



EGE ÜNİVERSİTESİ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAKTERİYEL SELÜLOZ DOKU İSKELESİ
ÜZERİNDE DAMARLI KEMİK MODELİ
OLUŞTURULMASI**

Ece BAYIR

Tez Danışmanı : Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

**Bilim Dalı Kodu :
Sunuş Tarihi : 22.07.2014**

Bornova-İZMİR

2014

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAKTERİYEL SELÜLOZ DOKU İSKELESİ
ÜZERİNDE DAMARLI KEMİK MODELİ
OLUŞTURULMASI**

Ece BAYIR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu :

Sunuş Tarihi : 22.07.2014

Bornova-İZMİR

2014

Ece BAYIR tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “Bakteriyel Selüloz Doku İskelesi Üzerinde Damarlı Kemik Modeli Oluşturulması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 22.07.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Raportör Üye: Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ

Üye: Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bakteriyel Selüloz Doku İskelesi Üzerinde Damarlı Kemik Modeli Oluşturulması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

22/07/2014

Ece BAYIR

ÖZET**BAKTERİYEL SELÜLOZ DOKU İSKELESİ ÜZERİNDE DAMARLI
KEMİK MODELİ OLUŞTURULMASI**

BAYIR, Ece

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Temmuz 2014, 107 sayfa

Bu tez çalışmasında doğal bir polimer olan bakteriyel selülozdan (BS) poröz üç boyutlu bir doku iskelesi oluşturulması ve osteoblastik benzeri yapıya sahip olan insan osteosarkoma hücreleri (SaOS-2) ile oluşturulan kemik modeli üzerinde, insan endotel progenitör hücreleri (EPC) ve insan umbilikal damar endotel hücreleri (HUVEC) kullanılarak vaskülarizasyonun sağlanması amaçlanmıştır. Normalde 70-120 nm por çaplarına sahip olan BS'nin içerisine hücrelerin girip burada damarlanma sağlayabilmeleri amacıyla bu doku iskelesinin por çapları arttırılmıştır. Kemik mikroçevresinin en iyi şekilde taklit edilmesi için BS iskeleye hidroksiapatit (HAp) kristalleri tutturularak BS-HAp kompoziti oluşturulmuştur. Vaskülarizasyon için en uygun hücre konsantrasyonu ve besi ortamı kompozisyonu belirlendikten sonra, elde edilen uygun por çapındaki BS ve HAp-BS kompoziti üzerinde endotel hücrelerin vaskülarizasyonu sağlanmaya çalışılmıştır. Günümüzde kullanılan kemik greftlerinin dezavantajlarını ortadan kaldırabilmek ve avantajlarını bir araya getirebilmek, ayrıca kemik greftlerinin kullanılabilirliğini arttırmak ve maliyeti azaltmak için doku mühendisliği uygulamaları ile üretilen greftler büyük önem kazanmıştır. Önceden damarlandırılmış kemik greftlerinin iyileşme sürecinin hızlandırdığı ve damarsız greftlere göre daha sağlıklı bir tedavi süreci gerçekleştirdikleri bilinmektedir. Bu amaçla sunulan tez çalışmasının kemik doku mühendisliği alanında ileride yapılacak olan çalışmalara yön vermesi açısından oldukça büyük önem taşıdığı düşünülmektedir.

Anahatar Sözcükler: Vaskülarizasyon, anjiyogenez, üç boyutlu kemik modeli, bakteriyel selüloz, endotel progenitör hücre

ABSTRACT**DESIGNING OF VASCULARISED BONE MODEL ON BACTERIAL
CELLULOSE TISSUE SCAFFOLD**

BAYIR, Ece

MSc in Biomedical Technologies

Supervisor: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

July 2014, 107 pages

In this thesis, it is intended to produce three-dimensional bacterial cellulose (BS) a natural polymer tissue scaffold and vascularize bone model formed by osteoblast like human osteosarcoma cell line (SaOS-2) with human endothelial progenitor cells (EPC) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Normally, BC has 70-120 nm pore size, but pore diameters were increased in order that cells enter into BC for vascularisation. BS-hydroxyapatite (HAp) composite was produced by attaching HAp crystals to BS scaffold with the purpose of mimicking bone microenvironment in the best way. After determining the appropriate cell concentration and culture medium composition for vascularisation, it is tried to vascularise endothelial cells on the BS and BS-HAp composite which have appropriate pore size. Tissue engineered grafts has gained great importance in order to eliminate disadvantages of currently used bone grafts, to combine their advantages, to increase the utilization of the bone graft, and also to reduce their costs. It is known that pre-vascularised bone grafts accelerate the healing process and perform healthier treatment process than normal grafts. The thesis which is performed for this purpose has a great importance for guiding to the future studies in the field of bone tissue engineering.

Keywords: Vascularisation, angiogenesis, three dimensional bone model, bacterial cellulose, endothelial progenitor cell

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilimsel katkıları ile bana her zaman destek olan, hayatın her alanında beniengin bilgi ve tecrübeleri ile aydınlatan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sayın tez danışmanım Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN'a, çalışmam süresince beni yönlendiren, eğitimim süresince bana büyük katkı sağlayan, ihtiyacım olan her anda her türlü desteği ile yanımda olan, her koşulda bana inanan ve güvenen sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ'e, hiçbir zaman bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, çalışmalarım için laboratuvarını kullanmama izin veren, kullanmış olduğum bakteriyel selülozun üretiminde bilgileri ile bana büyük katkı sağlayan, çalışma tarzını kendime örnek edindiğim sevgili hocam Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ'e en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İmmunohistokimyasal ve histolojik boyamalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER'e ve Müjde KIVANÇ'a, laboratuvar olanaklarından yararlanmama izin veren; sayın Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ'a ve tüm Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Kanser Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı çalışanlarına, sayın Prof. Dr. Erdal BEDİR'e ve tüm Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Doğal Ürün Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı çalışanlarına, sayın Prof. Dr. Rengin ELTEM'e ve tüm Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına, sayın Prof. Dr. Meltem CONK DALAY'a ve tüm Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Mikroalgal Teknoloji Laboratuvarı çalışanlarına, sayın Prof. Dr. Murat ELİBOL'a ve başta Ayşe KÖSE olmak üzere tüm Biyomühendislik Bölümü Ege Üniversitesi Biyoproses Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Destek ve yardımlarını benden hiç esirgemeyen başta yüksek biyomühendis Mehmet ÖZGÜN ÖZEN, yüksek biyomühendis Şeyma ÇOĞAN, Dr. Ozan KARAMAN, yüksek biyomühendis Duygu AYYILDIZ TAMİŞ, Şükrü ÖZTÜRK, Cansu GÖRGÜN, Müge ANIL, Mert DUMAN, Cenk ÇELİK, Begüm ZEYBEK olmak üzere tüm Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma ve tüm Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında bana yardımcı olan, desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen, her zaman beni cesaretlendiren ve yanımda olan, birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım Biyomühendis Eyüp BİLGİ'ye her türlü desteği için teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca verdikleri maddi ve manevi destek ile her zaman yanımda olan, bana her koşulda inanan ve güvenen sevgili anneme ve babama, beni her zaman mutlu eden, cesaretlendiren ve destekleyen canım kardeşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

13-FBE-008 nolu proje ile çalışmamı destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü'ne ve TÜBİTAK'a destekleri için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
TABLolar DİZİNİ	xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Kemik Dokusu	3
2.2. Dolaşım Sistemi	4
2.2.1. Kan damarlarının yapıları	5
2.2.2. Kan damarlarının oluşumu	6
2.2.3. Kan damarlarının oluşumunda görevli anjiyogenik faktörler	9
2.2.4. EPC.	14
2.3. Doku Mühendisliği	16
2.3.1. Doku iskeleleri	17
2.3.2. Doku mühendisliğinde damarlandırma yöntemleri	20

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.3. Kemik greftleri	23
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. EPC Hücrelerinin Stoklanması	27
3.1.1. EPC hücrelerinin çözündürülmesi	27
3.1.2. EPC hücrelerinin çoğaltılması ve pasajlanması	28
3.1.3. EPC hücrelerinin dondurulması	29
3.2. HUVEC Hücrelerinin Stoklanması	30
3.2.1. HUVEC hücrelerinin çoğaltılması ve pasajlanması.....	30
3.2.2. HUVEC hücrelerinin dondurulması.....	31
3.3. SaOS-2 Hücrelerinin Stoklanması	32
3.3.1. SaOS-2 hücrelerinin çözündürülmesi.....	32
3.3.2. SaOS-2 hücrelerinin pasajlanması	33
3.3.3. SaOS-2 hücrelerinin dondurulması	33
3.4. Hücrelerin Tutunma Testleri.....	34
3.5. Hücrelerin Kalibrasyon Eğrisinin Çıkarılması.....	35
3.6. Hücrelerin Büyüme Kinetiğinin Çıkarılması	36

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

3.7. SaOS-2 Hücrelerinin Osteojenik Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi	36
3.7.1. Alizarin red S boyama.....	37
3.7.2. Von Kossa boyama	38
3.8. Bakteriyel Selüloz Doku İskelelerinin Hazırlanması.....	39
3.8.1. <i>Acetobacter xylinum</i> ATCC 700178 suşunun aktifleştirilmesi ve BS üretimi.....	39
3.8.2. BS por çaplarının optimizasyonu.....	40
3.8.3. BS yıkama prosedürü ve sterilizasyonu	40
3.8.4. BS karakterizasyonu.....	41
3.9. EPC ve HUVEC Hücrelerinin Vaskülarizasyon Potansiyellerinin İncelenmesi	42
3.9.1. Hücrelerin floresans boya ile boyanması	42
3.9.2. Bazal membran matriks ile kaplanmış kültür kaplarının hazırlanması.....	43
3.9.3. Hücrelerin 3B bazal membran matriks içeren ortamda kültive edilmesi ve tüp oluşum analizi	44
3.10. 3B BS Üzerinde Hücre Kültürü	45
3.10.1. SaOS-2 hücrelerinin 3B BS üzerinde osteojenik farklılaşma potansiyellerinin incelenmesi.....	45

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

3.10.2. EPC, HUVEC ve SaOS-2 hücrelerinin 3B BS üzerine ekimi	45
3.10.3. SEM analizi.....	46
3.10.4. 3B BS üzerinde kültürü yapılan hücreler için immunohistokimyasal boyama.....	47
3.10.5. Hücre ve HDM histolojisi için Hematoksilen & Eozin boyama.....	49
3.11. İstatistiksel Analiz	49
4. BULGULAR.....	50
4.1. Hücre Morfolojileri	50
4.2. Kalibrasyon Eğrileri	50
4.3. Tutunma Testleri	51
4.4. Büyüme Kinetikleri	51
4.5. SaOS-2 Hücrelerinin Osteojenik Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi.....	52
4.6. BS Karakterizasyonu	53
4.6.1. FTIR analizi	53
4.6.2. XRD analizi	55
4.6.3. SEM analizi.....	56
4.6.4. EDS analizi	58

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
4.7. EPC ve HUVEC Hücrelerinin Vaskülarizasyon Potansiyellerinin İncelenmesi	59
4.7.1. 3B bazal membran matriks üzerinde hücre kültürü	59
4.7.2. 3B BS üzerinde hücre kültürü.....	63
4.8. SaOS-2 Hücrelerinin 3B BS Üzerinde Osteojenik Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi	72
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	74
6. ÖNERİLER	82
KAYNAKLAR DİZİNİ	83
ÖZGEÇMİŞ	104
EKLER.....	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kemiğin genel yapısı.....	4
2.2. İnsan vücudunda dolaşım sistemi.....	5
2.3. Kan damarlarının yapıları.....	5
2.4. Anjiyoblastlardan vaskülarizasyon ile primer kapiller ağın oluşması, anjiyogenez ile yeni kapillerlerin oluşması ve damarın olgunlaşması.....	7
2.5. Var olan damardan anjiyogenez ile yeni damarın filizlenmesi.....	9
2.6. VEGF reseptörlerinin çeşitleri, yapıları ve fonksiyonları.....	10
2.7. VEGF'in reseptörlere bağlanması ile tetiklenen sinyal yolları.....	11
2.8. Hematopoetik kök hücreden erken ve geç EPC oluşumu.....	15
2.9. Hücrelerin kan damarı çevresindeki yerleşimi.....	20
3.1. Çalışmanın akış planı.....	27
3.2. Kalibrasyon eğrisi için deney şablonu.....	36
4.1. Hücrelerin ters faz ışık mikroskopundaki görüntüleri.....	50
4.2. Hücrelerin kalibrasyon eğrileri.....	50
4.3. Hücrelerin tutunma kinetikleri.....	51
4.4. Hücrelerin büyüme kinetikleri.....	52
4.5. Alizarin red S boyaması ile SaOS-2 kültürünün 7-14 ve 21. günlerdeki görüntüleri.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.6. Von Kossa boyaması ile SaOS-2 kültürünün 7-14 ve 21. günlerdeki görüntüleri.	53
4.7. BS, HAp ve BS-HAp kompozitinin 500-4000 cm ⁻¹ arası çizilen FTIR spektrumu.....	54
4.8. BS, HAp ve BS-HAp kompozitinin 500-2000 cm ⁻¹ arası çizilen FTIR spektrumu.....	55
4.9. BS, HAp ve BS-HAp kompozitinin XRD grafiği.....	55
4.10. BS por çaplarının belirlenmesi için çekilen SEM görüntüleri.	57
4.11. Farklı BS tiplerinin porozite oranları (%).	58
4.12. BS EDS spektrumu.	58
4.13. BS-HAp kompoziti EDS spektrumu.	59
4.14. HUVEC'lerin farklı hücre konsantrasyonları ve farklı ortamlarda 3B bazal membran matriks üzerinde 4-6 saat kültivasyon süreli floresans mikroskop fotoğrafları.	60
4.15. HUVEC'lerin farklı hücre konsantrasyonları ve farklı ortamlarda 3B bazal membran matriks üzerinde 4-6 saat kültivasyon süreli ters faz ışık mikroskop fotoğrafları.	60
4.16.EPC'lerin farklı hücre konsantrasyonları ve farklı ortamlarda 3B bazal membran matriks üzerinde 22-24 saat kültivasyon süreli floresans mikroskop fotoğrafları.	61
4.17. EPC'lerin farklı hücre konsantrasyonları ve farklı ortamlarda 3B bazal membran matriks üzerinde 22-24 saat kültivasyon süreli ters faz ışık mikroskop fotoğrafları.	62

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil

Sayfa

4.18. Kokültürlerin 2-4 ve 70-72 saatlik floresans ve ters faz ışık mikroskobu görüntüleri.	63
4.19. EPC'lerin 3B BS ve BS-HAp kompoziti üzerinde 72 saatlik kültivasyonu sonucunda elde edilen ters faz ışık mikroskobu görüntüleri.	64
4.20. HUVEC'lerin 3B BS ve BS-HAp kompoziti üzerinde 72 saatlik kültivasyonu sonucunda elde edilen ters faz ışık mikroskobu görüntüleri.	65
4.21. Kokültürlerin BS üzerine ekildikten sonraki ve 72. saatteki floresans mikroskop görüntüleri.	65
4.22. Kokültürlerin BS üzerine ekildikten sonraki ve 72. saatteki ters faz ışık mikroskop görüntüleri.	66
4.23. Kükültürlerin, BS ve BS-HAp kompoziti üzerinde 500 büyütmedeki SEM fotoğrafları.	67
4.24. EPC, HUVEC, EPC-SaOS-2 ve HUVEC-SaOS-2 kültürlerinin 2500 büyütme altında BS ve BS-HAp kompoziti üzerindeki SEM fotoğrafları.	68
4.25. BS'lerin üzerindeki kültürlere yapılan H&E boyama sonuçlarını gösteren fotoğraflar.	69
4.26. EPC hücrelerinin immunohistokimyasal boyama sonuçlarını gösteren fotoğraflar.	70
4.27. EPC-SaOS-2 hücrelerinin immunohistokimyasal boyama sonuçlarını gösteren fotoğraflar.	70
4.28. HUVEC hücrelerinin immunohistokimyasal boyama sonuçlarını gösteren fotoğraflar.	71

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)ŞekilSayfa

- 4.29. HUVEC-SaOS-2 hücrelerinin immunohistokimyasal boyama sonuçlarını gösteren fotoğraflar..... 71
- 4.30. Alizarin red S boyaması ile SaOS-2 kültürünün 7-14 ve 21. günlerdeki BS ve BS-HAp kompoziti üzerindeki ters faz ışık mikroskobu görüntüleri 72
- 4.31. Von Kossa boyaması ile SaOS-2 kültürünün 7-14 ve 21. günlerdeki BS ve BS-HAp kompoziti üzerindeki ters faz ışık mikroskobu görüntüleri..... 73

TABLolar DİZİNİTabloSayfa

4.1. Kalibrasyon eğrilerinde absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayıları.	51
4.2. BS EDS element analiz tablosu.	59
4.3. BS-HAp kompoziti EDS element analiz tablosu.	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
aFGF	Asidik fibroblast büyüme faktörü
Ang	Anjiyopoietin
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
BMP	Kemik morfojenik protein
BS	Bakteriyel selüloz
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein diacetate
DAB	Diaminobenzidine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
EC	Endotel hücre
EDS	Enerji dağılımlı x-ışınları spektroskopisi
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EPC	Endotel progenitör hücre
FBS	Fötal sıgır serumu
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FGFR	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
FTIR	Fourier transform kızılötesi spektroskopi
GAG	Glikozaminoglikan
H&E	Hematoksilen & eozin
HAp	Hidroksiapatit
HDM	Hücre dışı matriks
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HMDS	Heksametildisilazan
HMVEC	İnsan mikro-vasküler endotel hücresi
HS	Hestrin Schramm besin ortamı
HSPG	Heparan sülfat proteoglikan
HUVEC	İnsan umbilikal damar endotel hücresi
MMP	Matriks metalloproteinaz
MTT	3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
NO	Nitrik oksit
NRP	Nörofilin
PAF	Platelet aktive edici faktör
PCL	Polikaprolakton

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
PDGF	Platelet türevli büyüme faktörü
PDGFR	Platelet türevli büyüme faktörü reseptörü
PFA	Paraformaldehit
PGA	Poliglikolik asit
PGF	Plesental büyüme faktörü
PLLA	Polilaktik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
S	EPC growth medium supplement
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi
TCP	Trikalsiyum fosfat
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü- β
Tie2	Endotel hücre reseptörü
TNF- α	Tümör nekroz faktörü- α
UV	Mor ötesi ışık
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörü
VEGFR	Vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü
VO	Vaskülarizasyon ortamı

VRAP	Vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü bağlantılı protein
XRD	X-Işını kırınım spektroskopisi

1. GİRİŞ

Doğuştan var olan veya sonradan oluşan kemik hasarları sebebiyle, özellikle metal ve seramik implantlar ile başta otogreftler ve allogreftler olmak üzere gerçek kemikler kullanılmaktadır. Ancak günümüzde kullanılan bu greftlerin yeterince hızlı ve etkili iyileşme sağlayamaması sebebiyle, doku mühendisliği ile üretilen kemik greftlerine olan ilgi artmıştır. Yapay kemik greftlerinin en önemli sorunu, kemiğin mekanik ve fiziksel özelliklerine eş özelliklere sahip olamaması ve önceden damarlandırılamamasıdır. Delloye ve arkadaşlarının (2007) çalışmasında otojenik veya allojenik olarak süngerimsi kemik dokusundan alınan vaskülerize kemik greftlerinin hasarlı kemik dokusunun iyileşme süresini, kompakt kemik dokusundan alınan vaskülerize olmayan greftlere ve vaskülerize olmayan diğer yapay greftlere göre oldukça fazla arttırdığı belirtilmiştir (Delloye et al., 2007). Bu sebeple tez çalışmasında *in vitro* şartlar altında mekanik özellikleri kemiğe yakın olan bakteriyel selüloz (BS) doku iskelesi kullanarak, önceden damarlandırılmış bir kemik modeli oluşturmak amaçlanmıştır.

Doku iskeleleri, dokudaki hücre dışı matriksi (HDM) taklit eden genellikle doğal ve yapay polimerlerden elde edilen yapılardır (Smith and Ma, 2004). Yapay polimer genellikle biyouyumluluk sorunu, doğal polimerler ise genellikle biyolojik aktivite sorunu nedeni ile doku mühendisliğinde dezavantajlar oluşturmaktadır. BS doğal bir polimer olmasına rağmen; kolajen, laminin ve jelatin gibi immun yanıtı sebep olmamaktadır. Kimyasal olarak bitkisel selüloz ile aynı yapıdadır ancak, BS'nin moleküler yapısı ve fiziksel özellikleri bitkisel selülozdan farklıdır (Klemm et al., 2001). BS, suda çözünmeyen, esnek, elastik, yüksek gerilme direncine ve yüksek kristaliniteye sahip bir polimerdir (Svensson, Anna et al., 2005). Daha önce yapılan çalışmalarda *in vitro* ve *in vivo* şartlarda BS'nin iskele olarak kullanıldığı ve biyouyumlu olduğu gösterilmiştir (Helenius et al., 2006; Zaborowska et al., 2010). Ancak kemik mikroçevresini en iyi şekilde taklit edebilmesi için iskele üretirken, önceki çalışmalarda kemik hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı belirtilen ve doğal kemiğin inorganik kısmının büyük bölümünü oluşturan hidroksiapatit (HAp) kristalleri ile BS'den kompozit oluşturmak hedeflenmiştir. Bu zamana kadar yapılan pek çok çalışma HAp-BS kompoziti oluştururken, BS'yi HAp presipitasyonu ile kaplama tekniğini kullanmıştır (Wan, Y. et al., 2007; Zimmermann et al., 2011). Ancak bu tezde hedeflenen amaç, BS nano-liflerinin arasına doğal kemikte kolajen liflerinin arasında olduğu gibi HAp bağlamaktır.

BS'nin por çaplarının nano boyutta olması, polimerin üç boyutlu doku iskelesi olarak kullanımını sınırlandırmaktadır, çünkü nano-porlardan geçemeyen hücreler, bu iskeleyi daha çok bir yüzey olarak kullanmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar ile BS'nin por çaplarının çeşitli şekillerde arttırıldığı gösterilmiştir (Bckdahl et al., 2008; Zaborowska et al., 2010). Bu tez çalışmasında yeni bir yöntem ile BS'nin por çaplarının genişletilmesi amaçlanmıştır. Böylece hem hücreler mikro-porlardan geçebilecek hem de endotel hücreleri, oluşan kemik modelinde vaskülerize olarak besin ve oksijen iletimini arttırabilecektir. Araştırmanın sonunda kemik doku mühendisliğinde doku rejenerasyonu amacı ile kullanılabilircek uygun bir iskele oluşturulması, bu iskelenin üzerinde bir kemik modeli geliştirilmesi ve son olarak kemik modelinin damarlandırılması böylece kemik doku hasarlarında iyileşmeyi hızlandırmaya yardımcı bir doku mühendisliği ürünü eldilmesi hedeflenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

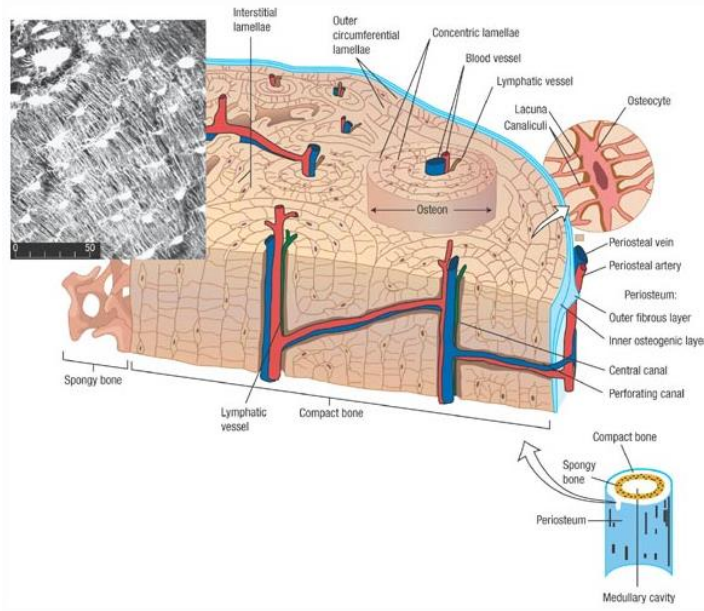
2.1. Kemik Dokusu

İskelet sisteminin en önemli yapı taşı olan kemik dokusu; hacminin %25'ine kadar su, ~%40 inorganik madensel tuzlar (kalsiyum, karbonat, fosfat, magnezyum fosfat ile iz miktarda sodyum) ve ~%35 organik maddelerden oluşmaktadır (Wang, X. et al., 2010). Kemiğin; vücut hareketi, kan hücrelerinin üretimi, organları koruma, bazı minerallerin depolanması ve vücuda destek olma gibi çok önemli görevleri bulunmaktadır. Kemiğin organik kısmının büyük bir bölümü Tip I kolajen, protein ve glikozaminoglikanlardan (GAG) oluşmaktadır (Currey, 2002). Kemik dokusunda lifler paralel ve boşluk bırakacak şekilde yerleşmiştir, aralarında HAp kristalleri denen ve kemiğin inorganik kısmının büyük çoğunluğunu oluşturan kalsiyum fosfat esaslı madde bulunmaktadır (Hollinger, 2011). Kemik dokusunun esnek yapısı kolajen gibi organik materyallere, sertliği ve dayanıklılığı ise HAp kristalleri gibi inorganik minerallere bağlıdır.

