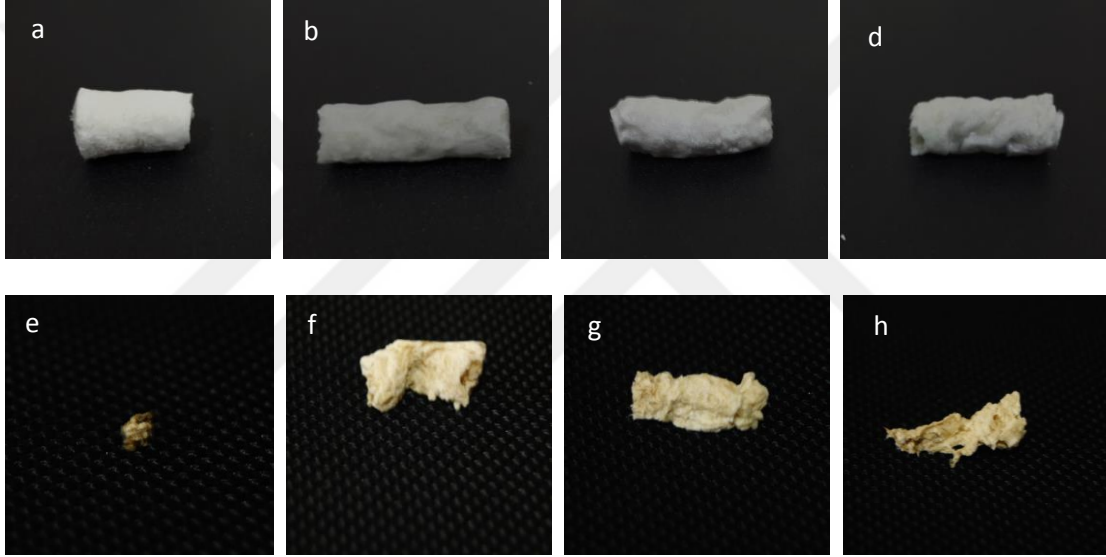
Sunulan Şekil 4.11' de sabit kollajen (%8) konsantrasyonunda artan GA konsantrasyonlarında üretilen kollajen kriyojellerin şişme oranları sırasıyla % 2036 ± 51 , 1985 ± 109 ve 1932 ± 58 'dir ($n=3$). Sabit kollajen konsantrasyonunda çapraz bağlayıcının konsantrasyonunun artması doku iskelesinin yapısındaki hidrofilik grupların azalması nedeniyle düşük GA konsantrasyonuna göre daha az su tutmasına neden olmaktadır (Ma ve ark., 2003; Dainak ve ark., 2009). Sabit kollajen konsantrasyonunda GA konsantrasyonu arttıkça kriyojellerin gözenek çapları azalmakta ve Çizelge 4.3' de verilen sonuçlar ile desteklenmektedir (Ma ve ark., 2003).



Şekil 4.11. Sabit kollajen (%8) konsantrasyonunda artan GA konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin şişme oranının karşılaştırılması

4.2.4. In Vitro Degredasyon Profillerinin İncelenmesi

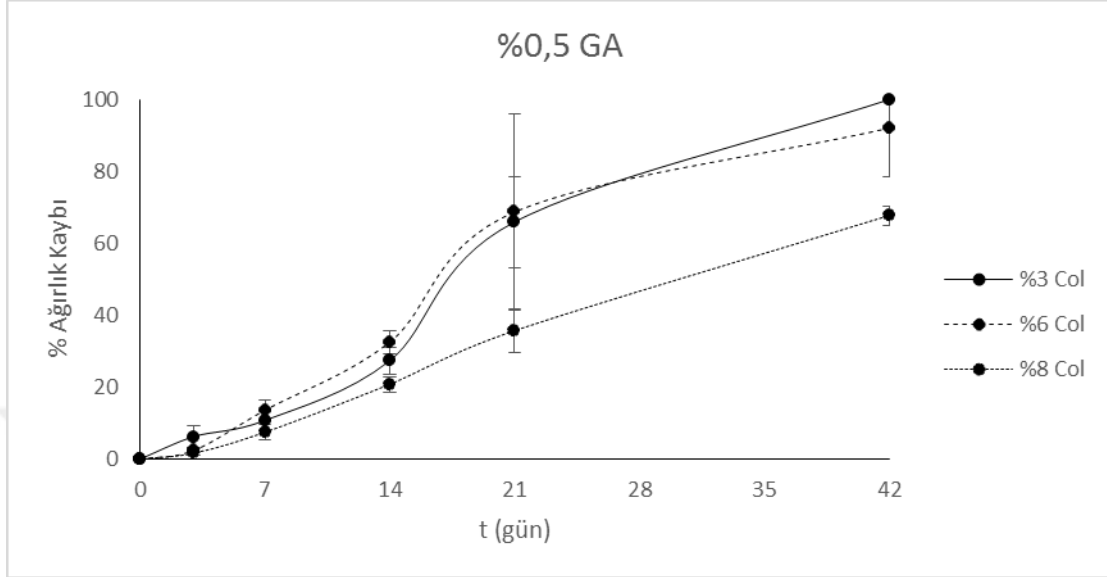
Degradasyon ve mekanik dayanım implant ve ilaç salımı uygulamalarında doku mühendisliği için önemli parametrelerden biridir. Degradasyon sürecinde doku iskelesi bozunmaya uğrayarak kütle kaybı gerçekleşmekte ve yeniden doku oluşumu için olanak sağlanmaktadır (Dhandayuthapani ve ark., 2011). Bu çalışmada kollajen kriyojel doku iskelelerinin 3, 7, 21 ve 42. günlerde degradasyon süreci incelenmiş ve degradasyon öncesi ve sonrası görüntüleri Şekil 4.12' de ve sabit kollajen konsantrasyonu ile sabit çapraz bağlayıcı (GA) konsantrasyonunda üretilen kriyojellerin degradasyon profillerinin değişim grafiği Şekil 4.13 ile Şekil 4.14' de sunulmuştur.



Şekil 4.12. Kriyojellerin degradasyon öncesi görüntüleri a) %6 Col-%0.5 GA, b) %8 Col-%0.5 GA, c) %8 Col-%1 GA, d) %8 Col-%2 GA, Kriyojellerin degradasyon sonrası görüntüleri e) %6 Col-%0.5 GA, f) %8 Col-%0.5 GA, g) %8 Col-%1 GA, h) %8 Col-%2

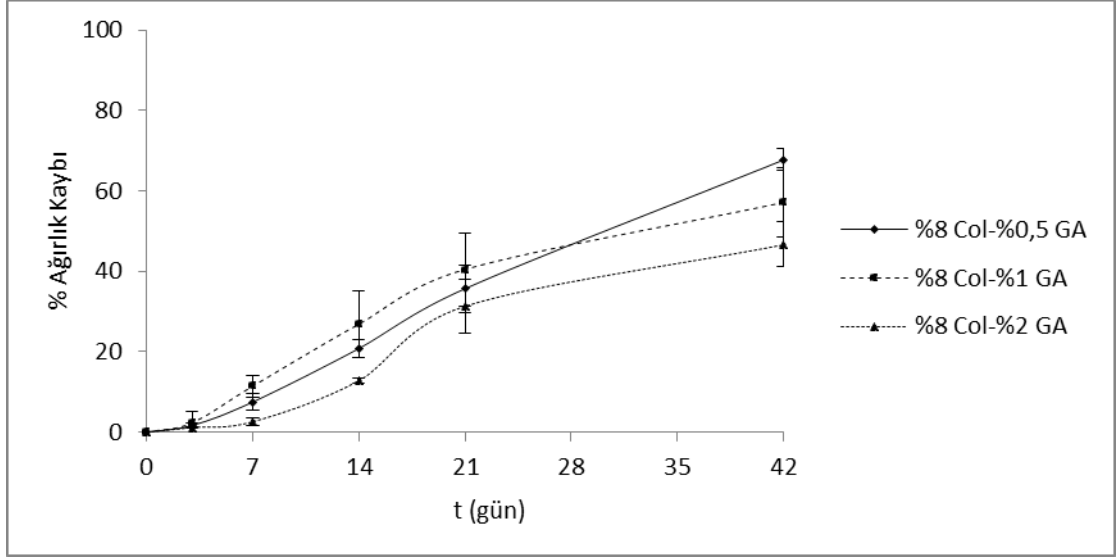
Sabit GA (%0.5) konsantrasyonu ve artan kollajen konsantrasyonunda üretilen kriyojellerin degradasyon profilleri incelendiğinde ağırlık kaybı grafikleri Şekil 4.13' de görülmektedir. %3 kollajen konsantrasyonunda üretilen kriyojel doku iskelesinin 42 gün sonunda ağırlık kaybı %100 iken, %6 ve %8 kollajen konsantrasyonunda üretilen kriyojellerin ağırlık kayıpları sırasıyla 92.08 ± 13.71 ve 67.68 ± 2.74 'dir. Thein-Han ve ark., yaptığı çalışmada sabit çapraz bağlayıcı miktarında artan polimer konsantrasyonu ile ağırlık kaybının düştüğü belirtilmiştir (Thein-Han ve ark., 2009). Şişme çalışmaları ve duvar kalınlığı SEM görüntüleri incelendiğinde, şişme oranı

yüksek olan ve duvar kalınlığı az olan kriyojellerin daha hızlı degrede oldukları görülmektedir.



Şekil 4.13. Sabit GA (%0.5) konsantrasyonunda artan kollajen konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin degradasyon oranının karşılaştırılması

Sabit kollajen konsantrasyonunda çapraz bağlayıcı (GA) konsantrasyonu arttırılarak üretilen kriyojellerin degradasyon profilleri ise Şekil 4.14' de sunulmuştur. %0.5, %1 ve %2 GA konsantrasyonunda üretilen kriyojellerin ağırlık kaybı sırasıyla % 67.68 ± 2.74, %56.98 ± 8.59 ve %46.67 ± 5.59' dir. Bu sonuçlar incelendiğinde çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça ağırlık kaybının azaldığı görülmektedir. Buna neden olarak çapraz bağlayıcının artmasıyla kriyojelin stabilitesinin artmasıdır. Ma ve ark., yaptığı kollajen/kitosan temelli doku iskelesi çalışmasında da GA kullanılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir (Ma ve ark., 2003). Şişme oranları ve gözenek çaplarının incelendiği Şekil 4.11 ve Çizelge 4.2' de ki sonuçlarla, kriyojellerin sabit kollajen konsantrasyonunda artan çapraz bağlayıcı konsantrasyonuna bağlı olarak ağırlık kaybının azaldığı sonuçlar birbirini desteklemektedir.