Kemik dokusu; osteoprogenitör hücre, osteoblast, osteosit ve osteoklast adı verilen dört farklı hücreden oluşur. Osteoprogenitör hücreler; mezenkimal kökenli, kemik büyümesi, zedelenmesi ve tamiri sırasında aktif görev alarak osteoblastlara dönüşen, periosteum ve endosteumda, Havers ve Volkmann kanallarında ve bu kanalların çevresindeki gevşek bağ doku içerisinde inaktif olarak bulunabilen hücrelerdir. Osteoblastlar; kemik dokunun kolajen ipliklerini, proteoglikan ve glikoproteinlerini sentezleyen, kemik yapımında görev alan genç kemik hücreleridir (Lerner, 2012). Osteositler; osteoblastların aktivitelerinin düşmesi ile oluşan, lakünalar içerisinde yer alan ve madde iletiminde görev alan olgun kemik hücreleridir (Bellido et al., 2014). Osteoklastlar ise; kırmızı kemik iliğinden köken alan, kemik yapımı sırasında kemiğin yıkımını sağlayarak osteoblastların yeni kemik dokusu üretmesine olanak sağlarlar (Teitelbaum, 2000).

Primer kemik dokusu, embriyonik gelişim sürecinde ve kemik hasarlarının onarımında meydana gelen, kolajen liflerinin rastgele sıralanması ile karakterize olan dokudur. Sekonder kemik doku ise olgunlaşmış kemik dokusudur ve erişkinlerde primer kemik dokusunun yerini alır (Currey, 2002). Olgunlaşmış kemik vücutta, kompakt (kortikal) ve süngerimsi (trabeküler) kemik dokusu olmak üzere iki farklı yapıda bulunur (Şekil 2.1). Kompakt kemik dokusu; sıkı bir

şekilde düzenlenmiş, sert ve süngerimsi kemik dokusuna göre çok az boşluk içeren bir yapıya sahiptir ve kütlesi iskelet kütlesinin yaklaşık %80'ine karşılık gelir. Süngerimsi kemik dokusu ise gevşek ve poröz bir yapıya sahiptir, boşlukları kemik iliği ile doludur.



Şekil 2.1. Kemikğin genel yapısı (Taylor et al. 2007).

Primer ve sekonder kemik dokularında osteositler bulunur, ancak primer kemik dokusunda bu hücreler rastgele dizilmiş halde iken sekonder kemik dokusunda komşu lamellerin arasına sıkışmış şekilde bulunurlar ve sayıları daha azdır. Osteon (Havers sistemi) lamelleri arasında osteositleri barındıran kısımlara lakuna adı verilir. Lakunalarından her yöne ince kanalcıklar (kanalikülü) çıkar ve lakunaları birbirine ve Havers kanalına bağlar (White and Folkens, 2005). Kanaliküller osteositlerin uzantılarıdır ve ara bağlantılar (gap junction) ile iletişim kurarlar. Böylece besin maddeleri ve hormon gibi maddeler Havers kanalındaki kan damarlarından uzak osteositlere taşınırlar (Clarke, 2008).

2.2. Dolaşım Sistemi

Organizmanın en önemli yapılarından olan kan ve dolaşım sistemi; organ ve dokuları oluşturan hücrelerin beslenmesi, korunması ve artıklarının uzaklaştırılması, ısı dengelerinin sağlanması görevlerinin yanı sıra, gaz alışverişi ve hormonların gerekli yerlere ulaştırılması görevlerini de üstlenmektedir. Omurgalılarda kapalı dolaşım sistemi bulunmaktadır ve bu sistem genel olarak; tüm hücrelerin beslenme ve atıklarının uzaklaştırılması için gerekli olan kan,

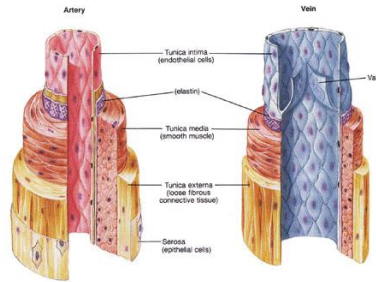
kanın tüm dokulara ulaştırılması için tüm vücudu ağısı bir yapıda saran damarlardan ve kanı damarlar aracılığı ile tüm organ ve dokulara pompalayan kalpten (Şekil 2.2) oluşur (Feher, 2012).



Şekil 2.2. İnsan vücudunda dolaşım sistemi (Gaze, D. C., 2012).

2.2.1. Kan damarlarının yapıları

Damarlar genel olarak; Tunica adventitia, Tunica media ve Tunica intima olmak üzere üç tabakadan (Şekil 2.3) meydana gelir (Acton, 2013). Tunica adventitia; fibroblastik bağ doku ve genel olarak kolajen 1 ve 3, elastin fiberler, proteoglikanlar, hiyaluronan ve glikoproteinlerden (laminin, fibronektin, trombospondin ve tenaskin) oluşan karmaşık bir yapı olan HDM ile damarın mekanik gücünü ve yapısal bütünlüğünü oluşturan en dıştaki tabakasıdır. Tunica media; kuvvetli bir kasılma için dairesel olarak organize olmuş düz kas hücreleri ve damarın viskoelastik davranışından sorumlu elastin fiberlerinden oluşan, damarın orta tabakasıdır. Tunica intima; bazal membrana kan akışının yönüne uygun olarak tutunmuş endotel hücrelerden ve bu hücelere uygun mikroçevreyi sağlayan yarı-endotel fibroelastik bağ doku tabakası ve internal elastik laminadan oluşan iç tabakadır (Leonhardt, 1993).



Şekil 2.3. Kan damarlarının yapıları (Fox, I. F., 1993).

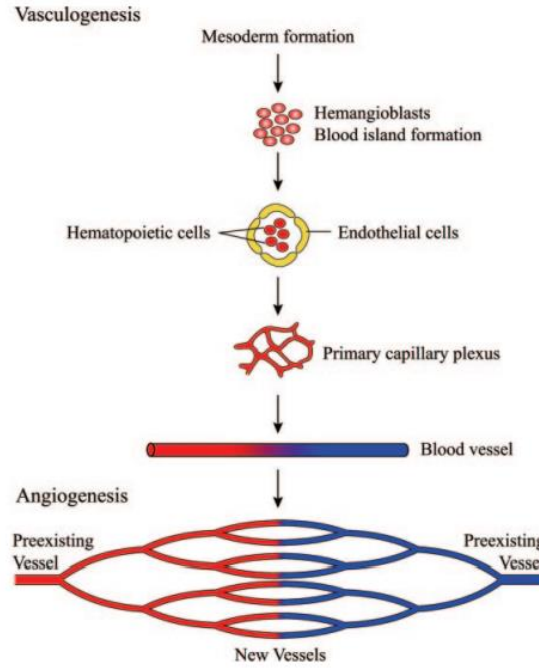
2.2.2. Kan damarlarının oluşumu

Embriyonik olarak kan damarlarının oluşumu birkaç fazdan meydana gelmektedir. İlk önce mezodermden anjioblast adı verilen vasküler öncüller [endotel progenitör hücreler (EPC)] meydana gelir. Daha sonra bu hücreler vaskülarizasyon doğrultusunda lümenize olmuş yapılar haline gelerek primer kapiller damar ağını oluşturur (Şekil 2.4). Primer kapiller damar ağının oluşmasında anjiyoblast ya da EPC'lerden, mezoanjiyoblastlardan ve yetişkin kemik iliğindeki multipotent progenitör hücrelerden farklılaşan endotel hücrelerin (EC) rolü vardır (Schmidt et al., 2007). Embriyo gelişimi sırasındaki vaskülarizasyonda; mezodermden anjiyoblast oluşumu, anjiyoblastların vasküler yapıda dizilimi, vasküler lümenlerin oluşumu ve sürekli vasküler ağların oluşumu gibi dört temel basamak görülür (Drake and Fleming, 2000; Risau and Flamme, 1995). Hızlı gelişen embriyoya ayak uydurabilmek ve ilk kalp atışına organizmanın tamamen hazır olabilmesi için primer kapiller damar ağının, yeni dallanmalar, köprüler ve yayılma oluşturarak vasküler ağı genişletecek şekilde yeniden organize olması gerekmektedir (Potente et al., 2011).

Kan damarları embriyoda gelişen ilk organdır ve vücudu bir ağ gibi sarar. (Carmeliet, 2003). Vasküler sistem vaskülarizasyon ve anjiyogenez olarak adlandırılan iki temel prosesten kökenlenir (Schmidt et al., 2007). Bu iki mekanizmanın birbiri yerine kullanılması bu konuda yapılan en yaygın hatalardan biridir. Embriyonal dönemde endotel hücrelerin prekürsörleri olan anjiyoblastların farklılaşması ile ilkel kardiyovasküler sistemin ya da vaskülerize endodermal organların oluşması vaskülarizasyon olarak ifade edilmektedir (Kraehenbuehl et al., 2011). Ektodermal ya da mezenkimal organların vaskülarizasyonu, post-natal endometrial çoğalmanın ve yara iyileşmesinin gerçekleşmesi için gerekli olan anjiyogenesis ise; anjiyogenez ve vasküler kararlılık arasında dengeyi sağlayan sıkı bir şekilde düzenlenen bir süreçle var olan damarlardan yenilerinin oluşması prosesine verilen addır (Risau, 1997).

Normal fizyolojik proseste anjiyogenez, embriyogenez sırasında, kadınların menstrual döngüsü, yara iyileşmesi ve kemik oluşumu sırasında büyük rol oynamaktadır (Bussolino et al., 1997). Uzun bir süredir vaskülarizasyonun embriyogenez ile sınırlı olduğu ve yetişkinlerde görülmediği, anjiyogenezin ise hem embriyo gelişimi hem de doğum sonrası süreçte görüldüğü düşünülüyordu. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar, bu iki prosesin hem embriyo gelişiminde hem de doğum sonrası süreçte birbiri ile koordineli bir şekilde devam

ettiğini göstermektedir (Novosel et al., 2011). Dolaşım sisteminin oluşumu için vücutta erken embriyogenezde meydana gelen mezodermden kökenlenen vasküler ağın oluşması (Coffin and Poole, 1988), iskemi sonrası endotel bütünlüğünün tekrar sağlanması ve yeni kapiller oluşumu için dolaşımda bulunan endotel öncül hücrelerinin olgun endotel hücrelere dönüşerek yeni bir damar oluşturması sırasında gerçekleşir (Tekeli ve Emerk, 2007).

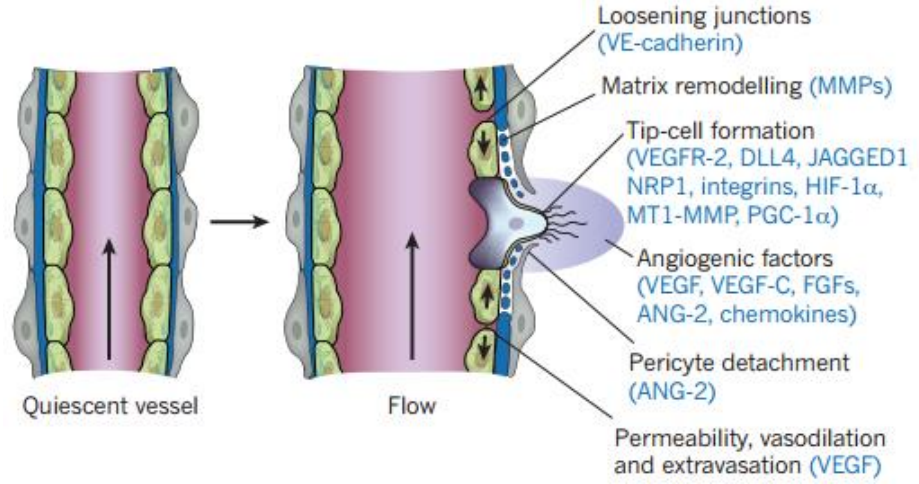


Şekil 2.4. Anjiyoblastlardan vaskülarizasyon ile primer kapiller ağın oluşması, anjiyogenez ile yeni kapillerlerin oluşması ve damarın olgunlaşması (Lamalice et al., 2007).

Anjiyogenezin sıkı kontrol mekanizması bozulup vücutta yetersiz anjiyogenez meydana geldiğinde, yukarıda belirtilen ektodermal ya da mezenkimal organların vaskülarizasyonu, post-natal endometrial çoğalmanın ve yara iyileşmesinin gerçekleşmesi işlemlerinin yerine getirilememesinin yanı sıra, iskemik doku hasarı, kalp yetmezliği, tekrarlayan aftöz ülser, pre-eklampside gelişen organ yetmezliği, osteoporoz, purpura, akciğer fibrozisi, amiyotrofik lateral skleroz ve Alzheimer gibi hastalıklar ortaya çıkabilmektedir. Öte yandan aşırı anjiyogenez ise kanser, sarı benek gibi göz hastalıkları, körlük, artirit, sedef hastalığı, restenoz, arteriyopati, siğil, sinovit, osteomiyelit, astım gibi hastalıklara sebep olabilmektedir. Anjiyogenez pek çok insanı etkileyen bu hastalıklar ile ilişkili olduğundan, dünyada anjiyogenezi arttırmaya veya azaltmaya çalışan pek çok araştırma gerçekleştirilmektedir (Carmeliet, 2003, 2005; Folkman, 1995).

Anjiyogenez, pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörlerin arasında sıkı bir dengenin olduğu ve pek çok kaskad sistemi tarafından kontrol edilen bir mekanizmadır (Lamalice et al., 2007). Bu basamaklar temel olarak endotel hücrelerin uyarılması, kapiller bazal laminanın degradasyonu, kapiller filizlenmelerin oluşumu, endotel hücrelerin göçü ve yeni damarların olgunlaşması (Şekil 2.4) olarak sınıflandırılır (Khoo et al., 2011; Onishi et al., 2011). Anjiyogenezin ilk basamağında endotel hücreler, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi anjiyogenik faktörler ile uyarılarak aktive edilir (Irvin et al., 2014). VEGF vasküler geçirgenliği artırır ve nitrik oksit (NO) ile birlikte var olan kan damarlarını vazodilatasyona uğratır (Ferrara, Napoleone and Davis-Smyth, 1997). Geçirgenliğin artması ile EC'lerin göçü için gerekli HDM'nin oluşumu sağlanır. İkinci basamakta kapiller bazal lamina; aktive edilmiş endotel hücrelerden salınan matriks metalloproteinaz (MMP) gibi hücre dışı proteinazlar tarafından yıkılır (Ziche and Morbidelli, 2000). Böylece EC'lerin göçünü kolaylaştırmak için hücreler birbirlerinden ayrılarak damar stabilizasyonunu bozarlar ve damara destek olan düz kas hücrelerinden ayrılırlar (Şekil 2.5). Üçüncü basamakta EC'lerin göçü çeşitli anjiogenik faktörler ile uyarılır ve böylece hücreler uzak bölgelere gidebilir. Son aşamada ise, EC'lerin göçü ile oluşan yeni damar yapılarını çevreleyen bazal lamina oluşturulur ve perisitlerle EC'lerin beraber yapılanması sayesinde damar yapısı stabilleşir (Aktaş and Akbulut, 2010). Bazal membran ve HDM'nin proteolitik enzimler tarafından yıkılmasından sonra başlayan sağlıklı hücrelerdeki anjiyogenez süreci; endotel hücrelerinin HDM içinde göçü, endotel hücrelerinin büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalması ve endotel hücrelerin lümen oluşturması sonrasında anjiyogenezin inhibisyonu ile son bulur. Fakat tümör hücrelerinde anjiyogenez normal hücrelerden farklıdır ve inhibisyon gerçekleşmez. Bu sebeple tümör daha fazla büyür ve tekrar hipoksi oluşur. Sonuçta tümör hücreleri yeniden anjiyogenik faktörler salgılayarak bir döngü oluşturur (Kiliç vd., 2005). Anjiyogenez, tümör kütesinin büyümesi ve maksimum boyutuna ulaşması için hayati öneme sahiptir ve tümör dokusu kendisine yeni damarlar oluşturmadığı sürece en fazla 1mm çapa kadar büyüebilmektedir (King and Robins, 2006).

EC göçü üç temel mekanizma ile gerçekleşir; VEGF ve bFGF gibi büyüme faktörlerine doğru yönelme (kemotaksi), HDM komponentine bağlı integrinler gibi immobilize ligand gradientine doğru yönelme (haptotaksi) ve kan damarında mevcut olan kayma gerilmesi gibi mekanik kuvvetler tarafından yönlendirilme (mekanotaksis) (Lamalice et al., 2007).



Şekil 2.5. Var olan damardan anjiyogenez ile yeni damarın filizlenmesi (Carmeliet and Jain, 2011).

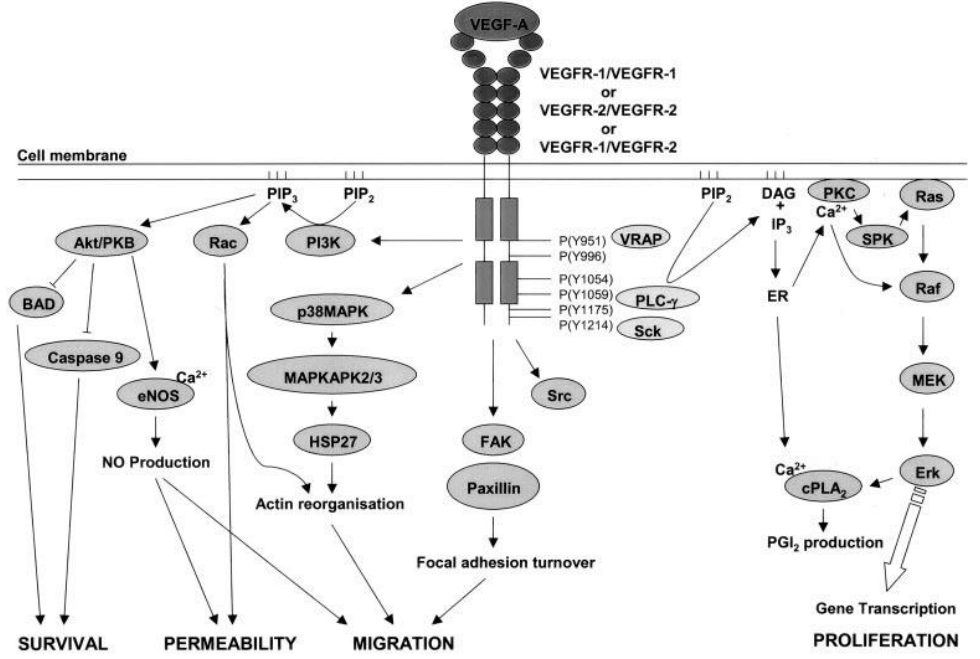
Anjiyogenez sırasında pek çok farklı sitokin EC hücre göçünden sorumludur. Aktin bazlı bu hareketten sorumlu olan üç temel promotor bulunmaktadır: VEGF, bFGF ve anjiyopoietinler. Anjiyogenez için diğer yardımcı sitokinler, hepatosit büyüme faktörü (HGF), platelet türevli büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), interlökinler, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), platelet aktive edici faktör (PAF), efrinler, çözünabilir adhezyon molekülleri, endoglin ve anjiyogenin (Barrientos et al., 2008).

2.2.3. Kan damarlarının oluşumunda görevli anjiyogenik faktörler

2.2.3.1. Vasküler endotel büyüme faktörü

VEGF 1983 yılında ilk defa tümör vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) olarak tanımlanmış (Senger et al., 1983), ancak 1989 yılında tam olarak keşfedilmiş ve karakterize edilmiştir (Ferrara, N. and Henzel, 1989; Keramaris et al., 2008). VEGF damar endotel hücrelerine özgü homodimerik glikoprotein yapısında heparin bağlayan büyüme faktörüdür. Pek çok *in vitro* çalışma VEGF'nin atardamar, toplardamar ve lenfatik damarlardan kökenlemiş endotel hücrelerin gelişimini arttırdığını belirtmektedir (Augustin et al., 2007; Ferrara, Napoleone and Davis-Smyth, 1997; Giannoudis, P. et al., 2007; Giannoudis, P. V. et al., 2006). Memelilerde VEGF ailesinin VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental türevli büyüme faktörü olmak üzere 5 üyesi bulunmaktadır. İnsan VEGF-A monomeri, VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆

VEGF reseptörlerine bağlanınca reseptör monomerleri dimerize olur ve otofosforilasyon yoluyla hücre içi aktivasyon başlar. VEGFR-bağlantılı protein (VRAP), PLC γ ve Sck gibi VEGFR'nin spesifik tirozin rezidüleri ile ilgili hücre içi proteinler reseptörün aktive olmasıyla fosforillenir. Hücre göçü, proliferasyonu, permeabilitesi ve sağ kalımını arttırmak için VEGF'nin reseptöre bağlanması ile pek çok sinyal transdüksiyon yolağı aktive olur (Bates, 2010; Esser et al., 1998)(Şekil 2.7).



Şekil 2.7. VEGF'in reseptörlere bağlanması ile tetiklenen sinyal yolları (Hoeben et al., 2004).

2.2.3.2. Fibroblast büyüme faktörü

Toplam 22 üyeden oluşan FGF ailesinden aFGF (FGF-1/asidik FGF) ile bFGF (FGF-2/bazik FGF) damar oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Lieu et al., 2011). bFGF güçlü bir fibroblast mitojenidir ve ilk EC mitojeni olarak tanımlanmıştır. aFGF genel olarak nöronal dokularda, tümörde ve kemikte ifade edilirken (Cheng, X. et al., 2011), bFGF normal ve malignant dokularda ifade edilir (Salgia, 2011). VEGF'nin aksine, FGF EC'lere spesifik değildir. FGF; endotel hücreler, damar düz kası hücreleri ve fibroblast hücreleri gibi damar oluşumu için gerekli tüm hücrelerin farklılaşma ve proliferasyonunu tetiklemekte, endotel hücrelerin göçünü uyarmaktadır (Lindner and Reidy, 1991). FGF mezodermal ve nöroektodermal orjinli hücrelerde mitojenik, kemotaktik ve anjiyogenik aktiviteyi başlatmaktadır (Powers et al., 2000). Anjiyogenik aktivitesinin yanı sıra FGF, yara iyileşmesi ve doku hasarı onarımında da

önemlidir. FGF çoğu hücre yüzeyinde ve hücre dışı matriksi dahilinde bulunan heparan sülfat proteoglikana (HSPG) yüksek bir afinite ile bağlanmaktadır. HSPG aynı zamanda FGF için ko-reseptör olarak görev yapmaktadır (Cross and Claesson-Welsh, 2001).

FGF reseptörü (FGFR), endotel hücrelerinde, düz kas hücrelerinde, fibroblast hücrelerinde, miyoblastlarda ve tümör hücrelerinde ifade edilir. FGF, FGFR'e bağlanır ve onu aktive eden sinyal molekülü olarak hareket eder. Aktive edilmiş olan FGFR, reseptörün sitozolik kısmında fosforillenmiş tirozine bağlanan spesifik molekülleri tetikler ve böylece spesifik hücresel yanıtlara yol açan bir dizi sinyal yolağını başlatır (Rifkin and Moscatelli, 1989).

2.2.3.3. Epidermal büyüme faktörü

EGF, EGF-reseptörleri (EGFR) ile birlikte hücre büyümesi ve gelişmesini kontrol eden 11 üyeye sahip bir protein ailesidir. EGF ailesinin üyeleri çok benzer yapıya ve fonksiyonel karakteristiğe sahiptir. EGF'in anjiyogenezin aktivasyonunda görev almasının yanı sıra, hücre proliferasyonu, sağkalımı, göçü, adhezyonu ve farklılaşmasında rol oynar (Mitsudomi and Yatabe, 2010). HER1 (EGFR), HER2, HER3 ve HER4 olmak üzere 4 farklı EGFR bulunmaktadır. HER1, tirozin kinaz veya ErbB reseptörleri olarak bilinen reseptör ailesinin tanımlanmış ilk reseptörüdür. HER3 dışındaki tüm reseptörler hücre içi tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Tirozin kinaz aktivitesi, hücre içinde pek çok biyokimyasal değişikliklere neden olan sinyal transdüksiyon kaskadını başlatır (Normanno et al., 2006; Witton et al., 2003). EGFR yolağının aktivasyonu ile tümör hücrelerinin büyük çoğunluğunda anjiyogenik moleküllerinin üretimi arttırılır. Bu durum EGFR sinyalinin anjiyogenezdeki dolaylı etkisidir. Bu yöntem ile tümör hücreleri ile şartlandırılmış ortam hazırlanıp endotel hücrelerin anjiyogenezini arttırma çalışmaları yapılmıştır (Van Crujisen et al., 2005). EGFR, birçok katı tümörlerin büyümesinde ve devamlılığında da önemli rol oynamaktadır (Baselga, 2002).

2.2.3.4. Anjiyopoietin

Anjiyopoietinler embriyonik ve postnatal anjiyogeneizde, vazodilatasyon, vazokonstriksiyon ve mikrovasküler permeabilitede rol oynayan büyüme faktörleridir (Geva et al., 2002). Anjiyopoietin (Ang) ailesinin bir üyesi olan Ang-1, destek hücrelerinin endotel hücrelerin etrafına toplanmalarını, endotel

hücrelerin HDM ile ilişki kurmasını indükleyerek vasküler bütünlüğün artmasını sağlar, ayrıca damar olgunlaşması, hücre adhezyonu, göçü ve sağkalımı için önemlidir. Aşırı VEGF ekspresyonu çok geçirgen damar gelişimine yol açabildiği gibi aşırı Ang-1 ekspresyonu da geçirgen olmayan damarların oluşumuna neden olmaktadır. Ailenin diğer bir üyesi olan Ang-2 ise sadece damarın yeniden yapılandığı yerlerde ifade edilir ve hücre ölümü ile vaskülarizasyonun bozulmasından sorumludur (Lobov et al., 2002). Ang-1 ve Ang-2 endotel hücre proliferasyonunu indükleyemez ancak endotel hücrelerin varlığını sürdürmesini, damar bütünlüğünün sağlanmasını, damarların filizlenmesini ve dallanmasını düzenler (Chung and Shum-Tim, 2012). İki molekül de aynı endotel hücre reseptörüne (Tie2) bağlanır. Ancak Ang-2 Ang-1'in rekabetli inhibitörü olduğu için Tie2'ye bağlandığında Ang-1 sinyalini bloke eder (Nomi et al., 2002).

2.2.3.5. Platelet türevli büyüme faktörü

PDGF; fibroblast, düz kas hücreleri, nöronlar ve EC'lerin hareketliliğini ve büyümesini artırıcı, *in vivo* anjiyogenik yanıtı indükleyici, fakat EC proliferasyonuna doğrudan etki etmeyen bir büyüme faktörüdür. PDGF; kemotaksis ve yeniden aktin oluşumunu indüklemekte, ayrıca zedelenen damar duvarlarının iyileşmesinde rol oynamaktadır (Friedlaender et al., 2013).

PDGF zincirleri homodimer ve heterodimer alt ünitelerden oluşmuş olup, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, PDGF-DD olmak üzere beş farklı izoformu bulunur (Aydemir ve Sari, 2010). PDGF ailesi, PDGFR reseptör- α (PDGFR- α) ve PDGFR- β olarak adlandırılan ve trozin kinaz aktivitesi gösteren iki farklı PDGF reseptörü tarafından bağlanır ve aktive edilir (Uutela, 2004).

2.2.3.6. Hepatosit büyüme faktörü

HGF, disülfid bağlı heterodimer yapısına sahip, embriyogenez, yara iyileşmesi, *in vivo* yeni kan damarı oluşumu ve organ yenilenmesi gibi biyolojik proseslere katkıda bulunan bir büyüme faktörüdür. Hepatik hücreler için oldukça mitojendir ve epitel, melanosit, endotel gibi hücreler için hareketliliği, göçü, büyümeyi ve morfolojiyi regüle eder (Chung and Shum-Tim, 2012).

2.2.3.7. Transforme edici büyüme faktörü- β

TGF- β , VEGF gibi anjiyogenezi indükleyen, ancak VEGF'in aksine EC'leri apoptoza gönderen ve proliferasyonunu engelleyen bir büyüme faktörüdür (Ferrari et al., 2009). Makrofaj ve plazma hücrelerini içeren bağışıklık hücreleri tarafından salgılanır. TGF- β ; hücre çoğalması, farklılaşması, apoptozu, adhezyonu ve göçünü modüle eder. TGF- β ve reseptörü, EC farklılaşması ve damar duvarının bütünlüğünün sağlanması ve korunması için büyük önem taşır (Dobaczewski et al., 2011).

2.2.4. EPC

EPC'ler hematopoetik kök hücrelerden köken alan, kemik iliğinde depolanan ve kan dolaşımına katılan, çoğalabilen, göç edebilen ve olgun EC'lere dönüşme potansiyeli olan hücrelerdir. Taşıdığı yüzey belirteçlerinin endotel hücreler ve hematopoetik kök hücreler ile ortak olması bunu kanıtlar niteliktedir (Richardson and Yoder, 2011). EC yüzey belirteçlerinden VEGFR-2'yi, hematopoetik kök hücre yüzey belirteci olan CD34'ü taşırlar. Bunun dışında olgunlaşmamış EPC'ler, endotel hücrelerden farklı olarak CD133 yüzey belirtecini taşırlar ancak EC'lere dönüştükçe bu belirteci kaybederler (Peichev et al., 2000; Timmermans et al., 2007).

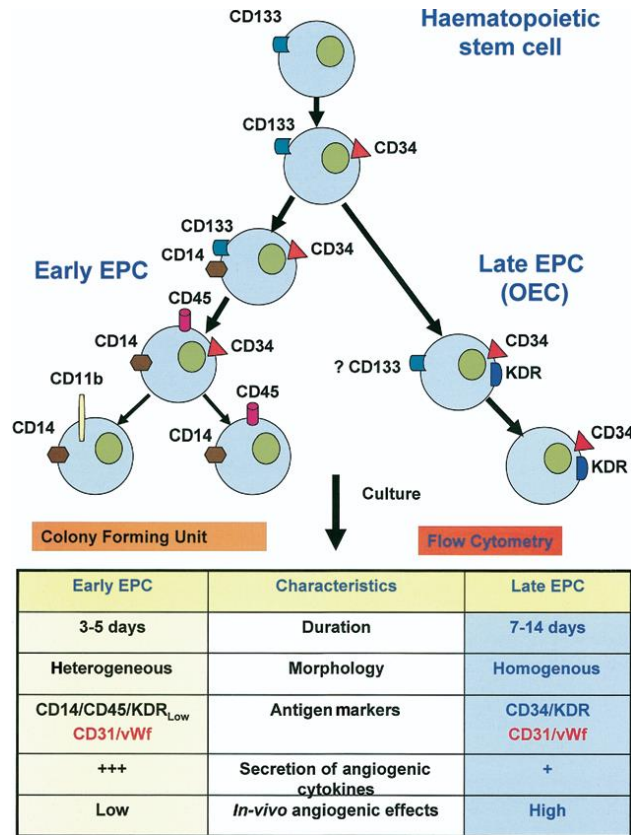
EPC'ler erken ve geç EPC olarak ikiye ayrılır. İki hücre tipinin taşıdığı markörler farklı olmakla birlikte, fonksiyonları da farklılık göstermektedir (Yoon et al., 2005). Anjiyogenik faktörlerin salgılanma oranı erken EPC'lerde daha fazla iken, geç EPC'nin *in vivo* anjiyogenik etkisi daha fazladır (Şekil 2.8) (Hur et al., 2004).

EPC'lerin dolaşıma katılmasını tetikleyen en önemli etmenler doku iskemisi ve hasarıdır. Vücutta doku ve damar hasarı meydana geldiğinde, EPC'ler ölen endotel hücrelerin yerine geçebilmekte ve damar hasarının tamirinde önemli rol oynayabilmektedirler (Xu, 2005). Son yıllarda vaskülarizasyon ve anjiyogeneze çalışmalarında sıkça kullanılan bu hücreler, özellikle vasküler hastalıkların tedavisinde önemli potansiyele sahiptirler. EPC'ler ile yapılan çalışmalarla fare kolon kanserlerinde dolaşımdaki EPC'lerin tümör vaskülarizasyonunda büyük rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca anti-anjiyogenik ilaç çalışmalarında EPC'lerin, insan umbilikal damar endotel hücreleri (HUVEC) ve insan mikro-vasküler

endotel hücrelerinden (HMVEC) daha iyi model oluşturdukları rapor edilmiştir (Ahn et al., 2010).

EPC'ler kemik iliği (Asahara et al., 1999) veya periferik kandan (Takahashi et al., 1999), aynı zamanda fetal karaciğer veya göbek bağı kordon kanından izole edilebilmektedir (Hristov et al., 2003). İzolasyon sonrası hücreler spesifik büyüme faktörleri içeren ortamda kültive edilmektedir. Vaskülarizasyonun gerekli olduğu, periferik damar hastalığı, miyokardiyal iskemi, yara iyileşmesi, inme, retinopati ve tümör damarlanması durumlarında EPC'ler görev almaktadır. Bu hastalıkların tedavisinde EPC naklinin VEGF proteinini verilmesinden daha başarılı olduğu düşünülmektedir. Bunun sebebi:

1. EPC'ler verildikleri bölgede sadece damar oluşturmakla kalmayıp büyüme faktörleri de salgılaması, böylece bir anlamda büyüme faktörü verilmesi,
2. EPC'ler iskemik alana yöneldiklerinden, en çok ihtiyaç olan bölgede yeni damarlanma meydana getirilmesi,
3. VEGF proteinin kısa ömrü nedeniyle etkili olabilmesi için tek dozun genellikle yetersiz olmasıdır.



Şekil 2.8. Hematopoetik kök hücreden erken ve geç EPC oluşumu (Shantsila et al., 2008).

2.3. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği günümüzde; amaca uygun doku ve organ oluşturmak üzere, belirli bir doku iskelesi üzerinde biyoaktif moleküller kullanılarak hücrelerin biyolojik işleyiş ve organizasyonun oluşturulmasına yönelik multidisipliner bir bilim dalı olarak tanımlanmaktadır (Olad and Farshi Azhar, 2014). Günümüzde doğuştan gelen veya sonradan oluşan doku ve organ hasarlarının onarımında farmakolojik tedaviler, transplantasyon çalışmaları veya yapay organlar gibi farklı tedavi seçenekleri kullanılabilir (Kim, B.-S. and Mooney, 1998). Farmakolojik tedavi yöntemleri; genelde hasarın hücre boyutunda olduğu veya yerel küçük doku kayıpları şeklinde gerçekleştiği durumlarda, onarım ve yenilenme amacıyla kullanılabilirken, geniş çapta doku veya organ kayıpları gibi insan vücudunun yenilenme kapasitesini aşan durumlarda başarı sağlayamamaktadır. Bu gibi durumlarda başka bir donörden doku veya organ nakline başvurulmaktadır. Canlı bir donörden hastaya yapılan pek çok doku-organ transplantasyon çalışmaları günümüzde başarıyla gerçekleştirilebilmektedir (Platt, 1998). Fakat hastada doku reddi oluşabilme riski, transplantasyon sonrası kullanılan ilaçların yan etkileri (Lechler et al., 2005) ve doku uyumlu donör sayısının azlığı gibi sorunlar transplantasyon çalışmalarının uygulanabilirliğini azaltmaktadır (Conesa et al., 2003). Günümüzde organ nakilleri genellikle beyin ölümü gerçekleşmiş kişilerden sağlanmakla birlikte böbrek gibi sağlıklı kişilerde birden fazla bulunan organlar için ise canlı donörler de kullanılabilir (Segev et al., 2005). Ancak böyle bir durumda donörün de yaşam kalitesinde bir miktar azalma meydana gelmektedir (Simmons et al., 1987). Tüm bu olumsuzlukların giderilebilmesi için kişiye özel tedavilerin geliştirilmesi ve günümüzde oldukça sınırlı olan yapay organ kullanımının yapılacak yoğun çalışmalar ve geliştirmeler aracılığıyla artırılması gerekmektedir (Niklason and Langer, 2001). Sınırlı olan çalışmaların çok büyük oranı, organların vaskülerize yapısı tam olarak taklit edilemediğinden dünyada en çok üretilen ve kullanılan yapay organlar damarlı yapı içermeyen deri ve kıkırdak dokuları ile ilgilidir (Novosel et al., 2011). Özellikle karaciğer gibi karmaşık vaskülerize yapıya sahip organların yapay olarak üretimi üzerinde hala yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

Doku mühendisliği çalışmaları, dokunun tamirini ve rejenerasyonunu sağlamayı ve doku hasarında kullanılan yöntemlerin dezavantajlarını ortadan kaldırmayı hedeflemektedir (Cancedda et al., 2003). En temel amacı, hastada immünolojik yanıt oluşturmada, hastada gelişip büyüyen bir yapay doku ya da organ oluşturmaktır (Lanza et al., 2011).

Doku mühendisliğinde kaybedilen doku veya organın yerine, bu doku veya organların fonksiyonlarını birebir sergileme kabiliyetine sahip yapıların oluşturulması ana hedeftir. Bu yapıların oluşturulması işlemi; *in vitro* olarak da gerçekleştirilip daha sonra vücuda entegre edilebileceği gibi, iskelelerin laboratuvar ortamında hazırlanmasından ve hücrelerin iskeleler üzerine ekilmesinden sonra vücuda implante edilerek *in vivo* olarak da gerçekleştirilebilmektedir (Hollister et al., 2009). Kaybedilen dokunun fonksiyonlarının yeniden oluşturulabilmesi için dokuya ait hücrelerin hazırlanan doku iskelelerine ekilerek hücrelerin çoğalmasının sağlanması yeterli olmamaktadır. Niş olarak adlandırılan hücrelerin mikroçevresinin çok iyi bir şekilde taklit edilmesi gerekmektedir (Lutolf and Hubbell, 2005). Mikroçevre sinyal sistemlerini, hücrelerarası iletişimi sağlayan biyolojik yolları ve HDM'yi kapsamaktadır (Metallo et al., 2007). HDM'nin taklit edilmesi amacıyla günümüzde çok çeşitli doku iskeleleri sentezlenebilmektedir. Bu doku iskeleleri genelde hücrelerin tutunması ve çoğalması için uygun zemini oluşturabilmekte ancak hücrelerin doku içerisinde gösterdikleri özellikleri birebir sergilemesini sağlayamamaktadır. İşlevsel bir dokunun oluşturulabilmesi için, doku iskelesinin dokunun fiziksel ve mekanik özelliklerini taşıması gerekmektedir (Rosso et al., 2005). Buna ek olarak iskelenin hücrelerin doku oluşumu için farklılaşmasını sağlayacak uyarıcı faktörler ile fonksiyonelleştirilmiş olması yapay doku ve organ çalışmalarının başarı şansını arttırabilmektedir (Place et al., 2009).

2.3.1. Doku iskeleleri

Doku iskelelerinin sentezlenmesi için farklı yöntemler kullanılabilmektedir. Her yöntemin kendine göre avantaj ve dezavantajları olduğundan, çalışılan doku veya organa göre yöntemin belirlenmesi en iyi sonucun elde edilebilmesi açısından önem taşımaktadır. Doku mühendisliğinde kullanılan iskelelerin üretiminde poliglikolik asit (PGA), polilaktik asit (PLLA), bu iki polimerin kopolimerleri ve polikaprolakton (PCL) başta olmak üzere sentetik polimerler ve kolajen, kitosan, jelatin gibi doğal polimerler kullanılabilmektedir (Ma, P. X., 2004).

İskele üretimi için geleneksel olarak çözücü-dökme parçacık-süzme, gaz köpürmesi, elyaf elenmesi/elyaf bağlanması, faz ayırma, eritme döküm, emülsiyon kuru dondurma, çözelti dökme ve kuru dondurma yöntemleri kullanılmaktadır (Sachlos and Czernuszka, 2003). Doğal olmayan polimerler ile üretilen iskelelerin hücre tutunması için uygun olduğu ve doku farklılaşması için

kullanılabileceği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Ancak bu polimerlerin *in vivo* ya da *in vitro* yıkımı sonucunda ortaya çıkan asidik bileşenler ideal doku büyümesi için gerekli mikroçevre için sorun teşkil edebilmektedir (Chan and Leong, 2008). Bu bileşenlerin mikroçevre pH'sında meydana getirdiği en ufak değişimler bile hücrelerin farklılaşmasını veya uygun fonksiyonlarını göstermesini engelleyebilmektedir. Doğal olmayan polimerlerin hücreler için tanınmış olan bir yüzey kimyasına sahip olmaması doku iskelesi çalışmalarının kolajen, elastin, glikoprotein, proteoglikan, laminin ve fibronektin üzerine yoğunlaşmasına neden olmaktadır. Doğal olmayan polimer iskelelerin doğal polimerler ile zenginleştirilmesi bu dezavantajları giderme yönünde kullanılan yöntemlerden birisidir (Shim et al., 2008). Geleneksel yöntem ile yapılan doku iskelesi üretimlerinin en büyük problemlerinden biri de iskele por çaplarının, çapların uzaysal geometrisinin ve dağılımının hassas bir şekilde kontrol edilememesidir. Tüm bu ortak dezavantajlara ek olarak her yöntemin kendine has dezavantajları da bulunabilmektedir.

Bu sınırlamaların giderilmesi amacıyla katı serbest form üretim, üç boyutlu yazıcı, steriolitografi, faz değiştirme jet yazıcı ve iskelelerin biyolojik olarak üretilmesi gibi yöntemler kullanılmaktadır (Liu et al., 2007). Doku iskeleleri, doğal olmayan polimerler ile yapıldığında yukarıda belirtilen mikroçevrenin değişmesi gibi olumsuzluklarla karşılaşılabilirdiğinden bu farklı yaklaşımlar arasında iskelelerin biyoteknolojik yöntemler kullanılarak üretilmesi en ön sıralarda yer almaya başlamaktadır. Araştırmacılar kolajen gibi hücre tutunmasını çok iyi teşvik eden ancak bazı çalışmalar ile immün yanıt oluşturabildiği gösterilen doğal polimerler yerine biyouyumlu aynı zamanda immün yanıtı da neden olmayan selüloz gibi polimerlere yönelmişlerdir (Svensson, A. et al., 2005).

Selüloz, bitkilerin hücre duvarının yapısında bulunan ve üstün özelliklere sahip olan bir polimerdir. Fiber yapıları kolajen ile benzerlik göstermesine rağmen bitkisel selülozdan elde edilen fiberlerin çaplarının çok büyük olması bu polimerin doku mühendisliği çalışmalarında kullanımını sınırlayan faktörlerden birisidir. Aynı zamanda bitkilerde çoğunlukla selülozun hemiselüloz, lignin ve pektin gibi doku mühendisliği çalışmaları için safsızlık olarak nitelendirilebilecek polimerler ile birlikte olması ve bu polimerlerden selülozun saflaştırılması işleminin maliyetinin çok yüksek olması diğer bir dezavantajdır (Klemm et al., 2001). Saflaştırma işleminin kimyasal yöntemler ile yapılması durumunda bu kimyasalların çok iyi bir şekilde uzaklaştırılması gerekmektedir. Tüm bu

sınırlamalar nedeniyle selüloz doku mühendisliği çalışmalarında hak ettiği yeri uzun süre boyunca bulamamıştır.

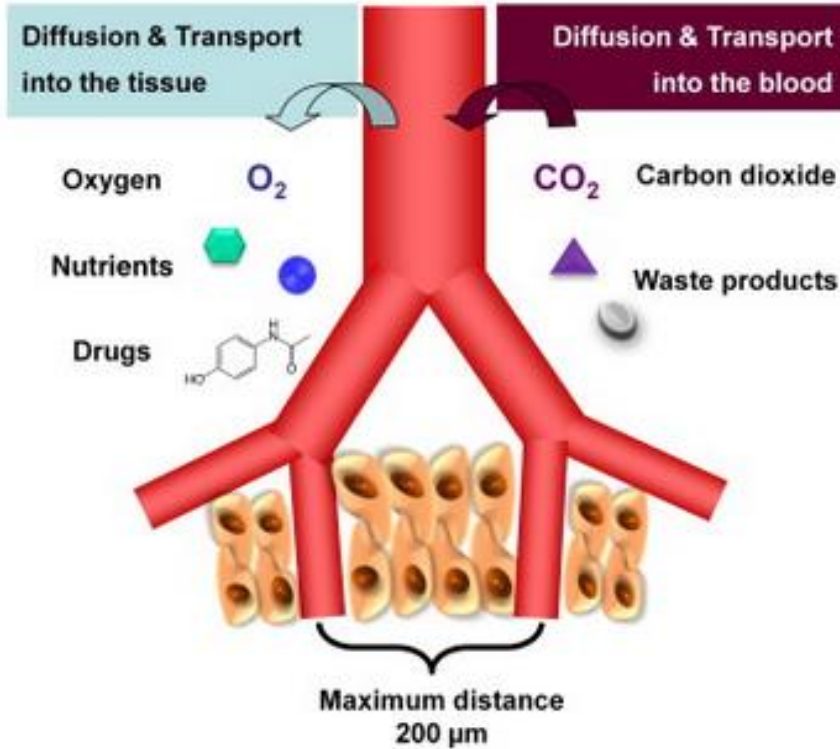
Selüloz doğada bitkiler haricinde bazı algler, funguslar ve bakteri türleri tarafından da sentezlenebilmektedir. Bakteriler tarafından sentezlenen selüloz mikrobiyal selüloz ya da bakteriyel selüloz olarak adlandırılmaktadır. Kimyasal olarak bitkisel selüloz ile aynı yapıya (glikopiranoz birimlerinin β -1,4 bağları ile bağlanması ile oluşan dallanmamış bir glukan zinciri) sahip olan BS, fiziksel ve kimyasal olarak bitkisel selüloza göre üstünlükler taşımaktadır (Czaja et al., 2007). Saf halde üretilmesi, bu nedenle karmaşık ve yüksek enerji girdili saflaştırma basamaklarına ihtiyaç duymaması, bu üstünlüklerin başında gelmektedir (Keshk, 2014). BS hücre dışına sentezlenen bir polimerdir. Bakterinin hücre çevresinde bulunan nano-porlardan hücre dışına sentezlenmekte, farklı porlardan çıkan fiberler bir araya gelerek bakteriyel selüloz fiberlerini oluşturmaktadır. Çapları 70-150 nm arasında değişen bu fiberler çok yüksek porozite ve yüzey alanı sağlamaktadır (Klemm et al., 2006). Bakteriyel selülozun su tutma kapasitesi kendi ağırlığının 100-1000 katı arasında değişebilmektedir. Çok fazla su tuttuğu için bir hidrojel sahip olduğu özellikleri taşımakta, fiberler arasındaki kovalent ve hidrojen bağları sayesinde ise çok yüksek mekanik özellikler sergilemektedir (Bäckdahl et al., 2006; Watanabe et al., 1998).

Bakteriyel selüloz, yüksek biyouyumluluk, hayvan hücrelerinin sentezlediği enzimlerle bozunmama, hücre tutunmasına olanak sağlama ve uygun mekanik özellikleri nedeniyle kan damarı (Esguerra et al., 2010) ve kıkırdak doku mühendisliği (Svensson, Anna et al., 2005) çalışmalarında doku iskelesi materyali olarak kullanılmıştır. Bakteriyel selüloz, başta *Acetobacter xylinum* olmak üzere *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* ve *Sarcina* türleri tarafından sentezlenebilen nanofibriler ağısı yapıya sahip hücre dışı bir polisakkarittir (Cheng, K.-C. et al., 2011; Helenius et al., 2006; Vitta and Thiruvengadam, 2012; Wei et al., 2011). Bakteriyel selülozun gözenek yapısı bakterinin kültür şartları ile değiştirilerek istenilen gözenek boyutu sağlanabilmektedir. Öte yandan sahip olduğu çok sayıda hidroksil grup ve kovalent bağlar sayesinde farklı bileşik veya moleküllerle kolaylıkla yüklenebilmektedir. Literatürde bildirilen çalışmalarda kullanılan ve başarılı bir şekilde yükleme yapılan maddeler arasında nanopartiküller, doku mühendisliğinde kullanılmak amacıyla osteoblastik büyüme faktörü gibi büyüme faktörleri, doğal polimerler, sentetik polimerler, bitki özütleri, antimikrobiyal ajanlar bulunmaktadır (Ciechańska, 2004; Gutierrez et al., 2012; Hobzova et al.,

2012; Lin et al., 2013; Maneerung et al., 2008; Saska, Sybele et al., 2012; Wang, J. et al., 2011; Wei et al., 2011).

2.3.2. Doku mühendisliğinde damarlandırma yöntemleri

Doku mühendisliği ile üretilen dokuların *in vitro* veya *in vivo* olarak yeterince vaskülerize olmaması sebebiyle, şu an için bu dokuların kullanımı oldukça sınırlıdır. Vücuttaki hücreler yaşayabilmek için en yakın kılcal damarın 100-200 μm yakınında konumlanırlar (Novosel et al., 2011) (Şekil 2.9). Laboratuvarıda üretilen vaskülerize olmayan doku vücuda nakledildiğinde oksijen ve besin iletiminin yetersizliği gibi sorunlar dokunun *in vivo* integrasyonunu sınırlamaktadır. Bu sebeple üretilen dokunun, hücre ve doku tipine göre gerekli oksijen ve besin difüzyon hızına uygun olarak implantasyondan önce vaskülerize edilmesi önemlidir. Doku mühendisliğinde kullanılan; iskele fonksiyonelleştirme, hücre temelli teknikler, mikro-elektromekanik sistem yaklaşımları, biyoreaktör dizaynı, modüler düzenleme, *in vivo* sistemler ve 3B biyoyazıcı sistemleri gibi vaskülarizasyon teknikleri bulunmaktadır (Lovett et al., 2009).