Şekil 4.14. Sabit kollajen (%8) konsantrasyonunda artan GA konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin degradasyon oranlarının karşılaştırılması

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Son yıllarda gelişen insan vücudundaki dokuların ve organların yenilenmesi için olanak sağlayan doku mühendisliği birçok hastalık durumu için yeni tedavi alanları sunmaktadır. Doku mühendisliğinde istenilen dokuyu oluşturabilecek işlevselliğe sahip hücreler uygun bir malzemeden hazırlanan doku iskeleleri ve büyüme/farklılaşma faktörleri ile bir araya getirilerek yeni doku oluşumuna olanak sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında köpek balığı derisinden doğal polimer olan kollajen izole edilmiş, bu izole kollajenden kriyojelasyon yöntemi ile doku iskelesi üretilmiş ve bu doku iskelelerinin özellikleri karakterize edilmiştir.

Kullanımı olmayan köpek balığı derisi, bu çalışma kapsamında bir takım proselere tabi tutularak, içerisindeki kollajen doğal polimeri izole edilmiş ve özellikleri FTIR, UV-Vis spektrofotometre, SEM ve zeta potansiyel ölçümü ile ortaya koyulmuştur. Burada köpek balığı derisinin kuru ağırlığına göre ASC ve PSC için kollajen verimi hesaplanmış olup sırasıyla %14.53 ve %2.42 bulunmuştur.

Köpek balığı derisinden elde edilen kollajenin FTIR spektrumu literatürde mevcut olan bilgilere dayanılarak, diğer balık türlerinden izole edilen kollajenin spektrumu ile benzer bulunmuştur. ASC ve PSC için N-H grupları ve hidrojen gruplarının temsil eden Amit A grubu sırasıyla 3314.82 cm^{-1} ve 3315.81 cm^{-1} dalga boyunda görülmüştür. CH_2 ' nin asimetrik uzamasını temsil eden Amit B grubu ise sırasıyla 2940.72 cm^{-1} ve 2940.8 cm^{-1} dalga boyunda bulunmuştur. Amit I grubunun dalga boyunda değişen karakteristik frekansları 1600.00 cm^{-1} ve 1700.00 cm^{-1} iken, yapılan çalışmada sırasıyla 1652.10 cm^{-1} ve 1658.30 cm^{-1} dalga boylarında görülmüştür. Bunun nedeni olarak polipeptid boyunca karbonil gruplarının uzaması gösterilmiştir. ASC ve PSC için amit II grubu sırasıyla 1550.21 cm^{-1} ve 1552.90 cm^{-1} , amit III grubunun ise dalga boyu sırasıyla 1238.64 cm^{-1} ve 1239.16 cm^{-1} 'dir. Amit II ve amit III grupları sırasıyla N-H bükülme titreşimlerini ve C-H uzamalarını temsil etmektedir. Ayrıca Amit II grubunun 1548 cm^{-1} dalga boyunda varlığını göstermesi N-H bükülme titreşimleri ile CN uzama titreşiminden olduğu, amit III grubunun 1204.81 cm^{-1} dalga boyu ve 1453.99 cm^{-1} dalga boyu arası kollajendeki sarmal yapıları göstermektedir. ASC ve PSC arasında bu dalga boyları göz önüne alındığında pepsin hidrolizi görünüşünün PSC' ye ait üçlü sarmal yapı üzerinde belirgin bir etkisinin olduğu görülmüştür.

Köpek balığı derisinden elde edilen kollajenin yapısındaki tirozin ve fenilalanine duyarlı kromoforların 251 ve 283 nm de UV ışığını absorbe ettiği görülmektedir. Ayrıca 280 nm' de absorbe edilmiş düşük miktarda tirozinin olduğu belirlenmiştir. ASC ve PSC için UV-Vis spektrumları 230 nm ile 240 nm arasındaki bölgede yüksek yoğunluk ve saflıkta elde edilmiştir. Ayrıca UV-Vis spektrumları sonucunda izole edilen kollajenin protein yapısında olduğu kanıtlanmıştır.

ASC ve PSC için farklı pH değerlerin zeta potansiyelinde sıfır yüzeyinde net yük sırasıyla pH 4.8 ve 5.9 da gözlenmiştir. Buna bağlı olarak sulu bir sistemdeki proteinde pozitif yükler ve negatif yükler birbirini dengelediklerinde (izoelektrik nokta) sıfır yüke sahip oldukları sonucu doğrulanmıştır.

İzole edilen kollajenin SEM görüntüleri sonucunda ASC ve PSC için sırasıyla gözenek dağılımları 61.071 ± 27.51 ve 50.308 ± 22.89 μm bulunmuş, kollajenin gözenekli yapısı ortaya konulmuştur.

Köpek balığı derisinden izole edilen kollajenden kriyojelasyon yöntemi ile doku iskeleleri üretilmiş ve çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehit kullanılmıştır. Bu çalışmada farklı kollajen ile gluteraldehit konsantrasyonları çalışarak deneyler tamamlanmıştır. Doku mühendisliği için uygun kriyojeller belirlenerek, yapısal özellikleri için FTIR, morfolojik özellikleri için SEM analizi yapılmış, doku iskelesinin belirleyici faktörleri olan şişme ve degradasyon çalışmaları incelenmiştir.