Şekil 2.9. Hücrelerin kan damarı çevresindeki yerleşimi (Novosel et al., 2011).

İskele fonksiyonelleştirme yöntemi, kullanılacak doku iskelesinin anjiyogenik faktörler ile basitçe yüklenmesi, polimer içerisine bu faktörlerin

enkapsüle edilmesi, protein füzyonu ile veya kimyasal olarak bağlanması temeline dayanır. Ayrıca kullanılacak iskelenin oksijen ve besin difüzyonuna olanak sağlayacak şekilde mikro-kanallı veya poröz bir yapıya sahip olması için en etkili biçimde dizayn edilmesi de iskele fonksiyonelleştirme başlığı altında değerlendirilebilir (Lovett et al., 2009). Anjiyogenik faktörler ile iskelenin yüklenmesi işlemi sonucunda HDM daha iyi taklit edilir. Diğer yöntemlere göre en basit tekniktir.

Hücre temelli vaskülarizasyon tekniklerinin başında endotel hücrelerin anjiyogenik faktörlerin varlığında fibroblast gibi farklı morfolojideki hücre tipleriyle ko-kültürü gelmektedir. Özellikle kemik ve adipoz dokunun vaskülarizasyonu için bu şekilde yapılan çalışmalar bulunmaktadır (Wenger et al., 2004). Bu çalışmaların dışında, mezenkimal kök hücre gibi bazı hücre tiplerinin transfekte edilip aşırı anjiyogenik faktörler salgılaması sağlandıktan sonra, endotel hücrelerin bu transfekte edilmiş hücreler ile ko-kültive edilmesi de bulunmaktadır (Geiger et al., 2007). Kanseri hücreleri doğal olarak aşırı anjiyogenik faktör salgılama yeteneğine sahip olduğundan, kanser hücreleri ile endotel hücrelerin ko-kültürü de vaskülarizasyon çalışmalarında olumlu sonuçlar vermektedir. Ayrıca hipoksik şartlar altında önceden şartlandırılmış ortamda çeşitli hücreler ile çalışılmış ve endotel hücrelerin anjiyogenez ve vaskülarizasyonunda artış gözlemlenmiştir (Hadjipanayi and Schilling, 2013).

Doku iskelelerinin başlıca sorunları arasında, iskelenin ortalarına doğru gidildikçe oksijen ve nütrient transferinin azalmasına paralel olarak hücre canlılığının azalması bulunmaktadır. Vaskülarizasyon çalışmalarında hücre canlılığı ve besin-oksijen transferi büyük önem taşıdığından bu dezavantajlardan kurtulmak amacıyla dönen ve perfüzyon biyoreaktörler kullanılmaktadır (Cartmell et al., 2003). Yatay dönen biyoreaktörler kemik, kırık ve kalp dokusunun vaskülarizasyonu çalışmalarında kullanılmıştır. Vasküler perfüzyon biyoreaktörleri ise genellikle bir doku tipini damarlandırma çalışmaları yerine kan damarları üretmeye yönelik kullanılmaktadır.

Mikro-elektromekanik sistem yaklaşımları ise sentetik ve doğal iskele polimerlerinin mikro-vasküler ağ gibi yapılması için kullanılacak iskelenin işlenmesidir. Öncelikle ağı yapıda pozitif veya negatif bir kalıp oluşturulur ve mikrovasküler polimer iskele bu kalıp kullanılarak üretilir (Therriault et al., 2003). Benzer bir işlem hidrojel içerisine jelatin gibi bir doğal polimerden vasküler yapının oluşturulması ve sonrasında jelatinin eritilerek uzaklaştırılması

ile hidrojelin içerisinde boşluklu bir yapı oluşması sağlanabilmektedir (Bettinger et al., 2006). Sonuçta her iki yöntemde de mikro-kanallı, oksijen ve besin transferine olanak tanıyacak doğal vasküler yapıda bir iskele elde edilir. Üretilen bu iskeleye ekilen endotel hücreler mikrovasküler boşlukların çevresini sardığı için mikro yapıda damar boşlukları oluşur.

Modüler düzenleme tekniklerinden biri, hidrojelden oluşturulmuş mikro iskeleler üzerine ekilen endotel hücrelerinin bir reaktör içerisinde istenilen tipteki hücreler ile birlikte kendiliğinden düzenlenerek mikro-dokuların arasında oluşan boşluklarla beraber vaskülerize bir makro-doku elde edilmesidir (Kelm et al., 2006). İkinci teknik ise hidrojel içerisinde tek veya çok kanallı yapılar oluşturulması ve böylece vaskülarizasyonun en temel problemi olan oksijen-nütrient difüzyonunun elimine edilmesidir.

In vivo sistem tekniklerinde vaskülarizasyon canlının içerisinde oluşturulur. *In vitro* şartlarda elde edilen tek hücre tabakası özel bir hücre kültür kabından düşük sıcaklıklarda tabaka şeklinde kaldırılır ve canlıya transplante edilir. Bu hücre tabakası 1-3 gün içerisinde damarlanır ve üzerine yeni bir hücre tabakası transplante edilir. Böylece her eklenen tabaka canlı içerisinde damarlanarak sonuçta vaskülerize bir doku elde edilebilmektedir. Bu yöntem kullanılarak Sekine ve arkadaşlarının çalışmasında 1 mm kalınlığa kadar kalp kası damarlandırılabilirdiği belirtilmiştir (Sekine et al., 2006). Diğer bir *in vivo* yöntem ise canlının atardamarı ve toplardamarının kesilip damar veya sentetik bir greft ile paralel bir kan akışının sağlanması, bir arteriyovenöz hazne ile kapatılması (Lokmic et al., 2007) ve bu hazneye boş HDM iskele koyularak damarlandırılmasıdır (Lovett et al., 2009).

Yeni bir teknoloji olarak 3B biyoyazıcılar vaskülerize doku oluşumunda kullanılabilmektedir. Bu yazıcıların kartuşlarında damarlandırılmak istenen dokunun hücreleri, damarlanmayı sağlayacak endotel hücreleri ve doku iskelesi için kullanılacak polimer bulunmaktadır. Vaskülerize doku, istenen şekil ve boyutta, istenen mikro-makro vasküler yapıda oluşturulabilmektedir (Mironov et al., 2011). Bu yöntem yukarıda bahsedilen yöntemlerin önüne geçebilecek nitelikte bir yöntemdir. Hem kolay hem de 3B biyoyazıcıların herkesin ulaşabileceği kadar yaygın ve ucuz olması bu yöntemin en büyük avantajlarından. Ancak bu yöntemin en büyük dezavantajı dokuyu istenen şekilde oluşturabilmek için bir program yazıcısına ihtiyaç duyulmasıdır.

2.3.3. Kemik greftleri

Kemik kırık ve çatlakları, enfeksiyonları, anomaliler, cerrahi müdahaleler sonucu ortaya çıkan çeşitli kemik defektleri ile dış kayıplarının tedavisinde kullanılabilen kemik greftleri mevcuttur ve sıklıkla kullanılmaktadır. Kemik greftlerinin bu gibi defektlerde kullanılabilmesinin en önemli nedeni, doğal kemik hücrelerinin büyüyecek yer bulduğunda diğer dokulardan farklı olarak tamamen yenilenebilme özelliğindendir. Kemik hücreleri bu greftlere tutunup büyür, proliferer olur ve yenilenecek doğal kemik dokusu oluşturabilir.

Kemik greftleri olarak genellikle bireyin başka bir kısmından alınan otogreftler veya aynı türden fakat genetik olarak farklı bir bireyden veya kadavradan alınan allogreftler kullanılmaktadır (Bauer and Muschler, 2000). Demineralize kemik matriksi, otolog kemik iliği, kemik morfojenik protein (BMP), doğal veya yapay seramikler ve büyüme faktörleri de kemik defektlerinin onarımında tercih edilebilmektedir (Kofron and Laurencin, 2006). Ancak bütün bu kullanılan materyallerin dezavantajlarını ortadan kaldırabilmek ve avantajlarını bir araya getirebilmek için, ayrıca kemik greftlerinin kullanılabilirliğini arttırmak ve maliyeti azaltmak için doku mühendisliği uygulamaları ile üretilen greftler büyük önem kazanmıştır.

Kemiğin tam olarak tedavi olabilmesi için, yeni oluşan kemik dokusunun eski dokuya tamamen entegre olabilmesi ve mekanik kuvvetlere karşı direnç kazanması gerekmektedir. Bu sebeple kullanılan greftlerin bazı özelliklere sahip olması beklenmektedir. Bunlar arasında en çok öne çıkan özellikler; osteokondüktif, osteoindüktif, osteojenik, biyobozunur ve biyouyumlu olmaları, osteointegrasyona ve vaskülarizasyona izin verir yapıda olmalarıdır (Götz et al., 2008). Osteokondiksüyon, bireyin kendi kemik dokusundan grefte vasküler ve perivasküler yapının ilerleyerek, greft üzerinde yeni kemik dokusunun oluşmasına izin verilmesidir. Osteoindüksiyon, osteoprogenitör hücrelerin uyarılarak osteoblastlara dönüşmesi ve dolayısı ile yeni kemik dokusu oluşmasını sağlamasıdır. Osteogenez, hücreli implante edilen greftte bulunan hücrelerin implantasyondan sonra yaşamlarına devam ederek kemik doku oluşturabilmeleridir. Osteointegrasyon ise greftin kemik yüzeyine tam olarak tutunabilmesidir. Henüz bütün bu özelliklere birden sahip olan bir kemik grefti bulunmamaktadır, ancak doku mühendisleri, biyomühendisler, tıp doktorları ve malzeme mühendisleri bu konuda oldukça titiz çalışmalar yürütmektedir.

Otogreftlerde, hastanın kendisinden yeni bir ameliyat ile başka bir bölgede yeni bir hasar oluşturma ve kullanılacak materyalin kısıtlı olması gibi çok önemli dezavantajlar bulunmakta (D'antonio et al., 1989), ancak vaskülerize bir kemik kullanılıyorsa hasar onarımı vaskülerize olmayan bir kemiğe göre oldukça kısa zamanda olmaktadır (Shaffer et al., 1985). Kompakt kemiklerde porozite oldukça düşük olduğundan bu kemik greftleri vaskülarizasyona izin vermemekte ve iyileşme sürecini çok yavaşlatmaktadır. Kompakt kemiklerin mekanik dayanımı çok yüksek olmakla birlikte transplante edildikten sonra 6-18 ay içerisinde poröz bir yapıya sahip olmaya başlar, vaskülarizasyona izin verir ve mekanik dayanımlarını kaybederler. Ancak 2 yıla yakın bir süre zarfında eski mekanik dayanımlarına sahip olmaya başlarlar (Şimşek vd., 2004). Fakat bu uzun yenilenme sürecinde hasta greftin kırılması veya yeni bir defekt oluşması gibi bir sorunla karşılaşabilmektedir. Damarlı otogreftler ise bu şekilde bir yıkım ve yapım prosesi geçirmediğinden damarsız greftlere göre daha sağlıklı bir tedavi süreci gerçekleştirirler ve poröz yapısı sayesinde yeni damarlanmalara olanak tanıdıklarından iyileşme sürecini oldukça hızlandırırlar. Başlangıçta mekanik olarak dayanıklı olmasalar da transplantasyondan sonra kemik kütlesi artar ve Wolf kanalları doğrultusunda yeniden yapılanma ile doğal kemik dokusu ile bütünleşerek mekanik dayanım kazanırlar. Ancak, Şimşek ve arkadaşları ameliyatla yeni hasar oluşturulması ve sınırlı greft materyali olmasının oldukça büyük dezavantaj oluşturduğunu belirtmişlerdir (Şimşek vd., 2004). Bütün bunların yanı sıra alogreftlerin doku reddi ve hastalık bulaştırma ihtimali gibi çok önemli iki dezavantajı daha bulunmaktadır (Giannoudis, P. V. et al., 2005). Her ne kadar yıkama basamakları ile hücrelerden, bakteri ve virüslerden arındırılmaya çalışılsa da, allogreftler her zaman için bu konuda risk taşımaktadır. Ancak otogreftlere göre, yeterli miktarda greft elde edebilme ve kişide yeni bir defekt oluşturmama gibi avantajları bulunmaktadır. Otolog kemik iliği ise tek başına osteojenik bir greft olarak kullanılabilir. Hızlı vaskülerize olma özelliğine sahiptir, ancak bireyden alındığı için yeni bir ameliyat gerektirir.

Doku mühendisliği alanında kemik onarımına yönelik çalışmalar, kıkırdak ve deri doku mühendisliğini takiben en yoğun araştırılan teknikler arasına girmiştir (Hutmacher et al., 2007; Kim, H. J. et al., 2008; Koç et al., 2008; Peister et al., 2011; Yilgor et al., 2009). Pek çok klinik deneyde küçük kemik doku mühendisliği ürünleri denenmekle beraber (Bueno and Glowacki, 2009; Gan et al., 2008; Gómez Barrena et al., 2011; Jurgens et al., 2011; Meyer et al., 2006) birkaç santimetreden daha büyük kemik kayıplarında kullanılmak için henüz piyasaya çıkmaya aday doku mühendisliği ürünü yoktur. Bunun en önemli sebebi

kemiğin vaskülarizasyonun çok olması ve doku mühendisliği ile üretilen kemik greftlerinin vücuda implantasyondan sonra yeterli hızla damarlanma sağlayamamasıdır. Bu sebeple yakın zamanda yapılan kemik doku mühendisliği çalışmalarında kemik üretimi ile aynı anda damarlanmayı da sağlayacak yaklaşımlar ön plana çıkmaktadır (Johnson et al., 2011; Rouwkema et al., 2006; Santos et al., 2007; Santos and Reis, 2009; Young et al., 2008). Anjiyogenez, avasküler yapıdaki kıkırdığın damarlı bir kemik dokusuna dönüşümü sırasındaki endokondrial kemikleşme prosesinde bir dönüm noktasıdır (Keramaris et al., 2008). Dolayısı ile kemiğin iyileşme sürecinde vaskülarizasyon ve anjiyogenezin göz ardı edilmesi gibi bir durum söz konusu değildir.

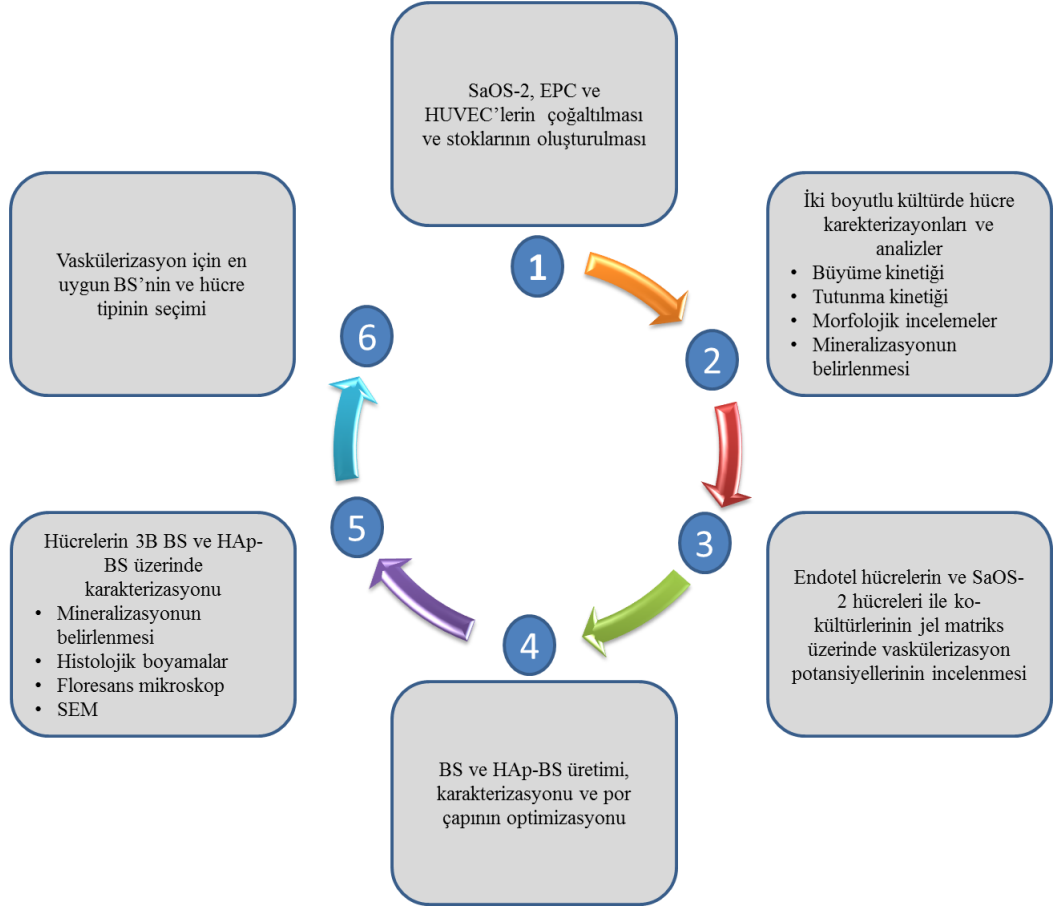
İskelelere implantasyon öncesi damarlanmayı tetikleyici büyüme faktörleri ve/veya endotel hücreler eklenmesi, iskele geometrisine damar benzeri mikroyapılar işlenmesi gibi yaklaşımların yanında, endotel hücrelerle osteoblastların kokültürü sonunda kemiksi yapının içinde damar yapısına benzer oluşumlar elde edilebileceği konusunda denemeler de mevcuttur (Buschmann et al., 2010; Ma, J. et al., 2010; Steffens et al., 2009; Unger et al., 2007). Ancak implantasyon sonrası hızlı damarlanmayı ve konukçu doku ile entegrasyonu sağlayacak geçerli bir strateji henüz ispatlanamamıştır.

Doku mühendisliği iskelelerinin kemik dokusu oluşumuna izin verebilmek bu hücrelerin tutunması, büyümesi ve çoğalmasını arttırabilmek için kemik mikroçevresini taklit edecek şekilde bazı materyallerle işlendiği bilinmektedir. Bu materyallerin en başında HAp, trikalsiyum fosfat (TCP) gibi doğal seramikler, yapay seramikler, demineralize kemik matriksi, kemik ve kıkırdak oluşumunu indükleyici büyüme faktörleri içeren kemik morfojenik protein ve büyüme faktörleri gelmektedir (Kraus and Kirker-Head, 2006).

Demineralize kemik matriksi, allogreftin inorganik minerallerin demineralize edilip organik kolajen bir matriks oluşturulması, partiküllere ayrılması, hücrelerden, yağlardan, bakteri ve virüslerden ayrılması ve sterilizasyonu ile elde edilen materyallerdir. Yapılan çalışmalarda demineralize kemik matriksiyle yüksek bir vaskülarizasyon oranı elde edilerek, osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri ile kemik defektlerinde iyileşme sağlanabilmiştir (Şimşek vd., 2004). Ancak yüksek dozda kullanımı sonucunda vücutta bazı toksik etkilere sebep olabildiği de bildirilmiştir (Wang, J. C. et al., 2001). Ayrıca, allogreft olduğu için yıkama ve sterilizasyon basamaklarından geçmiş olmasına rağmen az da olsa hastalık bulaştırma ve doku reddi ihtimali taşımaktadır.

Doğal seramiklerin en çok kullanılanlarından hidroksiapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, kemiğin mineral yapısına benzerliğiyle vücut tarafından kolayca kabul edilen, yüksek biyouyumululuğa sahip bir implant malzemesi olarak uzun zamandır kullanılmaktadır (Chu et al., 2001; Hing et al., 1999; Legeros, 2002; Martin et al., 1993; Schliephake et al., 1995). Bir seramik olan HAp'ın doku iskelesi olarak biyobozunurluğu çok yavaştır. Oluşan kemiğin doğal kemik dokusu ile tamamen bütünleşebilmesi için doku iskelelerinin biyobozunurluğunun yüksek olması istendiğinden bu bir dezavantaj olarak görülmekte ve biyobozunurluğu arttırıcı çalışmalar yapılmaktadır. HAp taneciklerinin iskele üzerinde homojen dağılımı kompozit yapıda iyi mekanik özellik sağlar ve osteokonduktiviteyi arttırarak kemik yapı oluşumunu destekler (Jose et al., 2009; Jose et al., 2010; Peng et al., 2011; Sendemir Urkmez and Jamison, 2007). Kendi başına iskele olarak kullanılabildiği gibi, başka bir malzeme ile kompozit oluşturularak greft elde edilebilmektedir. Böylece iskele materyalinin ve HAp'ın avantajları tek bir greftte birleştirilebilmektedir. Bakteriyel selülozun gözenekli ağ yapısından, hidroksiapatitin ise kemik mikroçevresini taklit etme ve kemik onarımını teşvik etme (Zhang and Ma, 1999) özelliklerinden faydalanabilmek bu tez kapsamında amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT



Şekil 3.1. Çalışmanın akış planı.

3.1. EPC Hücrelerinin Stoklanması

3.1.1. EPC hücrelerinin çözündürülmesi

EPC hücrelerinin çoğaltılabilmesi ve stoklanabilmesi amacıyla hücreler çözündürülmüştür. Hücre çözündürme protokolü aşağıda belirtilmiştir.

1. İnsan endotel progenitör hücreleri (36053-05, Celprogen, ABD) - 196°C sıvı azot tankından (GT 40, Air Liquide, ABD) çıkartıldı.
2. Tüp içeriği, 37°C'deki su banyosunda sıvı forma geçinceye kadar bekletildi.
3. Laminar akışlı kabin (HS12, Heraeus, Almanya) içerisinde tüp içeriği önceden 37°C'deki su banyosunda ısıtılmış %10 fetal sıgır serumu (FBS)

(S0113, Biochrom AG, Almanya) içeren Human EPC serum free media (M36053-05, Celprogen, ABD) besi ortamı ile santrifüj tüpüne (188 161, Greiner Bio-One, Almanya) toplandı.

4. Toplanan hücreler 100g'de 4°C'de 5 dakika santrifüjlendi (5810 R, Eppendorf, Almanya).

5. Süpernatant döküldükten sonra hücre pelleti hafifçe tüpün dibine vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspanse edildi.

6. Santrifüj tüpünden alınan örnek ile Neubauer Hemositometresinde hücre sayımı yapıldı.

7. Süspanse haldeki hücreler $1,5 \times 10^5$ hücre/ml olacak şekilde EPC hücre dışı matriksi kaplı hücre kültür kaplarına (E36053-05-T25, Celprogen, ABD) alındı.

8. Uygun etiketleme yapıldıktan sonra hücre kültür kapları 37°C' de %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren inkübatörde (HERA Cell 150i, Heraeus, Almanya) inkübasyona bırakıldı.

3.1.2. EPC hücrelerinin çoğaltılması ve pasajlanması

EPC hücrelerinin yeterince çoğaltılabilmesi için uygulanan pasajlama protokolü aşağıda belirtilmiştir.

1. Hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı çekildi.
2. Hücrelerin yüzeyi 37°C'de önceden ısıtılan Ca⁺², Mg⁺², içermeyen fosfat tuz solüsyonu (PBS) (P4417-100 TAB, Sigma, ABD) ile yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine tripsin (% 0,05)-EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) solüsyonu (SH30236.01, HyClone, ABD) eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C'deki inkübatörde bekletildi.
4. Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendiğinde %10 FBS içeren besi ortamı ile hücreler santrifüj tüpüne toplandı.

5. Hücreler 100g'de 4°C'de 5 dakika santrifüjlendi.
6. Santrifügasyon sonrası süpernatant döküldü.
7. Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurarak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspanse edildi.
8. Hücre süspansiyonu 1:3 oranında yeni bir flaska alındı ve üzerine taze besi ortamı koyularak kültüre devam edildi.
9. Hücre kültürünün besi ortamı 2 günde bir taze besi ortamı ile değiştirildi.
10. Hücreler yeterli sayıya ulaşınca -196°C sıvı azot tankında stoklandı.

3.1.3. EPC hücrelerinin dondurulması

EPC hücrelerinin stoklanabilmesi amacıyla uygulanan hücre dondurma protokolü aşağıda belirtilmiştir.

1. Hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı çekildi.
2. Hücrelerin yüzeyi 37°C'de önceden ısıtılan Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine tripsin (% 0,05)-EDTA solüsyonu eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C'deki inkübatörde bekletildi.
4. Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendiğinde %10 FBS içeren besi ortamı ile hücreler santrifüj tüpüne toplandı.
5. Hücreler 100g'de 4°C'de 5 dakika santrifüjlendi.
6. Santrifügasyon sonrası süpernatant döküldü.
7. Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspanse edildi.

8. Hücreler buz üzerinde dondurma ortamı (%90 FBS + %10 dimetilsülfoksit (DMSO) (A3672,0250, AppliChem, ABD) ile homojenize edildikten sonra, 1:3 oranında dondurma tüplerine (kriyotüp) (123278, Greiner Bio-one, Almanya) aktarıldı.