Kollajen kriyojellerin üretiminde çapraz bağlayıcı olarak kullanılan GA; kollajenin serbest amino grupları arasında köprü kurarak kollajenin aldehit grupla çapraz bağlanmasını sağlamaktadır. FTIR analizi ile; bu reaksiyon sonucu meydana gelen C=N (Schiff bazı) bağı 1655 cm^{-1} dalga boyunda görülmüş ve Amit I grubunun karakteristik frekanslarının 1600.00 cm^{-1} ve 1700.00 cm^{-1} dalga boyunda geniş dağılımının bu piki maskeleyiği belirtilmiştir. Sabit kollajen konsantrasyonunda GA konsantrasyonunun değiştirilmesiyle üretilen kriyojellerde karakteristik piklerin değişmediği ve üçlü heliks yapının bozulmadığı görülmüştür. Benzer şekilde 1600 cm^{-1} dalga boyundaki pikte NH_2 gruplarının azalmasına neden olarak; aldehit grupları ve kollajenin hidroksilinin yan grupları ya da lizinin e-amino grubu arasında Schiff bazın C=N gruplarına dönüştüğü belirlenmiştir.

SEM analizi ile; sabit %0.5 GA konsantrasyonunda %3, %6 ve %8 kollajen konsantrasyonunda üretilen kriyojellerin gözenek yapıları ve duvar kalınlıkları incelenmiştir. %3, %6 ve %8 kollajen konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin gözenek çapları sırasıyla 123.302 ± 35.08 , 145.79 ± 49.37 ve 217.4 ± 63.96 μm , duvar kalınlıkları ise 0.96 ± 0.06 , 1.38 ± 0.09 ve 1.71 ± 0.09 μm olarak ölçülmüştür (n=3). Burada artan kollajen konsantrasyonuna bağlı olarak gözenek çapının arttığı gözlenmektedir. Sabit çapraz bağlayıcı ve artan kollajen konsantrasyonunda üretilen kriyojellerde çapraz bağlanabilir grupların artması nedeniyle kriyojel gözenekliliğinin arttığı düşünülmektedir. Sabit %8 kollajen konsantrasyonunda %0.5, %1 ve %2 GA konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin gözenek çapları sırasıyla $217,4 \pm 63,96$, 180.88 ± 73.31 ve 157.21 ± 32.05 μm olarak ölçülmüş ve artan gluteralehit konsantrasyonuna bağlı olarak gözenek çapının azaldığı gözlenmiştir. Kollajen kriyojellerin duvar kalınlıkları ise; %0.5, %1 ve %2 GA konsantrasyonlarına sahip kriyojeller için sırasıyla 1.72 ± 0.09 , 0.07 ± 0.03 ve 1.61 ± 0.04 μm olarak ölçülmüştür. GA konsantrasyonu arttıkça duvar kalınlığında çok fazla değişimin olmadığı görülmüştür.

Seçilen kuru haldeki kriyojeller oda sıcaklığında sulu ortama yerleştirilmiş ve 15, 30, 60, 120, 240 ve 360. dakikada şişme özellikleri gözlenmiştir. Sabit %0.5 GA konsantrasyonu için %3, %6 ve %8 kollajen konsantrasyonlarında üretilen kriyojellerin şişme oranları sırasıyla $\% 4292.38 \pm 446.68$, 2664.89 ± 227.85 ve 2036.27 ± 51.95 ' dir(n=3). Kriyojellerde, kollajen konsantrasyonu arttıkça şişme oranının düştüğü gözlenmiştir. Sert yapıda olan ve duvar kalınlığı artan kriyojellerin daha az şişme oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Sabit %8 kollajen konsantrasyonu için %0.5, %1 ve %2 GA konsantrasyonunda üretilen kollajen kriyojellerin şişme oranları sırasıyla $\% 2036 \pm 51$, 1985 ± 109 ve 1932 ± 58 'dir (n=3). Çapraz bağlayıcının konsantrasyonunun artması nedeniyle doku iskelesinin yapısındaki hidrofilik grupların ve gözenek çapları azalması sonucu yüksek GA konsantrasyonuna sahip kriyojellerin daha az su tuttuğu görülmüştür.

Kollajen kriyojellerin degradasyon profilleri 3, 7, 21 ve 42. günlerinde incelenmiştir. Sabit GA konsantrasyonunda ve artan kollajen konsantrasyonunda üretilen kriyojeller için 42 gün sonunda ağırlık kaybı sırasıyla $\%100$, $\%92.08 \pm 13.71$ ve $\% 67.68 \pm 2.74$ 'dir. Şişme çalışmaları ve duvar kalınlığı SEM görüntüleri

incelendiğinde, şişme oranı yüksek olan ve duvar kalınlığı az olan kriyojellerin daha hızlı degrede oldukları görülmektedir. Sabit kollajen konsantrasyonunda çapraz bağlayıcı (GA) konsantrasyonu arttırılarak üretilen kriyojellerin ağırlık kaybı ise sırasıyla % 67.68 ± 2.74 , % 56.98 ± 8.59 ve % 46.67 ± 5.59 ' dir. Bu sonuçlar incelendiğinde çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça ağırlık kaybının azaldığı görülmüş. buna neden olarak çapraz bağlayıcının artmasıyla kriyojelin stabilitesinin artması gösterilmiştir. Şişme oranları ve gözenek çaplarının incelendiği sonuçlarla, kriyojellerin sabit kollajen konsantrasyonunda artan çapraz bağlayıcı konsantrasyonuna bağlı olarak ağırlık kaybının azaldığı sonuçlar birbirini desteklemiştir.



KAYNAKLAR

Agrawal, C.M. and Ray, R.B., ‘Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering’, J. Biomed. Mater. Res., 55: 141–150, (2001)

Akdemir Z. S., ‘Doku Mühendisliğinde Kullanılacak Yeni Polimerik Biyomalzemelerin Geliştirilmesi’, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya Programı , Doktora Tezi, (2009).

Akman, A. C., ‘Periodontal Doku Mühendisliği Uygulamaları İçin Kitosan Temelli Doku İskelelerinin Üretilmesi, Kemik Morfojenik Protein-2 (Bmp-2), Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (Bfgf), Deksametazon (Dex) Salım Kinetiklerinin Ve İn Vitro Etkinliklerinin Tayini’, Hacettepe Üniversitesi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, (2007).

Alberts, B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson JD., ‘Molecular biology of the cell, Garland’, New York, 971-995, (1994).

Berth F., ‘Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications’, Materials, 1863-1887, (2010).

Beşkardeş, I. G., ‘Biyoseramik Ve Biyosinyal Moleküllerle Desteklenmiş Poli(Kaprolakton) Doku İskeleleri: Sentez, Karakterizasyon Ve Kemik Doku Mühendisliği Uygulamaları’, Hacettepe Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, (2008).

Biçen Ö., ‘Moleküler Baskılanmış Polimer Tabanlı Kriyojel Ayırma Sistemleri ve Biyo-ayırma Uygulamaları’, Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim dalı, Eskişehir, 2009

Bölgen, N., ‘Hema-Laktat-Dekstran Kriyojellerin Üretimi ve Doku Mühendisliğinde Uygulamaları’, Hacettepe Üniversitesi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, (2008).

Uleryi B. D., Nair, L. S. and Laurencin C. T., ‘Biomedical Applications of Biodegradable Polymers’, J Polym Sci B Polym Phys, 49(12): 832–864, (2011). doi:10.1002/polb.22259.

Chen Q., Bruyneel A, Carr C and Czernuszka J.O, ‘Bio-mechanical Properties of Novel Bi-layer Collagen-Elastin Scaffolds for Heart Valve Tissue Engineering’, *Procedia Engineering*, 59: 247 – 254, (2013).

Christenson, E. M., Anseth, K. S., Jeroen, J. P., Chan, C. K., Ercan, B. And Jansen, J. A., ‘Nanobiomaterial Applications in Orthopedics’ *Journal of Orthopaedic Research*, 25, 11–22, (2007).

Chung, C. and Burdick, J.A., ‘Engineering Cartilage Tissue’, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 243–262, (2008).

Çabuk, M., ‘Bazı Biyobozunur Polimerlerin Modifikasyonu, Karakterizasyonu ve Elektroeolojik Özelliklerinin İncelenmesi’, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, (2012).

Dainiak M.B., Allan I.U , Savina I. N., Cornelio L, James E.S., James S.L., Mikhalovsky S.V., Jungvid H, and Galaev I.U., ‘Gelatin–Fibrinogen Cryogel Dermal Matrices for Wound Repair: Preparation, Optimisation and in Vitro Study’, *Biomaterials* 31 67–76, (2010).

Dan, Li. and Xia, Y., ‘Electrospinning of Nanofibers Reinventing The Wheel’, *Advanced Materials*, 16 (14), 1151-1170, (2004).

De Franceschi, L., Grigolo, B., Roseti, L., Facchini, A., Fini, M., Giavaresi, G., Tschon, M., Giardino, R., ‘Transplantation of Chondrocytes Seeded on Collagen-Based Scaffold in Cartilage Defects in Rabbits’, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 75, 612–622, (2005).

Demirbilek, M., ‘Sinir Doku Onarımı için Polimerik Nanofiber Doku İskeleleri’, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Doktora Tezi, (2011).

Dhandayuthapani B., Yoshida Y., Maekawa T. and Kumar D. S., ‘Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review’, Hindawi Publishing Corporation *International Journal of Polymer Science*, Article ID 290602, 19 pages, (2011) doi:10.1155/2011/290602

Dvir, T., Timko, B.P., Kohane, D.S. and Langer, R., ‘Nanotechnological Strategies For Engineering Complex Tissue’, *Nature Nanotechnology*, 6, 13-22, (2011).

Duan, X., McLaughlin, C., Griffith, M., Sheardown, H. Biofunctionalization of collagen for improved biological response: scaffolds for corneal tissue engineering. *Biomaterial*, 28, 78-88, (2007).

Ebnesajjad, S., ‘Handbook of biopolymers and biodegradable plastics properties, processing and applications’, Oxford: William Andrew, (2012).

Emin N., ‘İzole Edilmiş Sığan Kondrositleri ve Polimerik Biyomalzemelerin Kullanımıyla Kıkırdak Doku Mühendisliği’, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, (2006).

Gümüşderelioğlu, M., ‘Ekim, Doku Mühendisliğinde Nanoteknoloji’, Bilim ve Teknik Özel Eki, Tübitak Yayınları, (2007).

Gorgieva, S. And Kokol, V., ‘Collagen,-vs. Gelatine-Based Materials and Their Biocompatibility: Rewiev and Perspectives’, Biomaterials Applications for Nanomedicine, ISBN 978-953-307-661-4 (2011).

Hu, Y., Zhang, Q., You, R., Wang, L., and Li, M., ‘The Relationship between Secondary Structure and Biodegradation Behavior of Silk Fibroin Scaffolds. National Engineering Laboratory for Modern Silk, College of Textile and Clothing Engineering’, Soochow University, Industrial Park, Suzhou, China. (2012).

Huang Y, Shiau C, Chen H , Huang B., ‘Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*)’, Food Hydrocolloids, 25: 1507-1513, (2011).