9. Kriyo tüpler -86°C 'de köpük kutu içerisine kaldırıldı.

10. -86°C derin dondurucuda bir gece bekletilen kriyo tüpler, -196°C 'deki sıvı azot içeren tanka kaldırıldı.

3.2. HUVEC Hücrelerinin Stoklanması

3.2.1. HUVEC hücrelerinin çoğaltılması ve pasajlanması

HUVEC hücrelerinin hücrelerinin yeterince çoğaltılabilmesi için uygulanan pasajlama protokolü aşağıda belirtilmiştir.

1. İnsan umbilikal ven endotel hücreleri [Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Koleksiyonu (HÜKÜK), Türkiye] geldiği kültür kabı ve besi ortamında (%10 FBS ve 10 $\mu\text{g/ml}$ gentamisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose (41966-029, Gibco, ABD)) bir gece 37°C 'de %5 CO_2 ve %95-98 nem içeren inkübatörde bekletildi.

2. Hücre kültür kabının tamamını dolduran besi ortamı 50 ml'lik steril santrifüj tüpüne alındı ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de stoklandı.

3. Hücre kültürünün besi ortamı 2 günde bir taze besi ortamı ile değiştirildi.

4. Kültür kabı yüzeyinin %80-90'ını kaplayan hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı çekildi.

5. Hücrelerin yüzeyi 37°C 'de önceden ısıtılan Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkandı.

6. Hücrelerin üzerine tripsin (% 0,05)-EDTA solüsyonu eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C 'deki inkübatörde bekletildi.

7. Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendiğinde %10 FBS içeren besi ortamı ile hücreler santrifüj tüpüne toplandı.
8. Hücreler 1000 rpm 4°C 5 dakika santrifüjlendi.
9. Santrifügasyon sonrası süpernatant döküldü.
10. Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspansiyon edildi.
11. Hücre süspansiyonu 1:3 oranında yeni bir flaska alındı ve üzerine taze besi ortamı koyularak kültüre devam edildi.
12. Hücre kültürünün besi ortamı 2 günde bir taze besi ortamı ile değiştirildi.
13. Hücreler yeterli sayıya ulaşınca -196°C sıvı azot tankında stoklandı.

3.2.2. HUVEC hücrelerinin dondurulması

HUVEC hücrelerinin stoklanabilmesi amacıyla uygulanan hücre dondurma protokolü aşağıda belirtilmiştir.

1. Hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı çekildi.
2. Hücrelerin yüzeyi 37°C'de önceden ısıtılan Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine tripsin (% 0,05)-EDTA solüsyonu eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C'deki inkübatörde bekletildi.
4. Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendiğinde %10 FBS içeren besi ortamı ile hücreler bir santrifüj tüpüne toplandı.
5. Hücreler 1000 rpm 4°C 5 dakika santrifüjlendi.
6. Santrifügasyon sonrası süpernatant döküldü.

7. Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspanse edildi.

8. Hücreler buz üzerinde dondurma ortamı (%90 FBS + %10 DMSO ile homojenize edildikten sonra, 1:3 oranında kriyotüplere aktarıldı.

9. Kriyotüpler -86°C 'de köpük kutu içerisine kaldırıldı.

10. -86°C derin dondurucuda bir gece bekletilen kriyotüpler, -196°C 'deki sıvı azot içeren tanka kaldırıldı.

3.3. SaOS-2 Hücrelerinin Stoklanması

3.3.1. SaOS-2 hücrelerinin çözündürülmesi

SaOS-2 hücrelerinin çoğaltılabilmesi ve stoklanabilmesi amacıyla hücreler çözündürülmüştür. Hücre çözündürme protokolü aşağıda belirtilmiştir.

1. Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü hücre stoğundaki kriyotüp -196°C 'den çıkarıldı.

2. 37°C 'deki su banyosunda sıvı forma geçinceye kadar bekletildi.

3. Laminar akışlı kabin içerisinde tüp içeriği önceden 37°C 'deki su banyosunda ısıtılmış %10 FBS içeren DMEM F12 (BE12-719F, Lonza, İsviçre) besi ortamı ile santrifüj tüpüne toplandı.

4. Toplanan hücreler 1000 rpm'de 4°C 'de 5 dakika santrifüjlendi.

5. Süpernatant döküldükten sonra hücre pelleti hafifçe tüpün dibine vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspanse edildi.

6. Süspanse haldeki hücreler hücre kültür kaplarına alındı.

7. Uygun etiketleme yapıldıktan sonra hücre kültür kapları 37°C 'de %5 CO_2 ve %95-98 nem içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

3.3.2. SaOS-2 hücrelerinin pasajlanması

SaOS-2 hücrelerinin hücrelerinin yeterince çoğaltılabilmesi için uygulanan pasajlama protokolü aşağıda belirtilmiştir.

1. Hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı çekildi.
2. Hücrelerin yüzeyi 37°C’de önceden ısıtılan Ca^{+2} , Mg^{+2} , içermeyen PBS ile yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine tripsin (% 0,05)-EDTA solüsyonu eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C’deki inkübatörde bekletildi.
4. Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendiğinde %10 FBS içeren besi ortamı ile hücreler santrifüj tüpüne toplandı.
5. Hücreler 1000 rpm’de 4°C’de 5 dakika santrifüjlendi.
6. Santrifügasyon sonrası süpernatant döküldü.
7. Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurarak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspanse edildi.
8. Hücre süspansiyonu 1:3 oranında yeni bir flaska alındı ve üzerine taze besi ortamı koyularak kültüre devam edildi.
9. Hücre kültürünün besi ortamı 2 günde bir taze besi ortamı ile değiştirildi.
10. Hücreler yeterli sayıya ulaşınca -196°C sıvı azot tankında stoklandı.

3.3.3. SaOS-2 hücrelerinin dondurulması

SaOS-2 hücrelerinin stoklanabilmesi amacıyla uygulanan hücre dondurma protokolü aşağıda belirtilmiştir.

1. Hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı çekildi.

2. Hücrelerin yüzeyi 37°C’de önceden ısıtılan Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine tripsin (% 0,05)-EDTA solüsyonu eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C’deki inkübatörde bekletildi.
4. Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendiğinde %10 FBS içeren besi ortamı ile hücreler bir santrifüj tüpüne toplandı.
5. Hücreler 1000 rpm 4°C 5 dakika santrifüjlendi.
6. Santrifügasyon sonrası süpernatant döküldü.
7. Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspanse edildi.
8. Hücreler buz üzerinde dondurma ortamı (%90 FBS + %10 DMSO ile homojenize edildikten sonra, 1:3 oranında kriyotüplere aktarıldı.
9. Kriyotüpler -86°C’de köpük kutu içerisine kaldırıldı.
10. -86°C derin dondurucuda bir gece bekletilen kriyotüpler, -196°C’deki sıvı azot içeren tanka kaldırıldı.

3.4. Hücrelerin Tutunma Testleri

İki boyutlu kültürde hücrelerin kültür kabı yüzeylerine tutunma sürelerinin belirlenmesi amacıyla tutunma testleri gerçekleştirilmiştir.

1. Tutunma testi için hücreler 6 gözlü pleyte 10^6 hücre/göz olacak şekilde 3 tekrarlı olarak ekildi.
2. Her hücrenin besi ortamından gözlere 2’şer ml eklendi ve 37°C’de, %5 CO_2 ve %95-98 nem içeren inkübatörde bekletildi.
3. Hücreler tutunana kadar 15 dakikada bir pleytlerin 3 gözündeki besi ortamından homojen örnekler alınarak Neubauer hemositometresinde tripan mavisi kullanılarak sayıldı.

4. Sayım yapılan besi ortamında hücre kalmayınca kadar sayıma devam edildi.

3.5. Hücrelerin Kalibrasyon Eğrisinin Çıkarılması

Hücrelerin büyüme kinetikleri, 20 gün boyunca MTT analizi ile belirlenmiştir. MTT analizinde absorbansa karşılık gelen hücre sayısını belirleyebilmek için hücrelerin kalibrasyon eğrileri çıkarılmıştır. Uygulanan protokol aşağıda belirtilmiştir.

1. Hücreler 96 gözlü pleyte farklı konsantrasyonlarda (10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 ve 10^7 hücre/göz), 5 tekrarlı olacak şekilde hücre ekimi yapıldı (Şekil 3.2).

2. Kültür kabı yüzeyine hücre tutunmasını takiben (3 saat sonra) MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid, sarı tetrazolyum tuzu, M5655, Sigma, ABD] testi uygulandı.

3. MTT için, pleytteki kullanılmış besi ortamı çekildi.

4. Hücrelerin üzerine %10 MTT (5 mg/ml konsantrasyonda) içeren besi ortamı eklendi.

5. Hücreler karanlıkta 37°C'de, %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren inkübatörde 3 saat süre ile inkübe edildi.

6. 3 saat inkübasyonun sonunda MTT içeren ortam çekildi.

7. Hücrelerin üzerine DMSO (8.02912.2500, Merck, Almanya) eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözülmesi sağlandı.

8. Hücreler 10 dakika boyunca 300 rpm' de çalkalayıcıda çalkalanarak kristallerin iyice çözünmesi sağlandı.

9. UV spektrofotometrede (MDS Molecular Devices, Versa Max, ABD) 570-690 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri kaydedildi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^3 hücre/göz	5×10^3 hücre/göz	10^4 hücre/göz	5×10^4 hücre/göz	10^5 hücre/göz	5×10^5 hücre/göz	10^6 hücre/göz	5×10^6 hücre/göz	10^7 hücre/göz			
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Şekil 3.2. Kalibrasyon eğrisi için deney şablonu. A1-E1 gözleri: 10^3 hücre, A2-E2 gözleri: 5×10^3 hücre, A3-E3 gözleri: 10^4 hücre, A4-E4 gözleri: 5×10^4 hücre, A5-E5 gözleri: 10^5 hücre, A6-E6 gözleri 5×10^5 hücre, A7-E7 gözleri 10^6 hücre, A8-E8 gözleri: 5×10^6 hücre ve A9-E9 gözleri 10^7 hücre içeren gözleri ifade etmektedir. Her deneme 5 paralelli gerçekleştirilmiştir.

3.6. Hücrelerin Büyüme Kinetiğinin Çıkarılması

Hücrelerin 20 gün boyunca canlılıklarının incelenmesi amacıyla aşağıda belirtilen protokol uygulanmış ve büyüme kinetikleri elde edilmiştir.

1. Hücreler 96 gözlü pleytlere 1000 hücre/göz olacak şekilde kendi ortamları içerisinde ekildi.
2. Ekildikten sonra düzenli olarak 20 gün boyunca her gün MTT ile canlılık testi yapıldı.

3.7. SaOS-2 Hücrelerinin Osteojenik Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

Osteoblast benzeri olan SaOS-2 hücrelerinin osteojenik farklılaşma ajanları ile kültivasyonu sonucu osteoblast hücreye farklılaşp, mineralize matriks üretim potansiyellerinin incelenmesi amacıyla Alizarin red S ve Von Kossa boyamaları gerçekleştirilmiştir.

1. Osteojenik farklılaşma potansiyelleri incelenecek SaOS-2 hücreleri 5×10^4 hücre/göz olacak şekilde osteojenik farklılaşma ortamı içerisinde, kontrol SaOS-2 hücreleri ise aynı hücre konsantrasyonunda %10 FBS içeren DMEM F12 besi ortamında 6 gözlü pleytlere ekildi.

2. Besi ortamı 2 günde bir tazelendi.
3. Kùltürün 7-14 ve 21 günlerinde osteojenik farklılaşmanın tespiti için Alizarin red S ve Von Kossa boyama protokolleri uygulandı.
4. SaOS-2 hücreleri için kullanılan osteojenik farklılaşma ortamının kompozisyonu aşağıdaki gibidir:

- DMEM F12 (BE12-719F, Lonza, İsviçre)
- %10 FBS (S0115, Biochrom AG, Almanya)
- %0.1 gentamisin (15710-049, Gibco, ABD)
- 10 nM deksametazon (D2915, Sigma-Aldrich, ABD)
- 10 mM β - gliserofosfat (G9891, Sigma-Aldrich ABD)
- 50 μ M askorbik asit (A8960-5G, Sigma-Aldrich, ABD)

3.7.1. Alizarin red S boyama

1. Hücrelerin üzerindeki kullanılmış besi ortamı uzaklaştırıldı.
2. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen soğuk (+4°C) PBS ile iki kez yıkandı.
3. Soğuk (+4°C) %4 paraformaldehit (PFA) (19943, Affymetrix/USB, ABD) ile 30 dakika, 300 rpm' de çalkalanarak (Heidolph Titramax, Almanya) fikse edildi.
4. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen soğuk (+4°C) PBS ile tekrar iki kez yıkandı.
5. Distile su içerisinde hazırlanan ve pH'ı 4.1- 4.3 aralığına ayarlanan Alizarin red solüsyonu (%2) (A5533-25G, Sigma, ABD) ile 2-3 dakika inkübe edildi.
6. İnkübasyon sonrasında distile su ile üç defa yıkandı.

7. Örnekler ters faz ışık mikroskopunda incelendi.

3.7.2. Von Kossa boyama

1. Hücrelerin üzerindeki kullanılmış besi ortamı uzaklaştırıldı.
2. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen soğuk ($+4^{\circ}\text{C}$) PBS ile iki kez yıkandı.
3. Soğuk (4°C) %4 PFA ile 30 dakika, 300 rpm' de çalkalanarak fikse edildi.
4. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen soğuk ($+4^{\circ}\text{C}$) PBS ile tekrar iki kez yıkandı.
5. Distile su içerisinde hazırlanan gümüş nitrat solüsyonu (%5) (A3944,0025, AppliChem, Almanya) ile karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
6. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile tekrar üç defa yıkandı.
7. Kuyucukların kurumasını engellemek için az miktarda PBS eklenerek 1 saat boyunca mor ötesi ışık (UV) altında, kapağı açık bir şekilde bekletildi.
8. Distile su ile üç kez yıkandı.
9. Distile su içerisinde %5 sodyum thiosülfat (KIM-STS/01CP/051003, Kimetsan, Türkiye) çözeltisi hazırlandı.
10. Kuyucuklara %5 sodyum thiosülfat çözeltisi eklenerek 2-5 dakika inkübe edildi. Sodyum thiosülfat ile inkübasyonun amacı arka planın giderilmesi, kalsiyum depozitlerinin daha belirgin hale getirilmesidir.
11. Distile su ile üç kez yıkandı.
12. Örnekler ters faz ışık mikroskopunda incelendi.

3.8. Bakteriyel Selüloz Doku İskelelerinin Hazırlanması

Vaskülarizasyonun sağlanacağı 3B BS doku iskelelerinin hazırlanabilmesi için öncelikle üretimde kullanılan *Acetobacter xylinum* ATCC 700178 suşunun aktivasyonu gerçekleştirildi. Aktifleşmiş suş kullanılarak Hestrin Schramm (HS) sıvı besin ortamında HAp içeren ve içermeyen BS üretildi ve yıkama prosedürü uygulandı. Üretilen BS'lerin karakterizasyonları yapıldı.

3.8.1. *Acetobacter xylinum* ATCC 700178 suşunun aktifleştirilmesi ve BS üretimi

BS üretimi için kullanılan bakteri suşunun üretimden önce 1-2 gün süre ile aktive edilmesi gerekmektedir. Bu sebeple BS üretiminden önce aşağıda belirtilen prosedür uygulanmıştır.

1. HS sıvı besin ortamı hazırlandı, 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi.
2. -20°C'deki stok kültürden alınan *A. xylinum* HS sıvı besin ortamına aktarıldı.
3. 30°C'de 150 rpm çalkalama hızında 1-2 gün inkübasyon sonrası oluşan pelletler %0,025 HAp (BoneMIX, INOVA Med. Ltd., Türkiye) içeren ve içermeyen HS sıvı besin ortamında 5 gün süreyle hareketsiz olarak inkübe edildi.

BS üretiminde kullanılan HS sıvı besin ortamı (Hestrin & Schramm, 1954) kompozisyonu aşağıdaki gibidir:

- Distile su
- %2 glukoz (1083421000, Merck, Almanya)
- %0,5 maya özütü (1037530500, Merck, Almanya)
- %0,5 bakteriyolojik pepton (LP0037, Oxoid)
- %0,115 sitrik asit (1002441000, Merck, Almanya)

- %0,27 Na₂HPO₄ (106585, Merck, Almanya)

3.8.2. BS por çaplarının optimizasyonu

3B BS üzerinde vaskülarizasyon çalışmasının gerçekleşebilmesi için, BS por çaplarının hücrelerin porlara girebilecek kadar büyük olması gerekmektedir. Bunun için aşağıdaki prosedür gerçekleştirilmiştir:

1. Hestrin Schramm sıvı besiyeri hazırlandı, 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi.
2. -20°C’deki stok kültürden alınan *A. xylinum* HS sıvı besiyerine aktarıldı.
3. Farklı konsantrasyonlarda agar içeren (%0,1 - %0,3 - %0,4 - %0,5 - %0,7 - %0,9) %0,025 HAp içeren ve içermeyen HS sıvı besin ortamı hazırlandı ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi.
4. 30°C’de 150 rpm çalkalama hızında 1-2 gün inkübasyon sonrası oluşan pelletler farklı kompozisyonlardaki HS sıvı besin ortamında 5 gün süreyle hareketsiz olarak inkübe edildi.

3.8.3. BS yıkama prosedürü ve sterilizasyonu

BS’nin bakterilerden arındırılması amacıyla aşağıda belirtilen protokol uygulanmış ve hücre kültüründe kullanabilmesi için steril hale getirilmiştir.

1. Inkübasyon sresinin sonunda üretilen BS’ler distile suda yıkandıktan sonra 0,1 M NaOH içerisinde 80°C’de bir gece bekletildi.
2. 80°C’den alınan BS’ler taze 0,1 M NaOH içerisinde 20 dakika kaynatıldı.
3. BS ditile su içerisinde 20 dakika kaynatıldı ve bu işlem BS beyaz bir renk alana kadar tekrarlandı.
4. 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi.

3.8.4. BS karakterizasyonu

3.8.4.1. FTIR (Fourier transform kızılötesi spektroskopisi) analizi

Üretilen BS'lerin HAp içerip içermediğini belirlemek amacıyla saf HAp, saf BS ve HAp içerdiği düşünülen BS'nin FTIR analizi yapıldı.

1. Üretilen BS'ler yıkandıktan sonra liyofilize (Labconco Freezone 6 Freeze Dryer, ABD) edildi.
2. $500\text{ cm}^{-1} - 4000\text{ cm}^{-1}$ dalga numaraları arasında FTIR (Frontier FT-IR/NIR Perkin Elmer, ABD) analizi yapıldı.

3.8.4.2 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)

BS'lerin yüzey incelemesini gerçekleştirmek, por çaplarını ve selüloz liflerinin çaplarını inceleyebilmek amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir.

1. BS'ler yıkandıktan sonra -80°C 'de donduruldu.
2. Üzerleri alüminyum folyo ile kaplanarak delikler açıldı.
3. BS'ler liyofilizatöre koyuldu ve bir gece boyunca liyofilize edildi.
4. SEM incelemesi öncesinde, örnekler pirinç taşıyıcılar üzerine yerleştirildi ve 200 Å kalınlığında altın ile kaplanarak taramalı elektron mikroskopunda (FEI Quanta 250 FEG, ABD) incelendi.

3.8.4.3 EDS (Enerji dağılımlı x-ışınları spektroskopisi) analizi

SEM fotoğrafları çekilen BS'lerin EDS incelemeleri gerçekleştirildi. Saf BS'lerin ve HAp içerdiği düşünülen BS'lerin element analizi yapıldı.

3.8.4.4 XRD (X-ışını kırınım) analizi

Üretilen BS'lerin HAp içerip içermediğini belirlemek amacıyla saf HAp, saf BS ve HAp içerdiği düşünülen BS'nin XRD cihazında (Philips x'pert pro, ABD) x-ışınlarının her kristale özgü kırınımından faydalanılarak materyalin analizi gerçekleştirildi.

1. Üretilen BS'ler yıkandıktan sonra liyofilize edildi.
2. XRD analizi yapıldı.

Çalışma süresince tüm SEM, XRD ve EDS analizleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

3.9. EPC ve HUVEC Hücrelerinin Vaskülarizasyon Potansiyellerinin İncelenmesi

Endotel hücrelerin vaskülarizasyon potansiyellerinin kültür süresi boyunca floresans mikroskopta izlenebilmesi için öncelikle hücreler floresans boya (CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) [C2925, Molecular Probes, ABD]) ile boyandı. Gerçekleştirilen boyama protokolü aşağıda belirtilmiştir. 3B bazal membran matriks (A14132-02, Geltrex, Gibco, ABD) üzerinde hücrelerin vaskülarizasyon potansiyelleri incelendi.

3.9.1. Hücrelerin floresans boya ile boyanması

1. EPC ve HUVEC hücrelerinin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı çekildi.
2. Hücrelerin yüzeyi 37°C'de önceden ısıtılan Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine tripsin (% 0,05)-EDTA solüsyonu eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C'deki inkübatörde bekletildi.
4. Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendiğinde, her tip hücre kendi besi ortamında (%10 FBS ve 10 µg/ml gentamisin içeren) santrifüj tüpüne toplandı.
5. Hücreler 1000 rpm 4°C 5 dakika santrifüjlendi.
6. Santrifügasyon sonrası süpernatantları döküldü.

7. Santrifüj tüplerinin dibindeki hücreler hafifçe vurarak yüzeyden kaldırıldı ve kendi besi ortamlarında 15 μ M konsantrasyonda hazırlanan floresans boya (CellTracker™ Green CMFDA, ABD) solüsyonu ile süspanse edildi.
8. 45 dakika süreyle 37°C %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren ortamda inkübe edildi.
9. Hücreler 1000 rpm 4°C 5 dakika santrifüjlendi.
10. Santrifügasyon sonrası süpernatantları döküldü.
11. Santrifüj tüplerinin dibindeki hücreler hafifçe vurularak yüzeyden kaldırıldı ve FBS içermeyen besi ortamları ile süspanse edildi.
12. 30 dakika süreyle 37°C %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren ortamda inkübasyona bırakıldı.
13. Hücreler 1000 rpm 4°C 5 dakika santrifüjlendi.
14. Santrifügasyon sonrası süpernatantları döküldü.
15. Santrifüj tüplerinin dibindeki hücreler hafifçe vurarak yüzeyden kaldırıldı ve PBS ile 3 kez santrifügasyon yöntemiyle yıkandı.
16. Hücreler floresans mikroskopta (Leica, DMIL, Almanya) incelendi.

3.9.2. Bazal membran matriks ile kaplanmış kültür kaplarının hazırlanması

Hücrelerin vaskülarizasyon potansiyellerini inceleyebilmek amacıyla, 3B kültür ortamının sağlanabilmesi için öncelikle hücre kültür kapları bazal membran matriks ile kaplandı.

1. Kültür kapları kaplanmadan bir gece önce bazal membran matriks -20°C'den 4°C'ye aktarıldı.
2. Bazal membran matriks ile ilgili bütün işlemlerde kullanılacak olan pipet uçları -20°C'de soğutuldu.

3. Bazal membran matriks oda sıcaklığında kaldığı sürece buz üzerinde işlem yapıldı.

4. 96 gözlü pleytlerin 24 gözü hava kabarcığı bırakılmadan 40 µl bazal membran matriks ile kaplandı.

5. Pleyt kullanılıncaya kadar 37°C’de bekletildi.

3.9.3. Hücrelerin 3B bazal membran matriks içeren ortamda kültive edilmesi ve tüp oluşum analizi

Hücrelerin en iyi vaskülarizasyon gösterdiği besi ortamı ve hücre konsantrasyonunu belirlemek için aşağıda verilen prosedür gerçekleştirildi:

1. EPC ve HUVEC hücreleri bazal membran matriks ile kaplanmış 96 gözlü pleyte 2×10^5 hücre/ml, 2×10^6 hücre/ml ve 5×10^6 hücre/ml olacak şekilde 3 farklı konsantrasyonda ve 2 farklı besi ortamında (%10 destek ortamı içeren EPC basal medium ve vaskülarizasyon ortamı) ekildi (Şekil 3.4).

2. Hücrelerin ters faz ışık mikroskobunda ve floresans mikroskopta fotoğrafları çekildi.

3. Hücreler 37°C %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren ortamda inkübasyona bırakıldı.

4. Hücrelerin 2 saatte bir ters faz ışık mikroskobunda ve floresans mikroskopta fotoğrafları çekildi.

EPC ve HUVEC hücreleri için kullanılan vaskülarizasyon ortamı kompozisyonu aşağıdaki gibidir:

- EPC basal medium (Z7030074, Biochain, ABD)
- %2 FBS
- 10 µg/ml gentamisin
- 20 ng/ml bFGF (PMG0035, Gibco, ABD)

- 10 ng/ml VEGF (V4512-5MG, Sigma, ABD)
- 10 ng/ml EGF (E9644-2MG, Sigma, ABD)
- 10 µg/ml heparin (H1027, Sigma, ABD)
- 1 µg/ml hidrokortizon (H4001, Sigma, ABD)
- 50 ng/ml askorbik asit (A8960-5G, Sigma, ABD)

3.10. 3B BS Üzerinde Hücre Kültürü

3.10.1. SaOS-2 hücrelerinin 3B BS üzerinde osteojenik farklılaşma potansiyellerinin incelenmesi

SaOS-2 hücrelerinin BS üzerinde osteojenik farklılaşmalarını ve mineralize matriks oluşturma potansiyellerini gözlemleyebilmek amacıyla hücrelere Alizarin red S ve Von Kossa boyama prosedürleri uygulanmıştır.

1. Osteojenik farklılaşma potansiyelleri incelenecek SaOS-2 hücreleri 1×10^4 hücre/göz olacak şekilde osteojenik farklılaşma ortamı içerisinde farklı por çaplarında, ıslak ve liyofilize BS üzerine 96 gözlü pleytlere, kontrol SaOS-2 hücreleri ise aynı hücre konsantrasyonunda %10 FBS içeren DMEM F12 besi ortamında 96 gözlü pleytlere ekildi.

2. Hücrelerin ortamı 2 günde bir tazelandı.

3. Kültürün 7-14 ve 21 günlerinde osteojenik farklılaşmanın tespiti için Alizarin red S ve Von Kossa boyama protokolleri uygulandı.

3.10.2. EPC, HUVEC ve SaOS-2 hücrelerinin 3B BS üzerine ekimi

1. Standart BS, %0,025 HAp içeren ortamda üretilen standart BS, %0,3 agar içeren ortamda üretilmiş BS, %0,3 agar ve %0,025 HAp içeren ortamda üretilmiş BS, %0,4 agar içeren ortamda üretilmiş BS, %0,4 agar ve %0,025 HAp içeren ortamda üretilmiş BS'ler, 96 gözlü pleytin gözlerine uygun boyutlarda kesildi.

2. Islak ve liyofilize edilmiş formda vaskülarizasyon ortamında bir gece 37°C’de şartlandırıldı.

3. HUVEC ve EPC hücreleri CellTracker™ Green CMFDA ile SaOS-2 hücreleri ise CellTracker™ Red CMTPIX (C34552, Molecular Probes, ABD) floresans boyaları ile boyandı (Bkz. Bölüm 3.10.1).

4. EPC hücrelerinin BS üzerinde optimum damarlanma sağlayacağı hücre sayısını belirlemek için, ıslak ve liyofilize BS üzerine 1×10^6 ve 2×10^6 hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı.

5. EPC ve SaOS-2 hücreleri 1:1 oranda 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde ıslak ve liyofilize BS üzerine ekildi.

6. HUVEC hücrelerinin BS üzerinde optimum damarlanma sağlayacağı hücre sayısını belirlemek için, ıslak ve liyofilize BS üzerine 1×10^6 ve 2×10^6 hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı.

7. HUVEC ve SaOS-2 hücreleri 1:1 oranda 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde ıslak ve liyofilize BS üzerine ekildi.

8. Hücreler kontrol amaçlı aynı oranlarda polistren yüzeye ve basal membran matriks kaplı yüzeye ekildi.

9. Hücrelerin 4 saatte bir ışık mikroskopunda ve floresans mikroskopunda fotoğrafları çekildi.

3.10.3. SEM analizi

BS üzerinde kültive edilen hücrelerin morfolojik olarak incelenebilmesi ve BS’nin por çaplarının 3B kültürasyon için uygunluğunun belirlenebilmesi amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir.

1. Uygulamalar 1. basamaktan 4. basamağa kadar +4°C’de (buz üstünde), 5. basamaktan 11. basamağa kadar ise oda sıcaklığında yapıldı.

2. Örnekler 30 saniye serum fizyolojik ile yıkandı.

3. Serum fizyolojik ile yıkanan örnekler 30 dakika tampon A' da [0.1 M sodyumkakodilat (C-0250, Sigma, ABD) içerisinde hazırlanan glutraldehit (%5) (8.20603.1000, Merck, Almanya) çözeltisinde] bekletildi.

4. Başka bir solüsyon ile yıkanmadan örnekler tampon B'ye [1 M sodyumkakodilat içerisinde hazırlanan sukroz (%7) (1.07651.1000, Merck, Almanya) çözeltisinde] alınarak 30 dakika bekletildi.

5. Başka bir solüsyon ile yıkanmadan tampon C' ye [1 M sodyumkakodilat içinde % 2 ozmiyum tetroksit (201030, Sigma-Aldrich, ABD)] alınarak 30 dakika bekletildi.

6. Tampon C aşamasından sonra örnekler 5 dakika distile suda yıkandı ve bu basamak 2 kez tekrarlandı.

7. Örnekler distile su ile yıkamadan sonra artan derecelerdeki alkol serilerinde 5'er dakika bekletilerek susuzlaştırıldı. Sırasıyla etanol (1.00983.2500, Merck, Almanya) serileri; %35, %50, %70, %85, %95, %100, %100 etanol şeklinde hazırlandı.

8. Alkol serileri tamamlanınca örnekler heksametilidisilazan (HMDS, 8.4324.250, Merck, Almanya) solüsyonunda 5 dakika bekletildi.

9. Üzerlerinden HMDS çekildikten sonra, örnekler kurumaları için oda sıcaklığında 30 dakika tutuldu.

10. Kuruma tamamlandıktan sonra SEM incelemesine kadar desikatör içerisinde bekletildi.

11. SEM inceleme öncesi, örnekler pirinç taşıyıcılar üzerine yerleştirildi ve 200 Å kalınlığında altın ile kaplanarak taramalı elektron mikroskobunda incelendi.

3.10.4. 3B BS üzerinde kültürü yapılan hücreler için immunohistokimyasal boyama

BS üzerinde kulture edilen hücrelerin iskele içerisindeki konumlarını belirleyebilmek ve VEGF, flk-1,flt-1 ve CD31 proteinlerini ifade edip

etmediklerini gözlemleyebilmek amacıyla immunohistokimyasal boyamalar gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen protokol aşağıda belirtilmiştir.

1. Doku iskeleleri %4 paraformaldehit ile 24 saat 4°C’de tespit edildikten sonra üç kez PBS ile yıkandı.
2. İskelelerin kriyostat aracılığıyla 5 µm kalınlığında kesitler alındı.
3. Örnekler -20°C’de bekletildi ve boyama öncesi 37°C’de PBS içerisinde 2 değişim olarak yıkandı.
4. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 10 dakika hidrojen peroksit (H₂O₂ solüsyonu, %3) uygulandı, kesitler 3 defa PBS ile yıkandı (her bir yıkama 5 dakikadır).
5. Bloklama solüsyonu ile 1 saat bloke edildi.
6. Kesitler primer antikorlar ile 12 saat 4°C’de inkübe edildi.
7. Kesitler; anjiyogenezin belirlenmesi amacıyla anti-VEGF (sc-7269 Santa Cruz Biotechnology, ABD), VEGF reseptörlerini tanıyan anti-flt-1 (RB-1527-P, Neomarkers, ABD) ve anti-flk-1 ((RB-1526-P, Neomarkers, ABD) ve EC’ler için anti-CD31 (Ab28364, Abcam, ABD) antikorları ile boyandı.
8. Üç defa PBS ile yıkanan kesitler biotinlenmiş ikincil antikorlar ile 30 dakika inkübe edildi.
9. PBS ile üç defa 5’er dakika yıkanan kesitler streptavidin hidrojen peroksidaz içinde 30 dakika bekletildi.
10. Tekrar PBS ile 3 defa yıkanarak immunoreaktivitenin görünürlüğünü sağlamak üzere 5 dakika diaminobenzidine (DAB) kromojeni uygulandı.
11. Kesitler Mayer’s hematoksilen ile 1 dk boyandıktan sonra distile su ile yıkandı ve immunohistokimya kapatma çözeltisi (Merck Millipore-107961, Almanya) ile kapatıldıktan sonra ışık mikroskobu (Olympus BX-40, Japonya) ile incelendi.

3.10.5. Hücre ve HDM histolojisi için Hematoksilen & Eozin (H&E) boyama

BS üzerinde kùltive edilen hücrelerin iskele içerisindeki konumlarını belirleyebilmek amacıyla aşağıda belirtilen H&E boyama prosedürü uygulanmıştır.

1. 3B iskeleler üzerindeki hücre kùltürleri 2 defa PBS ile yıkandı ve %4 paraformaldehit ile 30 dakika 4°C’de sabitlendi.
2. 2 defa PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra iskelelerin kriyostat aracılığıyla 5 µm kalınlığında kesitleri alındı.
3. Örnekler -20°C’de bekletildi ve boyama öncesi 37°C’de PBS içerisinde 2 değişim olarak yıkandı.
4. Hematoksilen (JT Baker-3870.2500, İngiltere) solüsyonu ile 5 dakika boyandı.
5. Akarsu altında yıkanan kesitler %1 asit-alkol solüsyonu ile diferansiye edildikten sonra eozin boyası (Reach-115935, İngiltere) ile 3 dakika boyandı.
6. Kesitler artan alkol serilerinden (%60, %70, %80 ve %95 ‘lik alkol serisi) geçirilerek ksilen içine alındı.
7. Ksilen içinde 30 dakika bekletilen kesitler entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskop altında incelendi ve fotoğrafları çekildi.

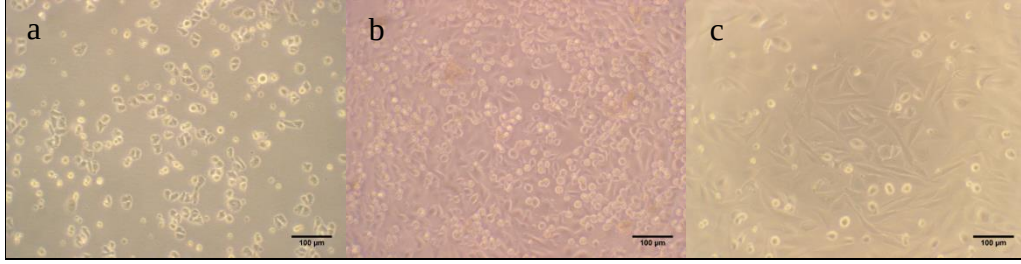
3.11. İstatistiksel Analiz

BS’lerin % porozite analizi sonuçlarında elde edilen nùmerik veriler tek yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak analiz edildi. Tüm sonuçları birbirleri ile karşılaştırabilmek için Tukey testi uygulandı ($p < 0,05$).

4. BULGULAR

4.1. Hücre Morfolojileri

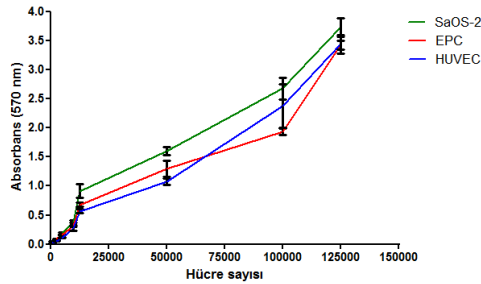
İnsan aort yayı dokusundan elde edilen EPC'ler, insan umbilikal damarından elde edilen HUVEC'ler ve insan kemik dokusundan elde edilen osteoblast benzeri epitel morfolojiye sahip osteosarkom hücreleri (SaOS-2) ters faz ışık mikroskopunda incelendi. Stoktan çözödürölen EPC hücrelerinin yuvarlak ve poligonal şekilli oldukları ancak hücreler költür kabının yüzeyini kaplamaya başladığında iğ şeklini aldıkları gözlemlendi. HUVEC hücrelerinin morfolojilerinin yassı, ince ve poligonal şekilli, SaOS-2 hücrelerinin ise yassı, iğ şeklinde ve EPC ile HUVEC hücrelerine göre daha büyük boyutlu oldukları gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Hücrelerin ters faz ışık mikroskopundaki görüntöleri, a. EPC, b. HUVEC, c. SaOS-2. Ölçek çizgileri 100 µm'ye denk gelmektedir.

4.2. Kalibrasyon Eğrileri

EPC, HUVEC ve SaOS-2 hücreleri için hazırlanan kalibrasyon eğrileri Şekil 4.2'de verilmiştir. Grafiklere ki absorbans değeriğine karşılık gelen hücre sayıları Tablo 4.1'de verilmiştir. MTT testi sonucunda elde edilen absorbans değeriğine karşı gelen hücre sayısının her hücre tipine göre değıştiğı bilinmektedir. Çıkarılan kalibrasyon eğrilerine göre sonuç beklenen şekilde elde edilmiş, her hücre tipine göre aynı hücre sayısında absorbans değeri farklılık göstermiştir.



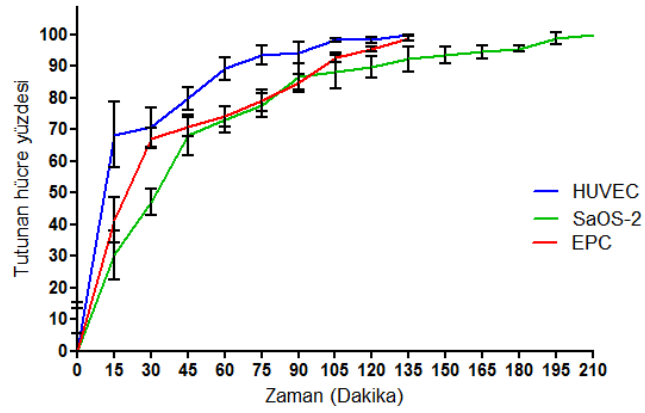
Şekil 4.2. Hücrelerin kalibrasyon eğrileri

Tablo 4.1. Kalibrasyon eğrilerinde absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayıları.

SaOS-2		EPC		HUVEC	
Absorbans değeri	Karşılık gelen hücre sayısı	Absorbans değeri	Karşılık gelen hücre sayısı	Absorbans değeri	Karşılık gelen hücre sayısı
0,1844	1587	0,1626	3525	0,1110	3440
0,3876	8360	0,3160	11195	0,2676	8660
0,9166	25993	0,6778	29285	0,5698	18733
1,6016	48827	1,3010	60445	1,0740	35540
2,6803	84782	1,9306	91925	2,3738	78867
3,7342	119913	3,4252	166655	3,4430	114507

4.3. Tutunma Testleri

EPC, HUVEC ve SaOS-2 hücreleri için hazırlanan tutunma kinetiği grafiği Şekil 4.3'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hücrelerin kültür kabı yüzeyine tutunma süreleri farklılık gösterebilmektedir. EPC ve HUVEC hücreleri 135. dakikada tutunurken, SaOS-2 hücreleri 210. dakikada tutunmuşlardır.



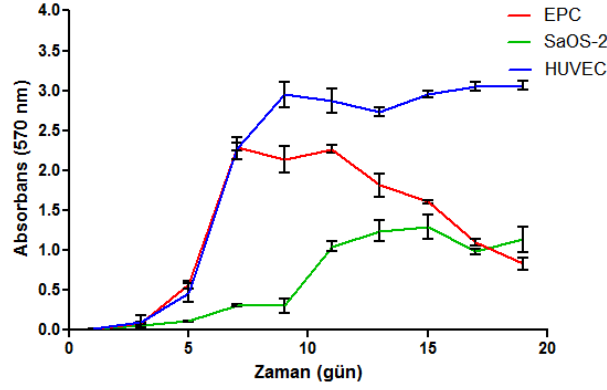
Şekil 4.3. Hücrelerin tutunma kinetikleri.

4.4. Büyüme Kinetikleri

EPC, HUVEC ve SaOS-2 hücreleri için hazırlanan büyüme kinetiği grafikleri Şekil 4.4'te verilmiştir.

Elde edilen grafiğe göre EPC hücrelerinin 7. güne kadar üreme evresinde, 7-11 gün arası durgun evrede olduğu ve 11. günden sonra ölüm evresine geçtiği; HUVEC hücrelerinin 9. güne kadar üreme evresinde, 19. güne kadar ise durgun

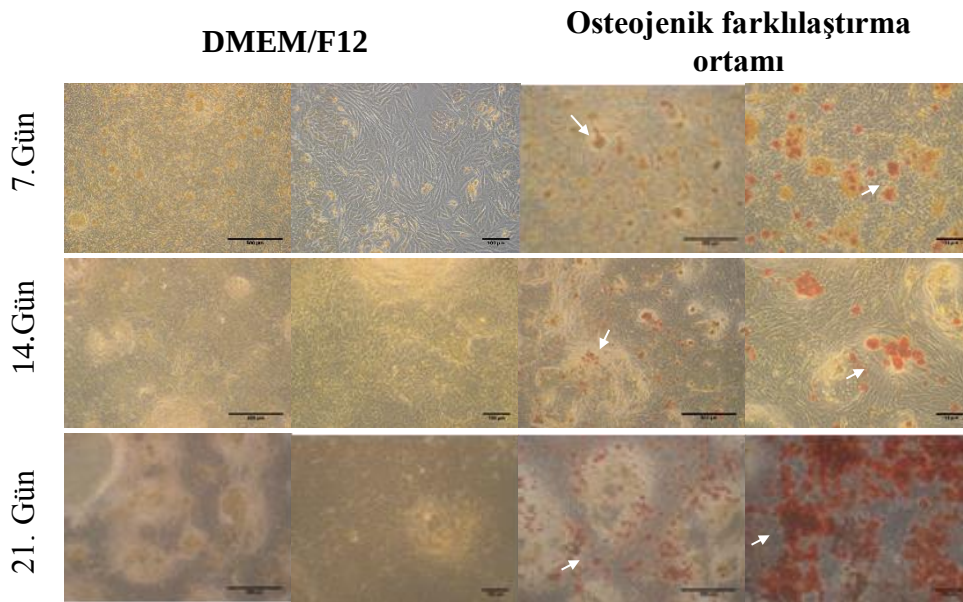
dönemde olduğu; SaOS-2 hücrelerinin ise 11. güne kadar üreme evresinde, 9. güne kadar ise durgun dönemde olduğu görülmektedir.



Şekil 4.4. Hücrelerin büyüme kinetikleri.

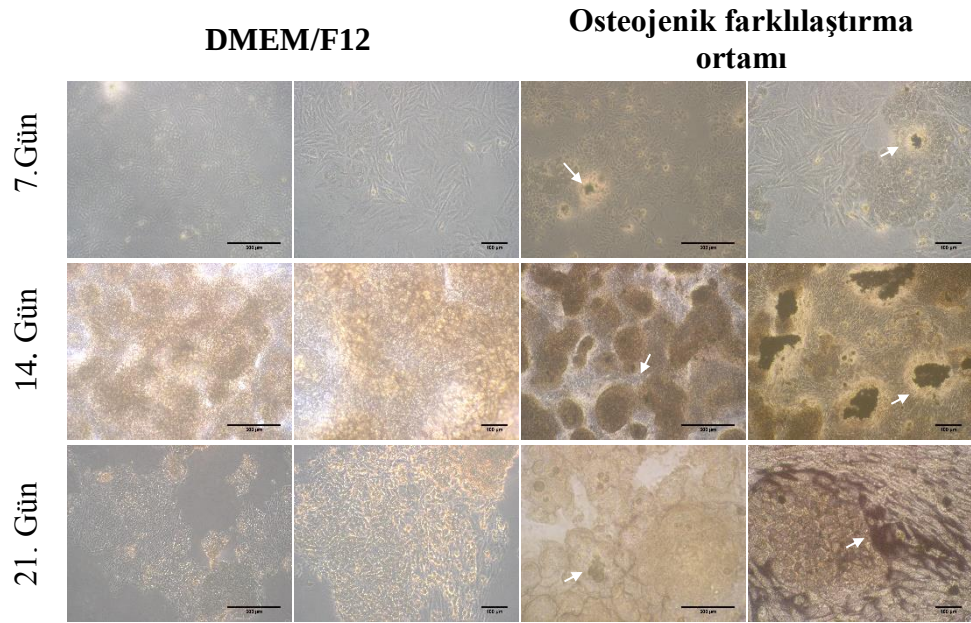
4.5. SaOS-2 Hücrelerinin Osteojenik Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

SaOS-2 hücre hattında minerilizasyon tespiti için 7-14 ve 21. günde yapılan Alizarin red S ve Von Kossa boyamalarının ters faz ışık mikroskobu görüntüleri, bu hücrelerin osteojenik farklılaşma ortamında 7. günde mineral depozitleri oluşturabildiğini ancak normal kültür ortamında mineral depozitleri oluşturmadıklarını göstermektedir. Alizarin red S boyaması sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 4.5'te, Von Kossa boyaması sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.5. Alizarin red S boyaması ile SaOS-2 kültürünün 7-14 ve 21. günlerdeki görüntüleri. Fotoğraflardaki ölçek çubukları 100 µm'ye karşılık gelmektedir.

Alizarin red S boyamasında görüntülerdeki koyu kırmızı bölgeler kalsiyum depozitlerini göstermektedir. Boyanan SaOS-2 kültürü incelendiğinde kontrol grubunda her hangi bir boyamaya rastlanmazken osteojenik farklılaşma ortamı ile inkübe edilen deney gruplarının Alizarin red S ile kırmızı boyandığı görüldü (Şekil 4.5). Bu durum kontrol gruplarında her hangi bir mineralizasyonun olmadığını fakat deney gruplarında ise, kontrolün aksine, kalsiyum depozitlerinin bulunduğunu gösterdi (Şekil 4.5). Kalsiyum depozitlerinin yoğunluğunun inkübasyon süresi ile paralel olarak arttığı tespit edildi. Alizarin red S boyamasından alınan sonuçları desteklemek amacıyla 7-14 ve 21. günlerde yapılan Von Kossa boyamalarının görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Ters faz ışık mikroskopunda yapılan incelemelerde kontrol hücrelerinde hiçbir boyanma görülmezken, deney gruplarında 7-14 ve 21. günlerde mineralizasyon tespit edildi. Osteojenik farklılaşma ortamında yapılan deney gruplarında ise Alizarin red S boyamasına paralel olarak, gün sayısı arttıkça siyaha boyanma miktarında artış gözlemlendi. Bu sonuca göre SaOS-2 hücrelerinin osteojenik farklılaşma ortamında mineral depozitleri oluşturduğu belirlendi.



Şekil 4.6. Von Kossa boyaması ile SaOS-2 kültürünün 7-14 ve 21. günlerdeki görüntüleri. Fotoğraflardaki ölçek çubukları 100 µm'ye karşılık gelmektedir.

4.6. BS Karakterizasyonu

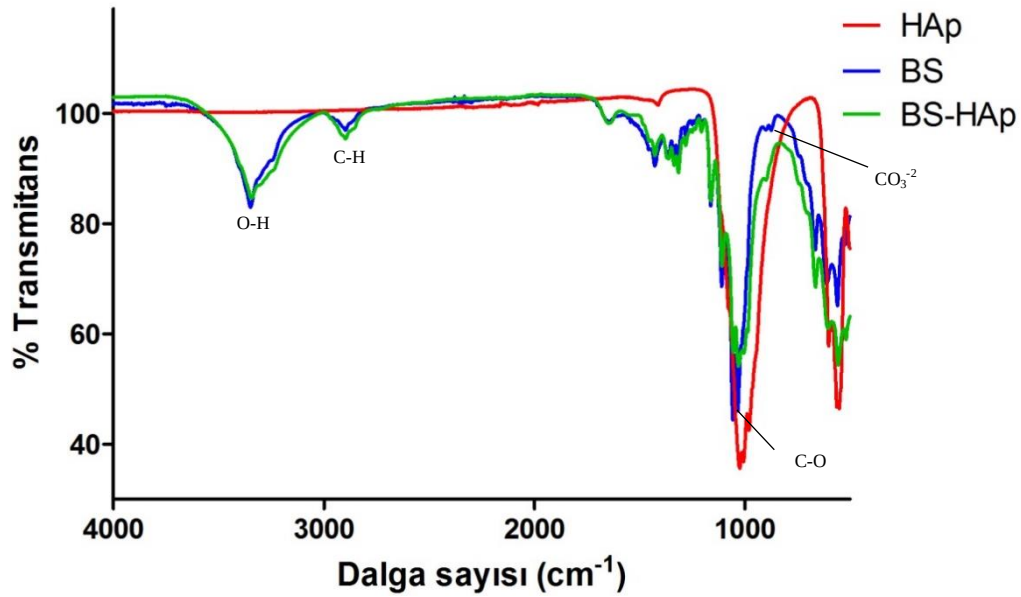
4.6.1. FTIR analizi

BS, HAp ve BS-HAp kompozitinin 500-4000 cm^{-1} arası çizilen FTIR spektrumu Şekil 4.7'de, 500-2000 cm^{-1} arası çizilen FTIR spektrumu ise Şekil

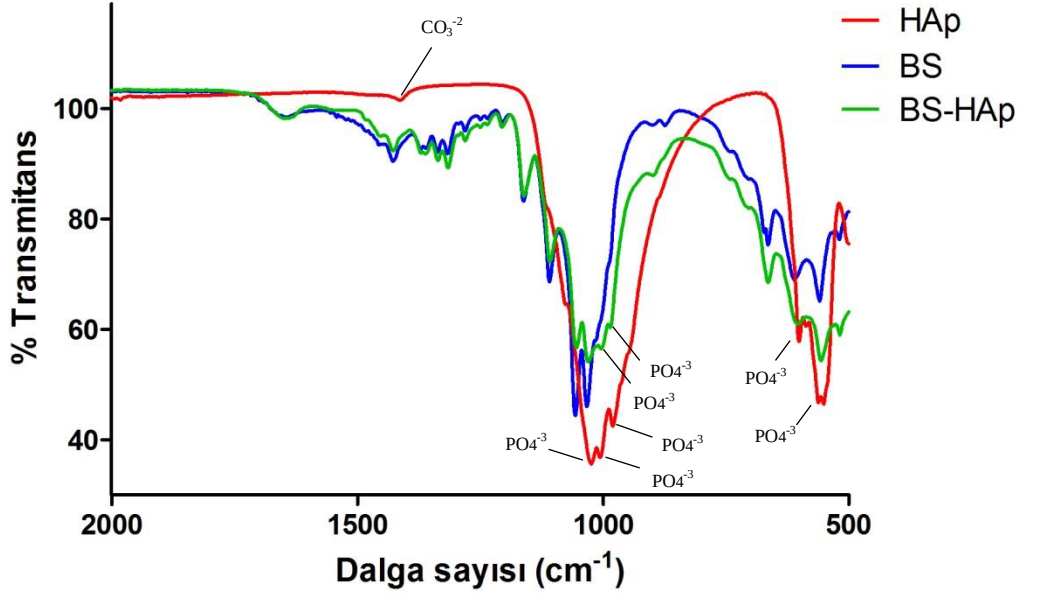
4.8’de verilmiştir. BS’de 3348 cm^{-1} ’de görülen pik bakteriyel selülozdaki hidroksil grubu ve hidrojen bağından, 2896 cm^{-1} ’de görülen pik C-H bağından, 1033 cm^{-1} ’de görülen pik glukoz absorpsiyonuna bağlı olarak C-O bağından ve 874 cm^{-1} ’de görülen zayıf pik karbonat iyonlarından (CO_3^{-2}) kaynaklanmaktadır (Şekil 4.7).