Ikada, Y., ‘Challenges in tissue engineering’, Journal of the Royal Society Interface, 22,589-601, (2006).

Inoue, T., Toda, S. and Narisawa, Y., ‘Sugihara, H. Subcutaneous Adipocytes Promote The Differentiation of Squamous Cell Carcinoma Cell Line (DJM-1) in Collagen Gel Matrix Culture’, J.Invest. Dermatol, 117, 244–250, (2001).

İnci İ., ‘Kalvaryal Defektlerin Onarımında Jelatin/Hidroksiapatit Esaslı Kriyojel Doku İskelelerinin Etkisi’, Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Doktora Tezi, (2012).

Jansen R.G., Kuppevelt T.H., Daamen W.F., Kuijpers-Jagtman A.M. and Von den Hoff J.W., ‘Tissue Reactions to Collagen Scaffolds in The Oral Mucosa and Skin of Rats’ Archives of Oral Biology, 53 : 376 – 387 , (2008).

Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., and Tanaka, M., ‘Isolation and Characterisation of Collagen from Bigeye Snapper (*Priacanthus Marcacanthus*) Skin’, Journal of the Science of Food and Agriculture, 85, 1203–1210, (2005).

Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., and Tanaka, M., ‘Isolation And Characterisation of Acid and Pepsin-Solubilised Collagens from The Skin of Brownstripe Red Snapper (*Lutjanus Vitta*)’. Food Chemistry, 93, 475–484, (2005).

Karahaliloğlu, Z., ‘Nanofibriler Yapıda Biyopolimerik Doku İskelelerinin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu’, Hacettepe Üniversitesi, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji Ve Nanotıp Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, (2009).

Kittiphattanabawon P., Benjakul S., Visessanguan W. and Shahidi, F., ‘Isolation and Properties of Acid- and Pepsin-Soluble Kollagen from the Skin of Blacktip Shark (*Carcharhinus limbatus*)’, *Eur Food Res Technol* 2010. 230: 475-483

Kittiphattanabawon P., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H. and Shahidi F., ‘Isolation and Characterisation of Collagen from the Skin of Brownbanded Bamboo Shark (*Chiloscyllium punctatum*)’, *Food Chemistry*, 119: 1519–1526, (2010).

Koduri, S., Goldberg, R.P., Kwon, C., Dobrez, D.G., and Sand, P.K., ‘Factors Influencing the Longterm Success of Periurethral Collagen Therapy in the Office’, *Int. Urogynecol. J. Pelvic. Floor. Dysfunct*, 17, 346–351, (2006).

Koshy, S.T., Ferrante, T.C., Lewin, S.A. and Mooney, D.J., ‘Injectable, Porous, And Cell-Responsive Gelatin Cryogels’, *Biomaterials*, 35: 2477-2487, (2014).

Kurtalan, S., ‘İyon İmplantasyonu İle Modifiye Edilmiş Elektroeğirme Yöntemiyle Elde Edilen Doku İskelelerinin Hücre Çoğalmasına Etkilerinin Araştırılması’, Ege Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, (2013).

Langer R, Vacanti JP., ‘Tissue Engineering. Science’, 260(5110):920-926, (1993).

Lendlein, A., Weigel, T. and Schinkel, G., ‘Design and Preparation of Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering’, *Expert Review of Medical Devices*, 3 (6), 835-851, (2006).

Li Z., Wang B., Chi C., Zhang Q., Gong Y., Tang J., Luo H., Ding G., ‘Isolation and Characterization of Acid Soluble Collagens and Pepsin Soluble Collagens from The Skin and Bone of Spanish Mackerel (*Scomberomorus Nipponius*)’, *Food Hydrocolloids*, 31: 103-113, (2013).

Liu, YK and Liu DC., ‘Comparison of Physical – Chemical Properties of Type I Collagen from Different Species’, *Food Chem.*, 99: 244-251, (2006).

Liu, H. Y., Li, D., and Guo, S. D., ‘ Studies on Collagen from the Skin of Channel Catfish (*Ictalurus Punctatus*)’, *Food Chemistry*, 101, 621-625, (2007).

Liu, X. and Ma, P. X., ‘Polymeric Scaffolds For Bone Tissue Engineering’, *Annals of Biomedical Engineering*, 32 (3), 477–486, (2004).

Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H. and Mattiasson B., 'Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest', Trends in Biotechnology, Review, Vol.21 No.10, (2003).

Lozinsky, I. V., Galaev, Y. I., Plieva, M. F., Savina, I. N., Jungvid, H., and Mattiasson, B., 'Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest', Trends in Biotechnology, 21, 445-451, (2003),

Ma, L., Gao C.,*, Mao, Z., Zhou, J., Shen, J., Hu, X., Han, C., 'Collagen/Chitosan Porous Scaffolds with Improved Biostability for Skin Tissue Engineering', Biomaterials 24: 4833–4841, (2003).

Maeda, M., Tani, S., Sano, A., Fujioka, K., 'Microstructure And Release Characteristics Of The Minipellet, A Collagen-Based Drug Delivery System For Controlled Release Of Protein Drugs', Journal of Controlled Release 62: 313–324, (1999).

Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand M.J., and Waldron, K.C. 'Glutaraldehyde: Behavior in Aqueous Solution, Reaction with Proteins, and Application To Enzyme Crosslinking', BioTechniques, Review, 37:790-802 (2004).

Mikos, A. and Sarakinos, G.S.L., 'Laminated Three-Dimensional Biodegradable Foams For Use in Tissue Engineering', Biomaterials 14, 323-330, (1993).