HAp FTIR spektrumunda 3572 cm^{-1} ’de gözlemlenen çok zayıf pik OH grubuna, 1412 cm^{-1} ’de görülen pik CO_3^{-2} grubuna, 1024 cm^{-1} , 950 cm^{-1} - 1000 cm^{-1} arasındaki pikler ve 601 cm^{-1} ile 563 cm^{-1} ’de görülen pikler ise PO_4^{-3} grubuna aittir. (Şekil 4.7).

HAp-BS kompozitinin FTIR spektrumunda gözlemlenen bantlar çoğunlukla BS bantları ile uyushmaktadır. BS’ye spesifik 3348 cm^{-1} ’deki -OH, 2896 cm^{-1} ’deki C-H, 1033 cm^{-1} ’deki C-O grupları ile HAp’a spesifik 950 cm^{-1} - 1000 cm^{-1} arasındaki PO_4^{-3} grupları spektrumda görölmektedir (Şekil 4.8).



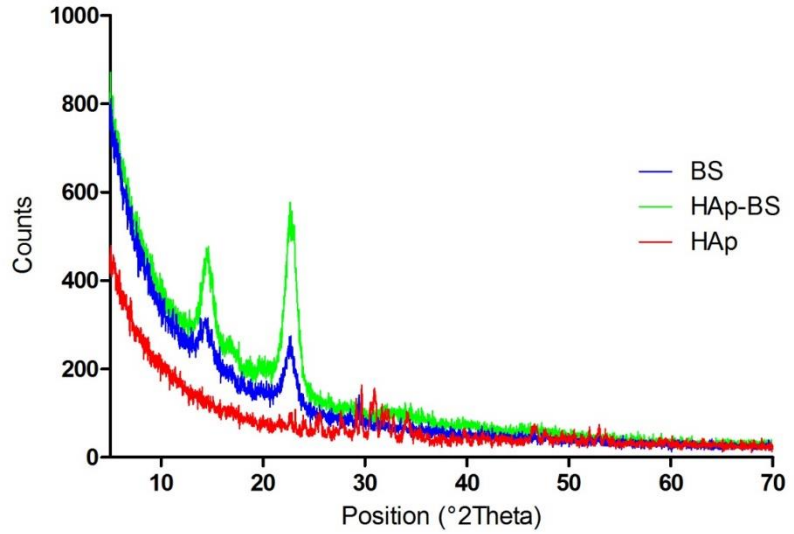
Şekil 4.7. BS, HAp ve BS-HAp kompozitinin 500-4000 cm^{-1} arası çizilen FTIR spektrumu.



Şekil 4.8. BS, HAp ve BS-HAp kompozitinin 500-2000 cm-1 arası çizilen FTIR spektrumu.

4.6.2. XRD analizi

BS, HAp ve BS-HAp kompozitinin XRD grafiği Şekil 4.9’da verilmiştir. BS’nin 14,988°, 16,487° ve 22,782°’de görülen karakteristik pikleri grafikte yer almaktadır. HAp’ın karakteristik pikleri ise 25,879°, 31,662°, 32,767°, 34,005°, 39,633°, 46,563°, 49,415° ve 53,212°’de görülmektedir. BS’de görülen geniş pikler, tamamen kristal yapıya sahip olmadığını göstermektedir. BS-HAp’ın XRD grafiğinde ise, BS’nin karakteristik piklerinin yanı sıra HAp’ın belirtilen tüm pikleri gözlemlenmiştir.

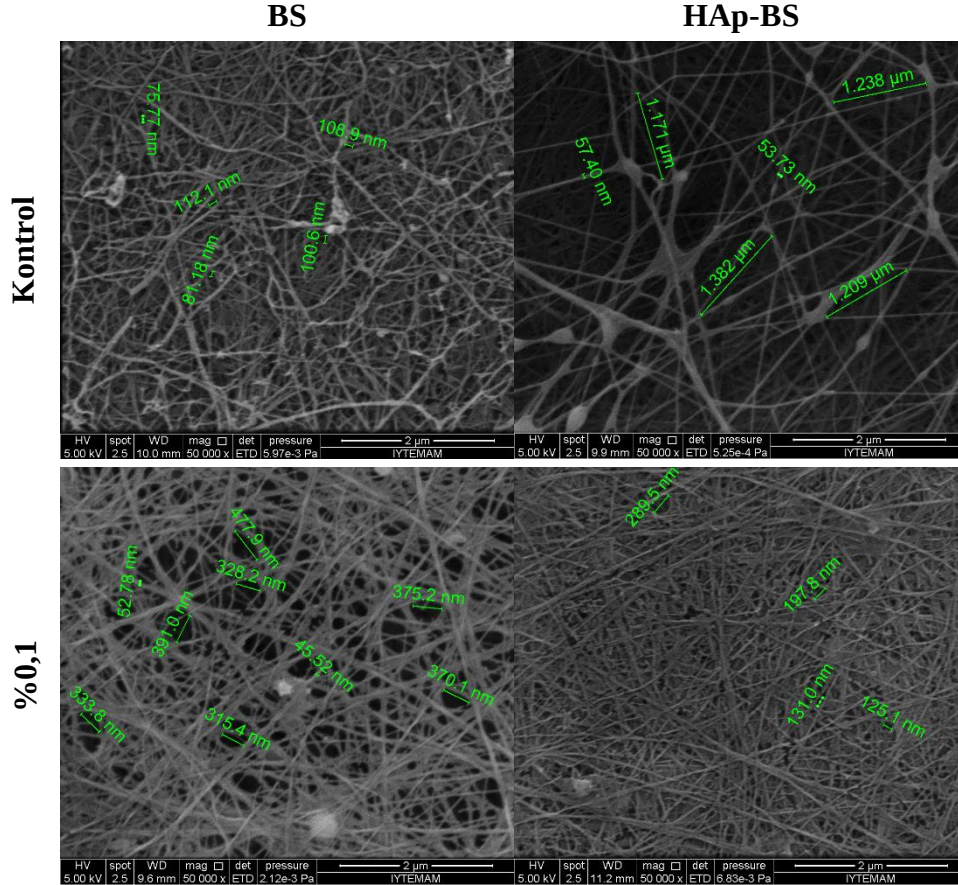


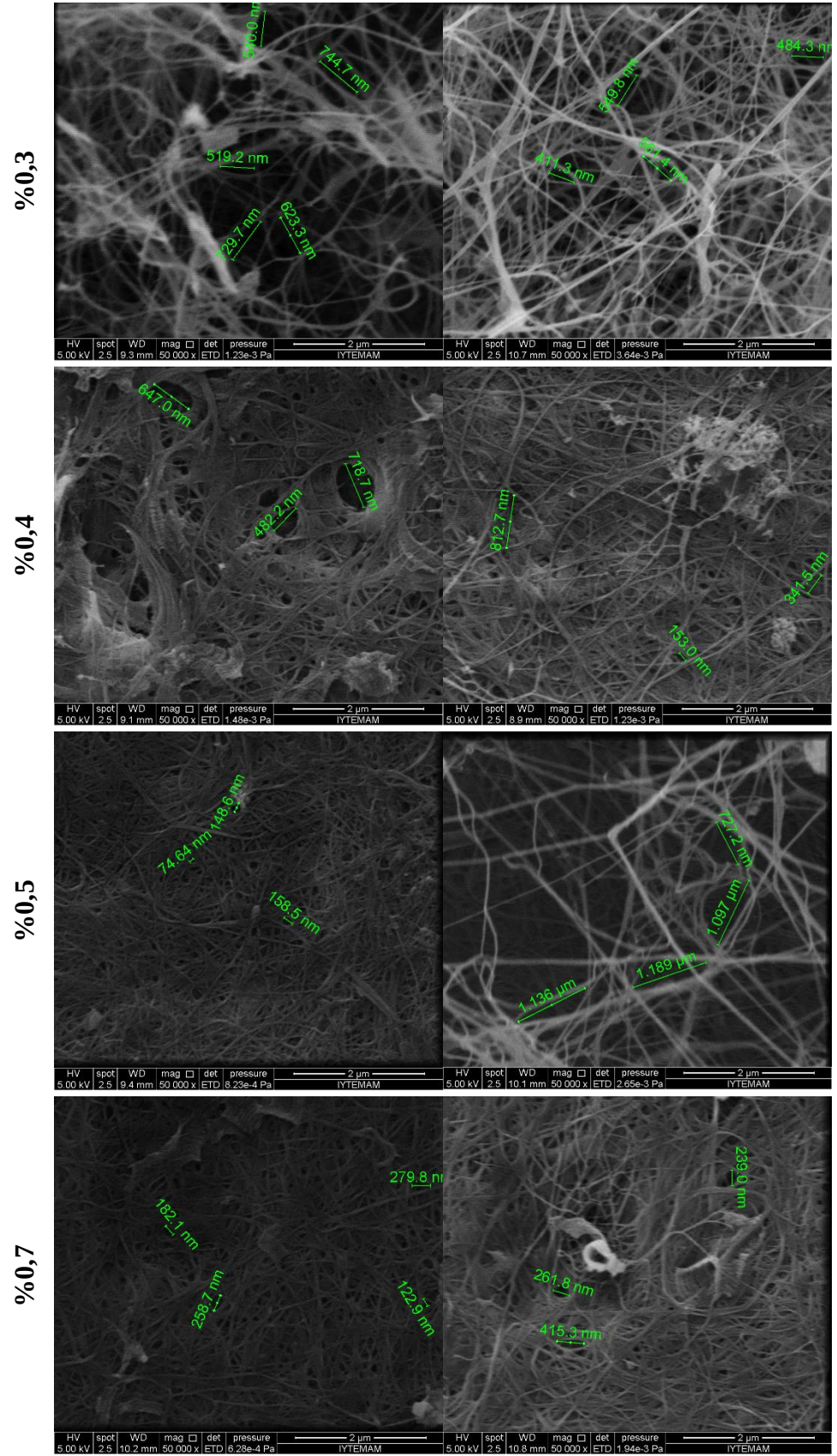
Şekil 4.9. BS, HAp ve BS-HAp kompozitinin XRD grafiği.

4.6.3. SEM analizi

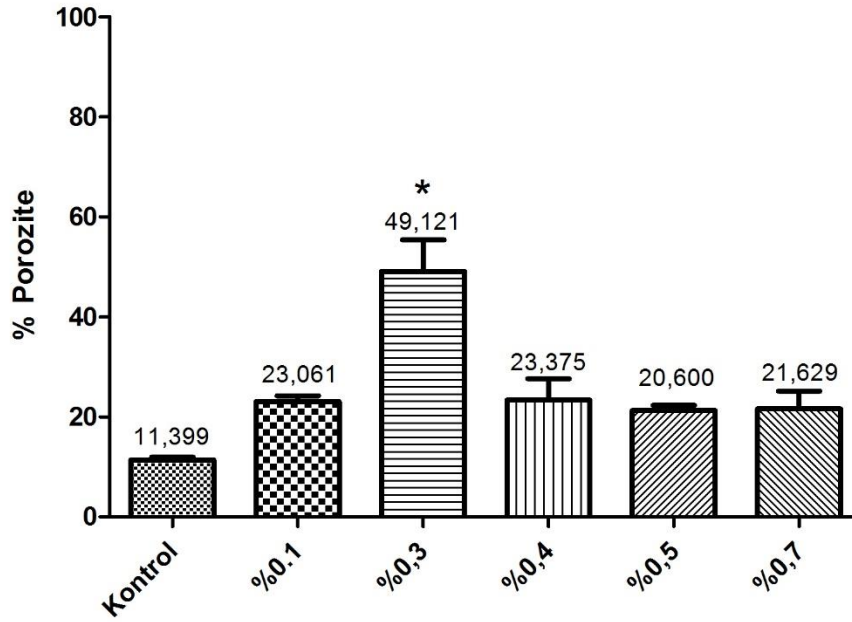
Bakteriyel selülozun vaskülarizasyon için uygun ortam sağlayabilmesi amacıyla yapılan por çaplarını artırma çalışmalarının sonucunda, HS besi ortamına eklenen %0,1 - %0,3 - %0,4 - %0,5 - %0,7 agar ile BS üretimi gerçekleştiren, %0,9 agar ile BS üretimi olmadı. Üretilen bütün BS'lerin SEM analizleri yapıldı ve por çapları belirlendi (Şekil 4.10). Bütün BS tiplerinin % porozite analizleri için "Image J" programı kullanılmış ve %0,3 agarlı ortamda üretilen BS'lerin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (Şekil 4.11).

Kontrol BS'de por çapı 50-200 nm arasında değişmektedir. Por çapları BS için %0,4 agarlı ortama kadar arttığı görülmektedir. Ancak, %0,4 agarlı ortam ve daha yüksek oranda agar içeren ortamlarda BS por çaplarının gitgide kontrole yaklaştığı gözlemlenmiştir. HAp-BS kompozitinin por çaplarının kontrol ve %0,5 agarlı ortamda en yüksek olduğu saptanmasına rağmen, bu liflerin altında sıkıca örülmüş bir BS tabakası varlığı da görülmektedir. Bu istenilen bir durum olmadığından en yüksek por çapı hem BS'de hem de HAp-BS kompozitinde %0,3 agarlı ortamda elde edilmiştir.





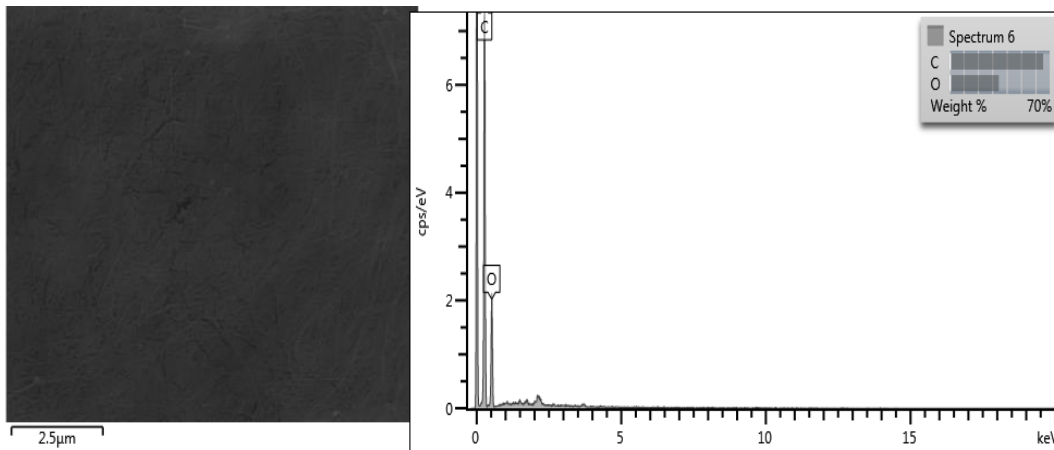
Şekil 4.10. BS por çaplarının belirlenmesi için çekilen SEM görüntüleri. Şekillerin yanındaki oranlar (%) besi ortamı içerisine eklenen agar oranlarını belirtmektedir. SEM görüntüleri 50.000 büyütmede çekilmiştir.



Şekil 4.11. Farklı BS tiplerinin porozite oranları (%). (*) Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olan grupları belirtmektedir ($p < 0,05$).

4.6.4. EDS analizi

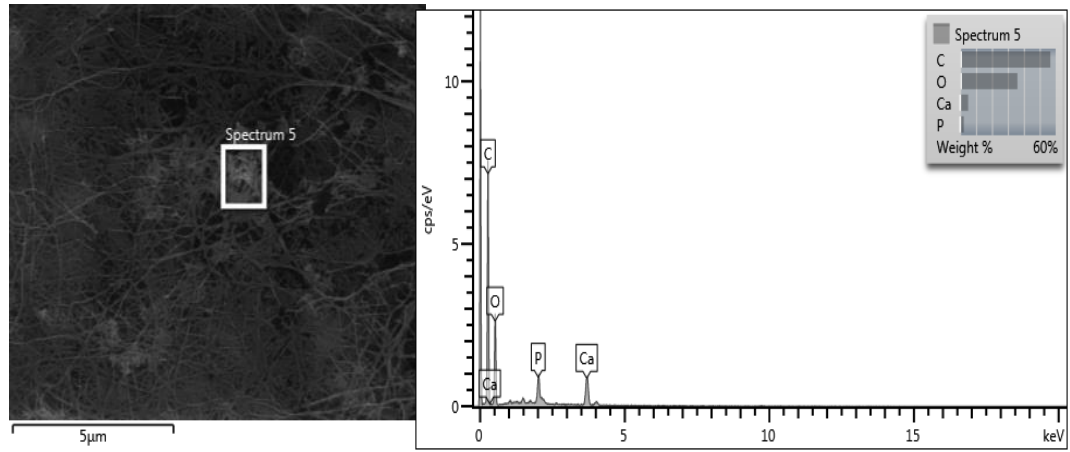
Bakteriyel selülozun HAp içerdiğini gösterebilmek amacıyla, BS-HAp kompoziti ve BS'ye EDS analizi sonucunda BS'de Ca ve P elementine rastlanmamış (Şekil 4.12 ve Tablo 4.2), ancak HAp-BS'de atomik olarak %1,06 P ve %1,75 Ca elementi görülmüştür (Şekil 4.13 ve Tablo 4.3). Ca/P oranının sitokiyometrik olarak çıkması gereken 1,667 değerine oldukça yakın (1,651) olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.12. BS EDS spektrumu.

Tablo 4.2. BS EDS element analiz tablosu.

Element	%Wt	%Atomik
C	65,43	71,60
O	34,57	28,40
Toplam:	100,00	100,00



Şekil 4.13. BS-HAp kompoziti EDS spektrumu

Tablo 4.3. BS-HAp kompoziti EDS element analiz tablosu.

Element	%Wt	%Atomik
C	56,66	65,83
O	35,96	31,36
P	2,35	1,06
Ca	5,03	1,75
Toplam:	100,00	100,00

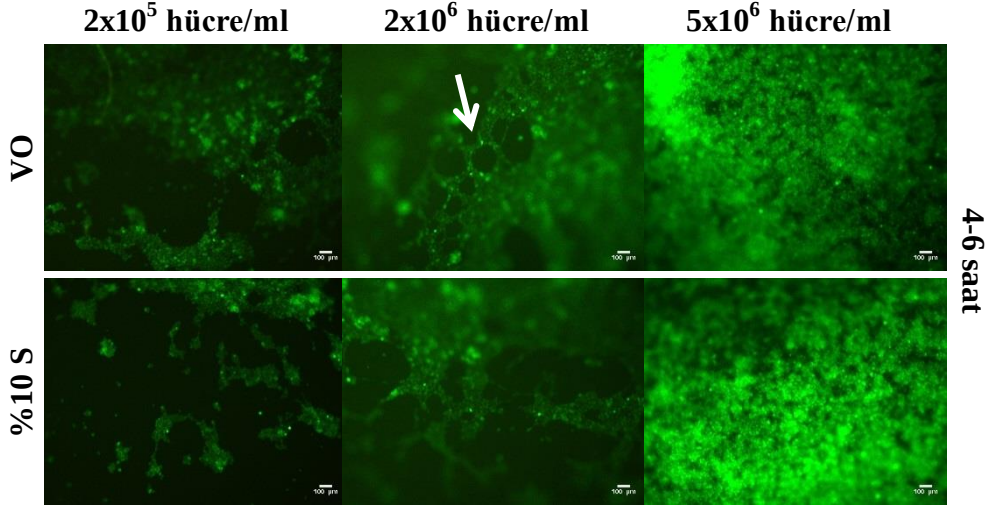
4.7. EPC ve HUVEC Hücrelerinin Vaskülarizasyon Potansiyellerinin İncelenmesi

4.7.1. 3B bazal membran matrisi üzerinde hücre kültürü

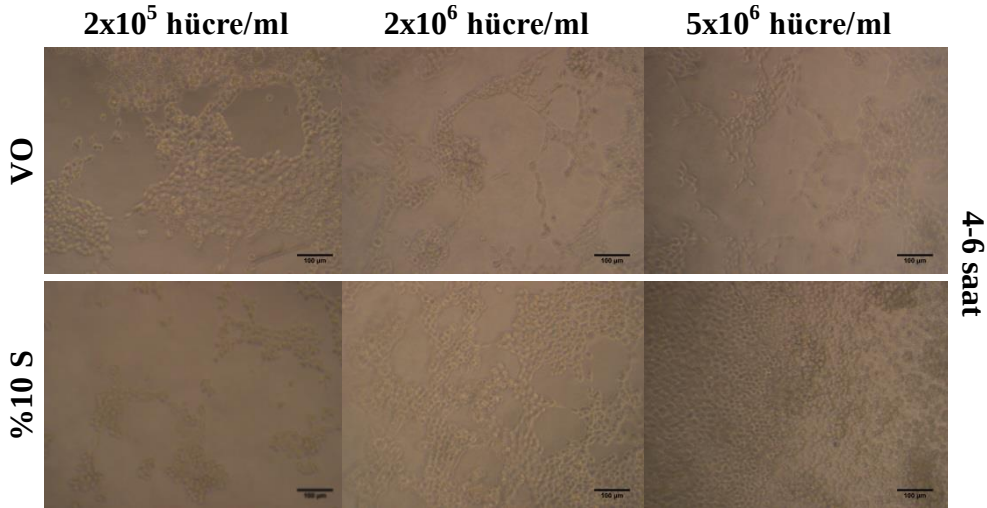
Endotel hücrelerin 3B ortamda tüp oluşumunu sağlayıp sağlamadığını analiz etmek amacıyla EPC ve HUVEC'ler 3B bazal membran matrisi üzerine ekilmiştir. Vaskülarizasyonun sağlanabilmesi için optimum hücre konsantrasyonunu belirlemek amacıyla 3 farklı hücre konsantrasyonu (2×10^5

hücre/ml – 2×10^6 hücre/ml – 5×10^6 hücre/ml) denenmiş, ayrıca %10 EPC growth medium supplement (S) içeren ortam ve vaskülarizasyon ortamı (VO) tüp oluşumu yönünden karşılaştırılmıştır.

Tez kapsamında tüp oluşumunun analiz edilmesi amacıyla yapılan tüm ters faz ışık ve floresans mikroskobu görüntüleri eklerde verilmiştir. Tez içerisinde sadece anlamlı sonuçların elde edildiği görüntüler sunulmuştur.