Mikos, A.G. and Temenoff, J.S., 'Formation of Highly Porous Biodegradable Scaffolds for Tissue Engineering', EJB Electronic Journal of Biotechnology 3 (2), (2000).

Moroni, L, De Wijn, JR. and Van Blitterswijk, CA., 'Integrating Novel Technologies to Fabricate Smart Scaffolds', Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 19(5): 543-572, (2008).

Mu, C., Liu, F., Cheng, Q., Li, H., Wu, B., Zhang G. and Lin W., 'Collagen Cryogel Cross-Linked by Dialdehyde Starch Macromol', Mater. Eng., 295, 100–107, (2010).

Nagai, T., Yamashita, E., Taniguchi, K., Kanamori, N. and Suzuki, N., 'Isolation and Characterization of Collagen from the Outer Skin Waste Material of Cuttlefish (Sepia Lycidas)', Food Chem. 72:425–429, (2001).

Nakahara, T., Nakamura, T., Kobayashi, E., Kuremoto, K. and Matsuno, T., 'In Situ Tissue Engineering of Periodontal Tissues by Seeding with Periodontal Ligament-Derived Cells'. Tissue Engineering, 10,537-44, (2004).

Nerem R. M., ‘Cellular Engineering’, Biomedical Engineering Society Annual Meeting, Atlanta, (1991).

O’Brien, F. J., ‘Biomaterials & Scaffolds For Tissue Engineering’, *Materials Today*, 14 (3), 88-95, (2011).

Okoshi, T. and Noishiki, Y., ‘Encyclopedic Handbook Of Biomaterials And Bioengineering’, Part B: Applications, Vol. 2, 1154-1156p, (1995).

Öncel, P., ‘İlaç Salımı İçin Moleküler Baskılanmış Kriyojel Membranlar’, Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, (2013).

Özdemir, E., ‘Biyobozunur Ve Enjekte Edilebilir Polimerik İlaç Salım Sistemlerinin Dizaynı Ve Sol-Jel Geçiş Özelliklerinin İncelenmesi’, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Mühendislik Tezi, (2006).

Pachance, J.M., Kohn, J., Lanza, R.P., Langer, R., Vacanti, J. (Eds.), ‘Biodegradable Polymers. Principles Of Tissue Engineering’, 2nd Edition., Academic Pres, California. Pp. 251-262, (2000).

Parenteau-Bareil R., Gauvin R. And Berthod F., ‘Collagen-Based Biomaterials For Tissue Engineering Applications’, *Materials* 1863-1887, (2010).

Peppas, N.A. and Langer, R.I., ‘New Challenges In Biomaterials’, *Science*, 263,1715-1720, (1994).

Phanat K., ‘Characterisation Of Acid Soluble Collagen From Skin’, Bone Of Bigeye Snapper, Prince Of Songkla University, Thaliand, (2004).

Prabjeet, S., Soottawat, B., Sajid, M., Hideki, K., ‘Isolation and Characterisation of Collagen Extracted from the Skin of Striped Catfish (Pangasianodon Hypophthalmus)’. *Food Chemistry*, 124: 97–105, (2011).

Priya, S.G., Jungvid, H. And Kumar, A., ‘Skin Tissue Engineering for Tissue Repair and Regeneration’, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14, 105-18, (2008).

Quinlan, E., Thompson, E.M., Matsiko, A., Q’Brien F.J. And Lopez-Noriega A., ‘Long-Termcontrolled Delivery of Rhbmp-2 From Collagen–Hydroxyapatite Scaffolds For Superior Bone Tissue Regeneration’ *Journal Of Controlled Release*, 207: 112–119, (2015).

Ramshaw, J.A.M., Werkmeister J.A. and Glattauer V., ‘Collagen-Based Biomaterials’, *Biotechnology And Genetic Engineering Rewiews*, Vol. 13, (1995).

Rodrigues, S.C, Salgado, C. L., Sahu, A., Garcia, M.P, Fernandes, M.H. and Monteiro, F. J., 'Preparation And Characterization Of Collagen-Nanohydroxyapatite Biocomposite Scaffolds By Cryogelation Method For Bone Tissue Engineering Applications', *Journal Of Biomedical Materials, Research A*, Vol 101a, Issue 4, (2013)

Sacholos, E. And Czernuszka, J.T., 'Making Tissue Engineering Scaffold Work. Review On The Application Of Solid Freeform Fabrication Technology To The Production Of Tissue Engineering Scaffolds', *Eur. Cell.Mater.*, 5, 29-40, (2003)

Salgado, AJ, Coutinho, O and Reis, RL., 'Bone Tissue Engineering:State Of The Art And Future Trends', *Macromolecular Bioscience*, 4:743-65, (2004).

Sharma, A., Bhat, S., Nayak, V. and Kumar A., 'Efficacy Of Supermacroporous Poly(Ethylene Glycol)-Gelatin Cryogel Matrix For Soft Tissue Engineering Applications'. *Materials Science And Engineering, C* 47: 298-312, (2015).

Senaratne, L.S., Park P. and Kim S., 'Isolation And Characterization Of Collagen From Brown Backed Toadfish (*Lagocephalus Gloveri*) Skin'. *Bioresource Technology*, 97: 191-197, (2006).

Singh, P., Banjakul, S., Maqsood S. and Kishimura H., 'Isolation and Characterisation of Collagen Extracted from the Skin of Striped Catfish (*Pangasianodon Hypophthalmus*)'. *Food Chemistry*, 124: 97-105, (2010).

Sinthusamran, S., Banjakul, S. and Kishimura, H., 'Comparative Study On Molecular Characteristics Of Acid Soluble Collagens From Skin And Swim Bladder Of Seabass (*Lates Calcarifer*)', *Food Chemistry*, 138: 2435-2441, (2013).

Song, E. and Kim, S.Y., Chun, T., Byunh., Lee, Y.M., 'Collagen Scaffolds Derived From A Marine Source And Their Biocompatibility', *Biomaterials*, 27: 2951-2961, (2006).

Subia, B., Kundu, J., And Kundu, S. C., 'Biomaterial Scaffold Fabrication Techniques For Potential Tissue Engineering Applications', *Department Of Biotechnology, Indian Institute Of Technology, Kharagpur, India* (2010)

Sultana, N. And Wang, M., 'PHBV/PLLA-Based Composite Scaffolds Fabricated Using An Emulsion Freezing/Freeze-Drying Technique For Bone Tissue Engineering: Surface Modification And In Vitro Biological Evaluation', *Biofabrication*, 4, 1-14, (2012).

Şaşmaz, H. T., ‘Üç-Boyutlu, Biyobozunur/Biyobozunur Olmayan Polimerik Taşıyıcıların Biyosinyallerle Plazma Modifikasyonu Ve Hücre Kültür Uygulamaları’, Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Doktora Tezi, (2007).

Tan, H., Wu, B., Li, C., Mu, C., Li, H., and Lin, W., ‘Collagen Cryogel Cross-Linked By Naturally Derived Dialdehyde Carboxymethyl Cellulose’, Carbohydrate Polymers, (2015). [Http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Carbpol.2015.04.029](http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.029)

Thein-Han, W.W. and Misra, R.D.K., ‘Biomimetic Chitosan–Nanohydroxyapatite Composite Scaffolds For Bone Tissue Engineering’, Acta Biomaterialia, 5: 1182–1197, (2009).

Thomson, R.C., Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. (Eds), ‘Polymer Scaffold Processing Principles Of Tissue Engineering’, Elsevier, San Diego, Pp-309-22, (2000).

Tosun, C.C., ‘Kollagen Bazlı Biyomateryal Üretiminde Valeksin Kullanılabilirliğinin Araştırılması’, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Deri Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, (2014).

Uzunalan, G., ‘Yara-Yanık İyileşmesine Yönelik Gümüş Nano Patikül Yüklü Gözenekli Kollajen Doku İskeleleri Hazırlanması’, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, (2011).

Van Vlierberghe, S., Cnudde, V., Masschaele, B., Dubrue P., De Paepe I., Jacobs, P.J.S., Van Hoorebeke, L., Unger, R., Kirkpatrick, C.J. and Schacht, E.H., ‘Porous Gelatin Cryogels As Cell Delivery Tool In Tissue Engineering’, (2006) [Doi:10.1016/J.Jconrel.2006.09.069](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.09.069)

Wang, L., An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L. and Hu Q., ‘ Isolation And Characterization Of Collagens From The Skin, Scale And Bone Of Deep – Sea Red Fish (Sebastes Mentella)’. Food Chem. 108:616–623, (2008).

Williams, D.F. ‘Definitions In Biomaterials’, Proceedings Of A Consensus Conference Of The European Society For Biomaterials, Chester, England, 3-5, 1986, Vol. 4, (1987).

Xu, T., Molnar, P., Gregory, C., Das, M., Boland, T. and Hickman, J.J., ‘Electrophysiological Characterization Of Embryonic Hippocampal Neurons Cultured In A 3D Collagen Hydrogel’, Biomaterials, 30, 4377–4383, (2009).

Yamasaki, T.; Deie, M.; Shinomiya, R.; Yasunaga, Y.; Yanada, S. and Ochi, M. ‘Transplantation Of Meniscus Regenerated By Tissue Engineering With A Scaffold

Derived From A Rat Meniscus And Mesenchymal Stromal Cells Derived From Rat Bone Marrow', *Artif. Organs* 32, 519–524, (2008).

Zhang, M. and Liu, W., 'Isolation And Characterisation Of Collagens From The Skin Of Largefin Longbarbel Catfish (*Mystus Macropterus*)'. *Food Chemistry*, 115: 826–831, (2009).

Zhang, Q., Lu, H., Kawazoe, Na., Chen, C., 'Preparation Of Collagen Porous Scaffolds With A Gradient Pore Size Structure Using Ice Particulates', *Materials Letters*, 107: 280–283, (2013).

Zhang, M., Liu, W., and Li, G., 'Isolation And Characterisation Of Collagens From The Skin Of Largefin Longbarbel Catfish (*Mystus Macropterus*)'. *Food Chemistry*, 115, 826-831, (2009).

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Zeynep ÇETİNKAYA

Doğum Tarihi: 21/10/1990

Öğrenim Durumu: Lisans

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Fen-Matematik	Cumhuriyet Lisesi (Y.D.A)	2004-2008
Lisans	Kimya Mühendisliği	Mersin Üniversitesi	2009-2013
Yüksek Lisans	Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı	Mersin Üniversitesi	2013 - Devam ediyor

Görevler

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Stajyer	Soda Sanayii A.Ş. (Mersin)	07.2011
Stajyer	Naksan Holding (Gaziantep)	07.2012

Proje

TÜBİTAK 2209-Üniversite öğrencileri Yurt İçi/Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı kapsamında “Balık Derisinden Kollajen İzolasyonu ve Karakterizasyonu”, bütçesi: 1000 TL, 2012-2013