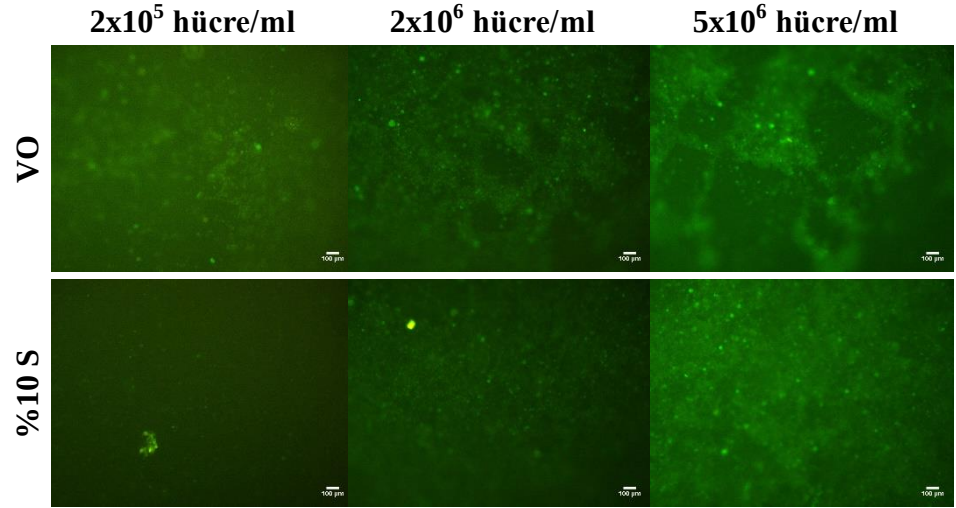


Şekil 4.14. HUVEC'lerin farklı hücre konsantrasyonları (2×10^5 hücre/ml – 2×10^6 hücre/ml – 5×10^6 hücre/ml) ve farklı ortamlarda 3B bazal membran matriks üzerinde 4-6 saat kültivasyon süreli floresans mikroskop fotoğrafları. Ölçek çubukları $100 \mu\text{m}$ 'ye karşılık gelmektedir. VO, vaskülarizasyon ortamını, %10 S ise, %10 oranında EPC growth medium supplement içeren ortamı temsil etmektedir.



Şekil 4.15. HUVEC'lerin farklı hücre konsantrasyonları (2×10^5 hücre/ml – 2×10^6 hücre/ml – 5×10^6 hücre/ml) ve farklı ortamlarda 3B bazal membran matriks üzerinde 4-6 saat kültivasyon süreli ters faz ışık mikroskop fotoğrafları. Ölçek çubukları $100 \mu\text{m}$ 'ye karşılık gelmektedir. VO, vaskülarizasyon ortamını, %10 S ise, %10 oranında EPC growth medium supplement içeren ortamı temsil etmektedir.

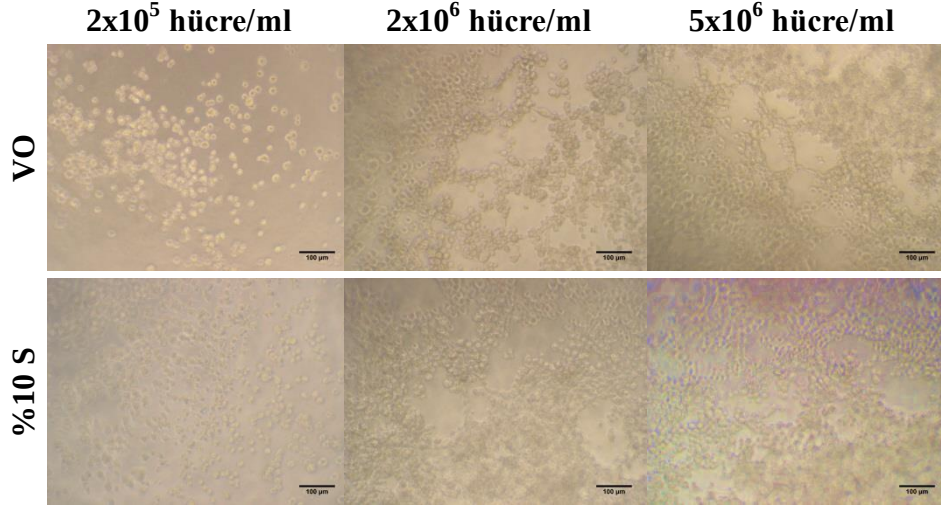
Şekil 4.14 ve 4.15'te görüldüğü üzere HUVEC'ler 2-4. saatlerde vaskülarizasyon göstermeye başlamış ancak tam anlamıyla tüp oluşumu 4-6. saatlerde görülmüştür. Zaman geçtikçe oluşan tüp çapları ve sayısı artmaktadır. HUVEC'ler için kullanılan 3 farklı hücre konsantrasyonundan 2×10^6 hücre/ml'nin diğerlerine göre (2×10^5 hücre/ml – 5×10^6 hücre/ml) en uygun damarlanma sağlayan konsantrasyon olduğuna karar verilmiş ve BS üzerindeki vaskülarizasyon denemesi için bu konsantrasyonun kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca hem vaskülarizasyon ortamında hem de %10 EPC growth medium supplement içeren ortamda tüm hücre konsantrasyonlarında 24. saate kadar vaskülarizasyon gözlenmiş, ancak vaskülarizasyon ortamında oluşan tüplerin daha belirgin olduğu ve daha kısa sürede oluştuğu gözlemlendiğinden BS üzerindeki denemelerde vaskülarizasyon ortamı kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.16.EPC'lerin farklı hücre konsantrasyonları (2×10^5 hücre/ml – 2×10^6 hücre/ml – 5×10^6 hücre/ml) ve farklı ortamlarda 3B bazal membran matrisi üzerinde 22-24 saat kültivasyon süreli floresans mikroskop fotoğrafları. Ölçek çubukları 100 µm'ye karşılık gelmektedir. VO, vaskülarizasyon ortamını, %10 S ise, %10 oranında EPC growth medium supplement içeren ortamı temsil etmektedir.

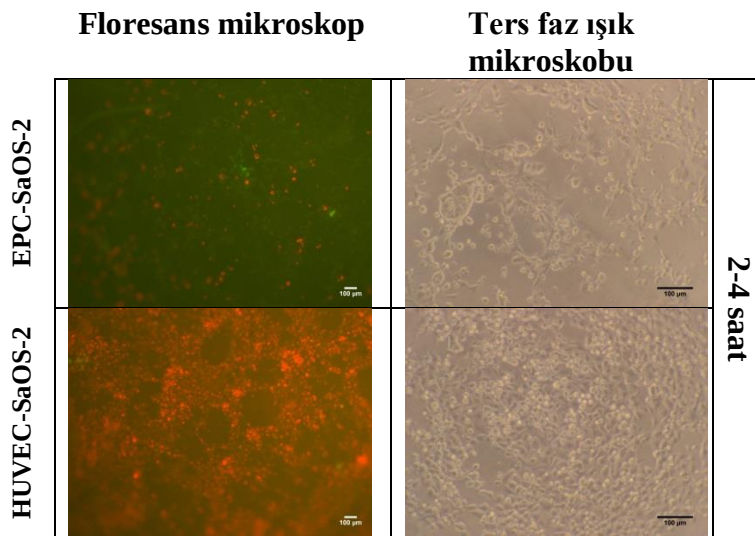
Şekil 4.16 ve 4.17'de görüldüğü üzere EPC'ler 22-24. saatlerde vaskülarizasyon göstermeye başlamıştır. HUVEC'ler kadar kısa sürede tüp oluşturmamalarının sebebinin progenitör hücre olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Öncelikle EPC'lerin EC'ye farklılaşması daha sonra tüp oluşturmaları gerekmektedir. Zaman geçtikçe oluşan tüp çapları ve sayısı artmaktadır. EPC'ler için kullanılan 3 farklı hücre konsantrasyonundan 2×10^6 hücre/ml'nin diğerlerine göre (2×10^5 hücre/ml – 5×10^6 hücre/ml) en uygun damarlanma sağlayan konsantrasyon olduğuna karar verilmiş ve BS üzerindeki vaskülarizasyon denemesi için bu konsantrasyonun kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca hem vaskülarizasyon ortamında hem de %10 EPC growth medium supplement içeren ortamda vaskülrerizasyon gözlenmiş, ancak

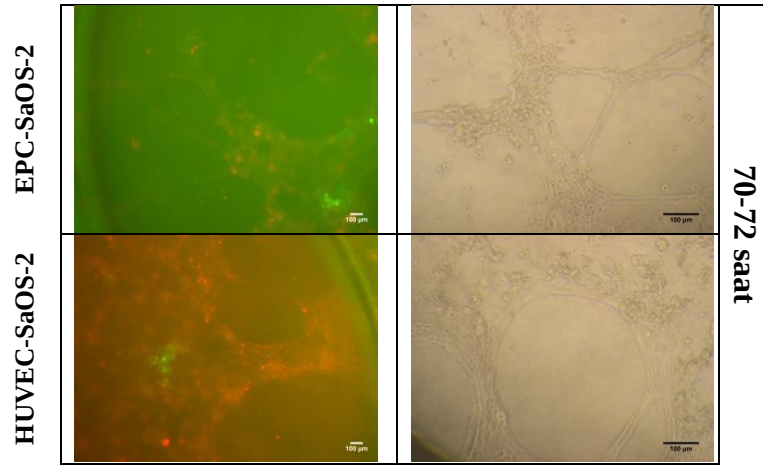
vaskülarizasyon ortamında oluşan tüplerin daha belirgin olduğu gözlemlendiğinden BS üzerindeki denemelerde vaskülarizasyon ortamı kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.17. EPC'lerin farklı hücre konsantrasyonları (2×10^5 hücre/ml – 2×10^6 hücre/ml – 5×10^6 hücre/ml) ve farklı ortamlarda 3B bazal membran matriks üzerinde 22-24 saat kültivasyon süreli ters faz ışık mikroskop fotoğrafları. Ölçek çubukları 100 µm'ye karşılık gelmektedir. VO, vaskülarizasyon ortamını, %10 S ise, %10 oranında EPC growth medium supplement içeren ortamı temsil etmektedir.

EPC-SaOS-2 kokültürü EPC'nin kültürüne göre çok daha kısa sürede vaskülarizasyon göstermiştir. HUVEC-SaOS-2 kokültürü ise HUVEC ile eş zamanlı olarak tüp oluşturmaya başlamıştır (Şekil 4.18). İki hücre tipi ile oluşturulmuş ko-kültür de 2-4 saat içerisinde tüp oluşumu göstermiştir.





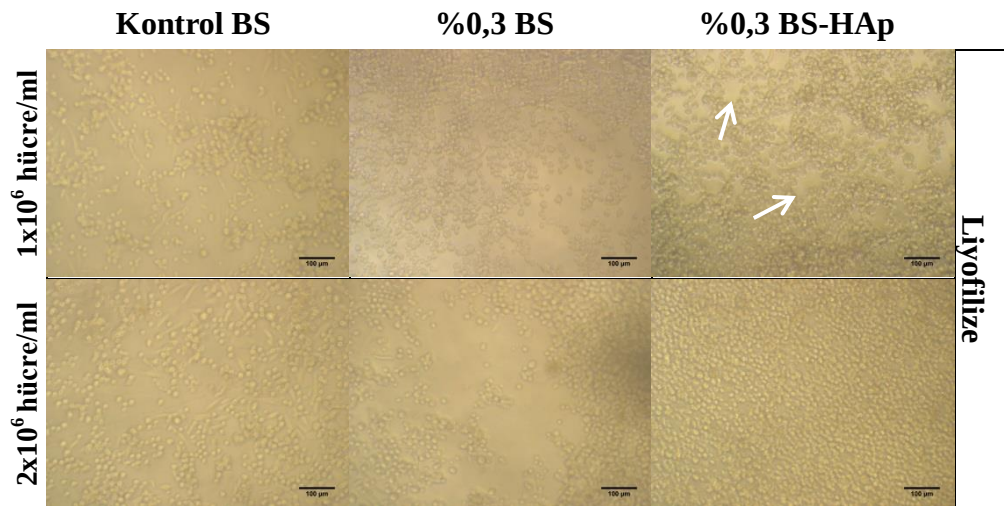
Şekil 4.18. Kokültürlerin 2-4 ve 70-72 saatlik floresans ve ters faz ışık mikroskobu görüntüleri Ölçek çizgileri 100 µm'ye denk gelmektedir. Kırmızı floresans boya endotel hücreleri, yeşil floresans boya ise SaOS-2'leri göstermektedir.

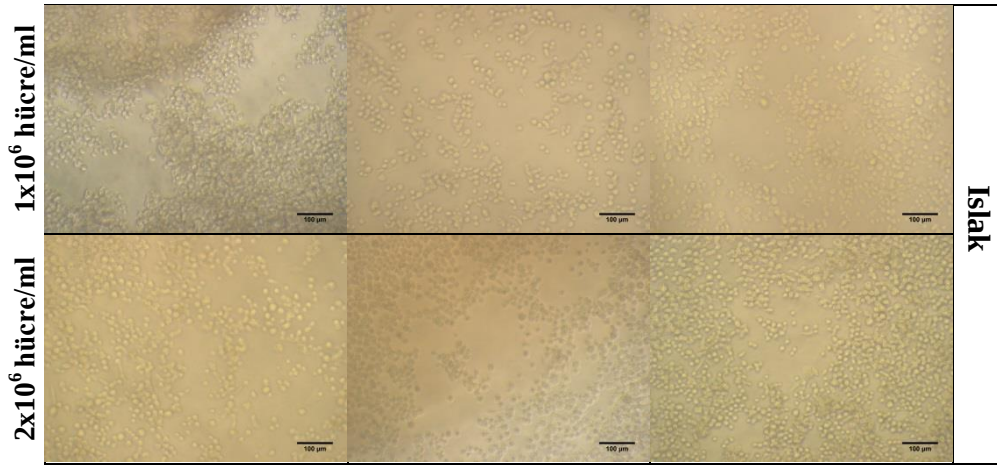
4.7.2. 3B BS üzerinde hücre kültürü

4.7.2.1. Kullanılacak hücre konsantrasyonu ve BS tipi seçilmesi

Literatür bilgileri ve daha önce yapılan 3B bazal membran matriks denemeleri baz alınarak BS üzerinde kültive edilecek hücre konsantrasyonunun belirlenmesi ve ıslak veya liyofilize edilmiş BS kullanımına karar verilmesi amacıyla HUVEC ve EPC'ler ile bir deneme gerçekleştirilmiştir.

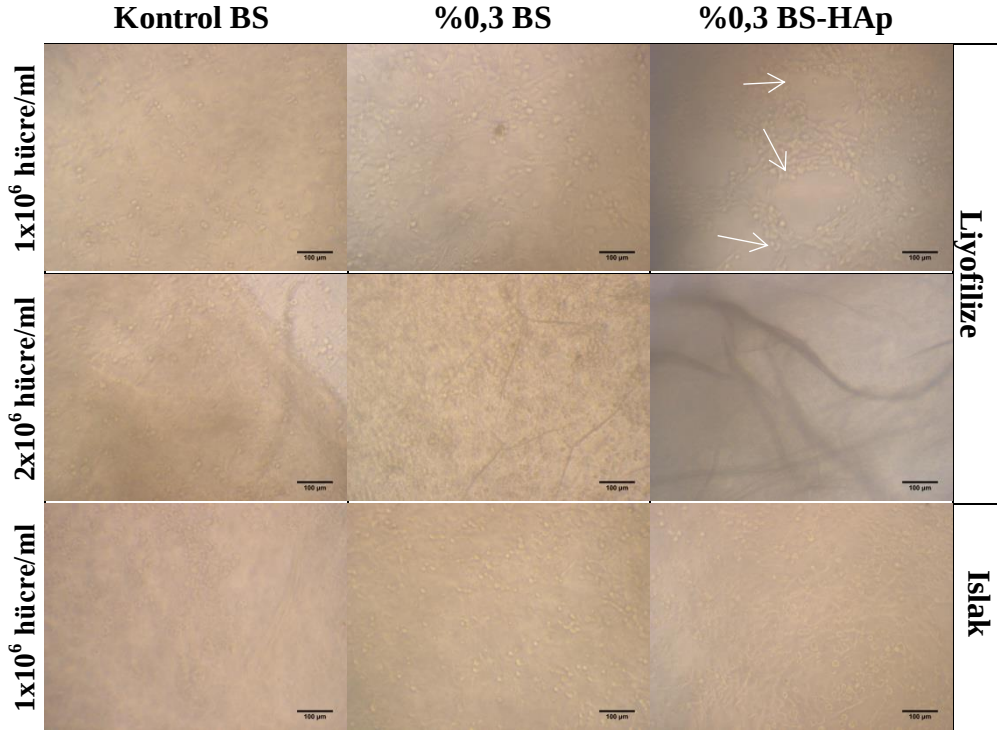
Şekil 4.19'da görüldüğü üzere, EPC'ler 72 saat boyunca ters faz ışık mikroskobunda incelenmiş %0,3 BS-HAp kompozitinde 1×10^6 hücre/ml hücre konsantrasyonunda tüp oluşumuna benzer yapılar görülmüştür.

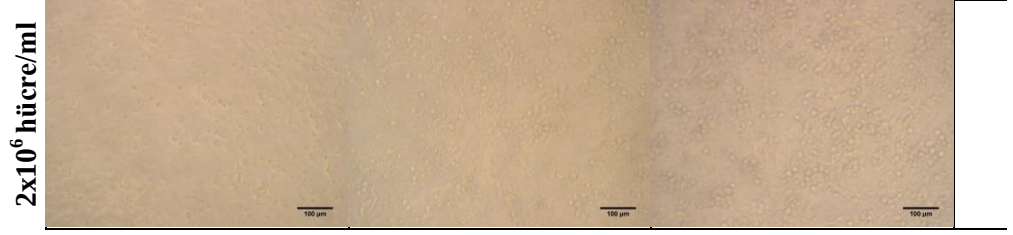




Şekil 4.19. EPC'lerin 3B BS ve BS-HAp kompoziti üzerinde 72 saatlik kültivasyonu sonucunda elde edilen ters faz ışık mikroskobu görüntüleri. Ölçek çizgileri 100 μm 'ye denk gelmektedir.

HUVEC'ler ise 72. saatte %0,3 BS-HAp kompozitinde 1×10^6 hücre/ml hücre konsantrasyonunda tüp oluşumuna benzer yapılar göstermişlerdir (Şekil 4.20). Bu denemenin sonucunda BC üzerinde 1×10^6 hücre/ml konsantrasyonda hücre ekilmesi, liyofilize BS kullanılması ve %0,3 oranında agar eklenen HS besisi ortamında üretilen BC'nin vaskülarizasyon çalışmasında kullanılabileceği kararlaştırılmıştır.

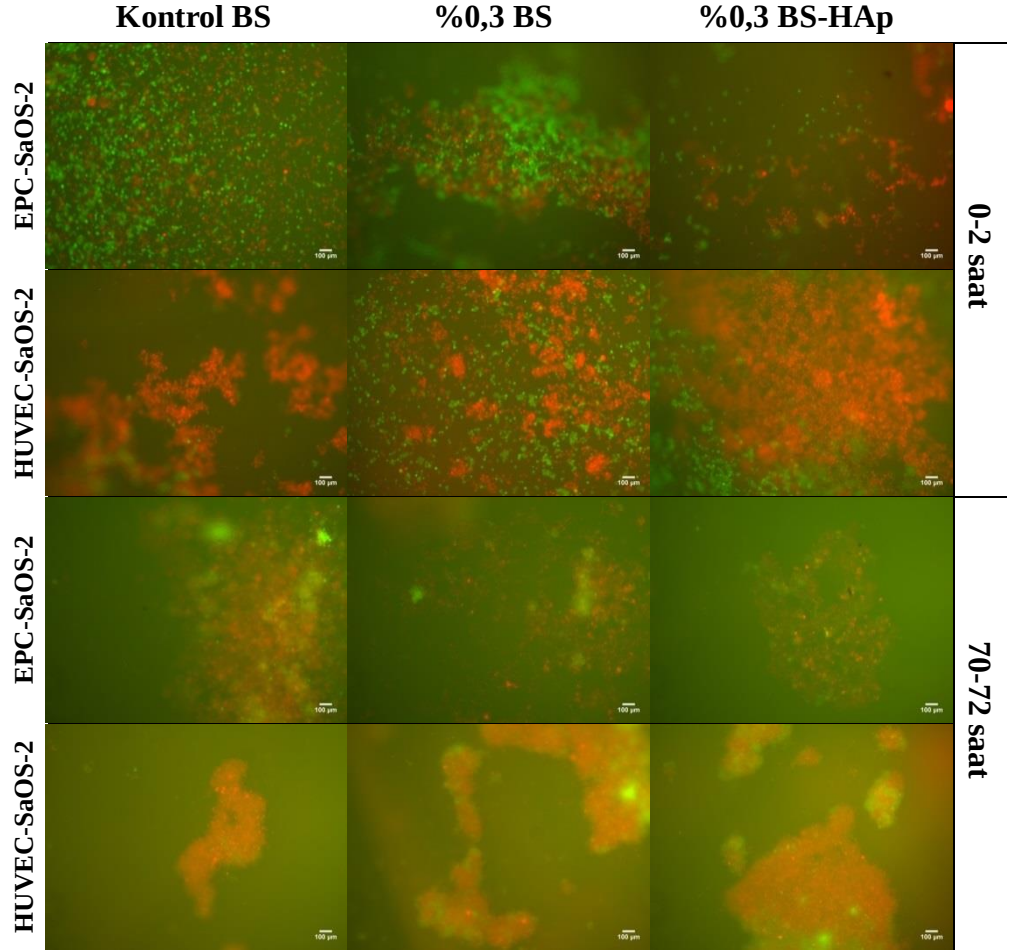




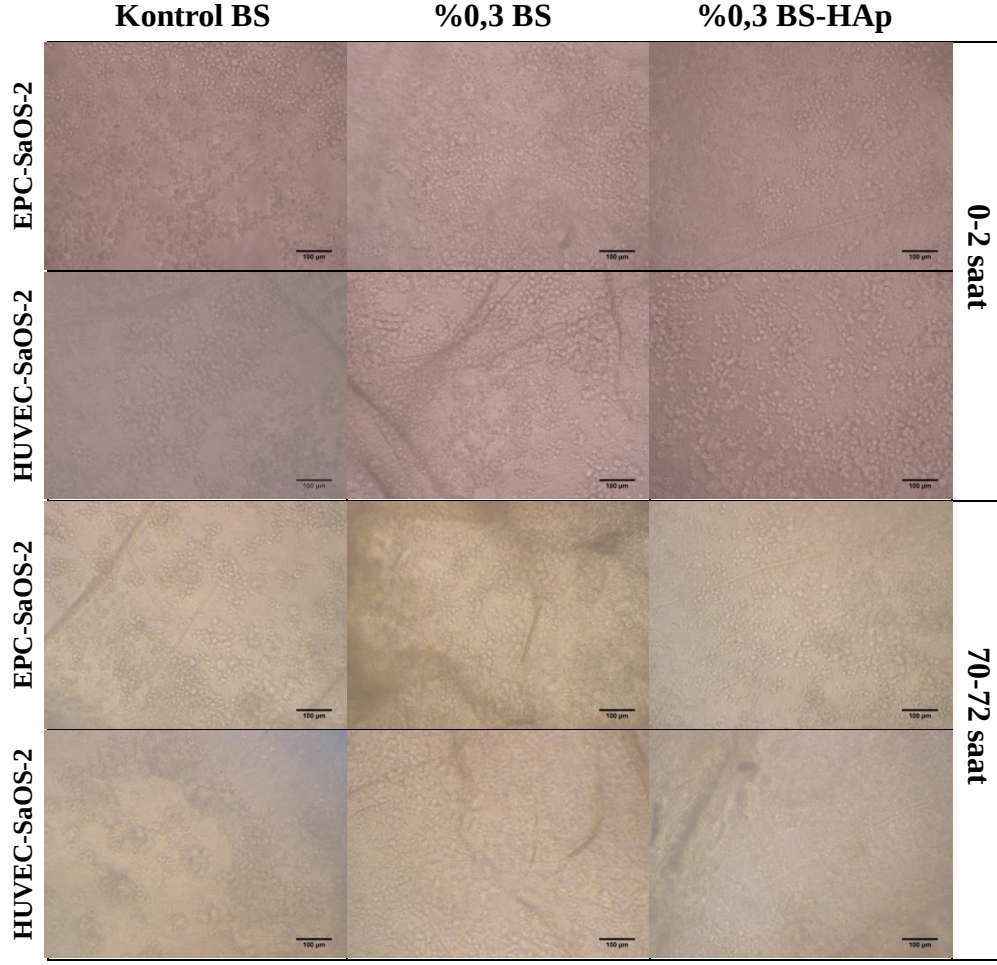
Şekil 4.20. HUVEC'lerin 3B BS ve BS-HAp kompoziti üzerinde 72 saatlik kültüvasyonu sonucunda elde edilen ters faz ışık mikroskobu görüntüleri. Ölçek çizgileri 100 µm'ye denk gelmektedir.

4.7.2.2. Kokültür ile vaskülarizasyon denemesi

Kontrol BS, %0,3 agarlı ortamda üretilmiş BS ve BS-HAp kompoziti üzerine yapılan 1:1 oranında EPC-SaOS-2 ve HUVEC-SaOS-2 kokültürleri sonucunda Şekil 4.21'deki floresans mikroskop ve Şekil 4.22'deki ters faz ışık mikroskop fotoğrafları elde edilmiştir.



Şekil 4.21. Kokültürlerin BS üzerine ekildikten sonraki ve 72. saatteki floresans mikroskop görüntüleri. Ölçek çizgileri 100 µm'ye denk gelmektedir. Kırmızı floresans boya endotel hücreleri, yeşil floresans boya ise SaOS-2'leri göstermektedir.

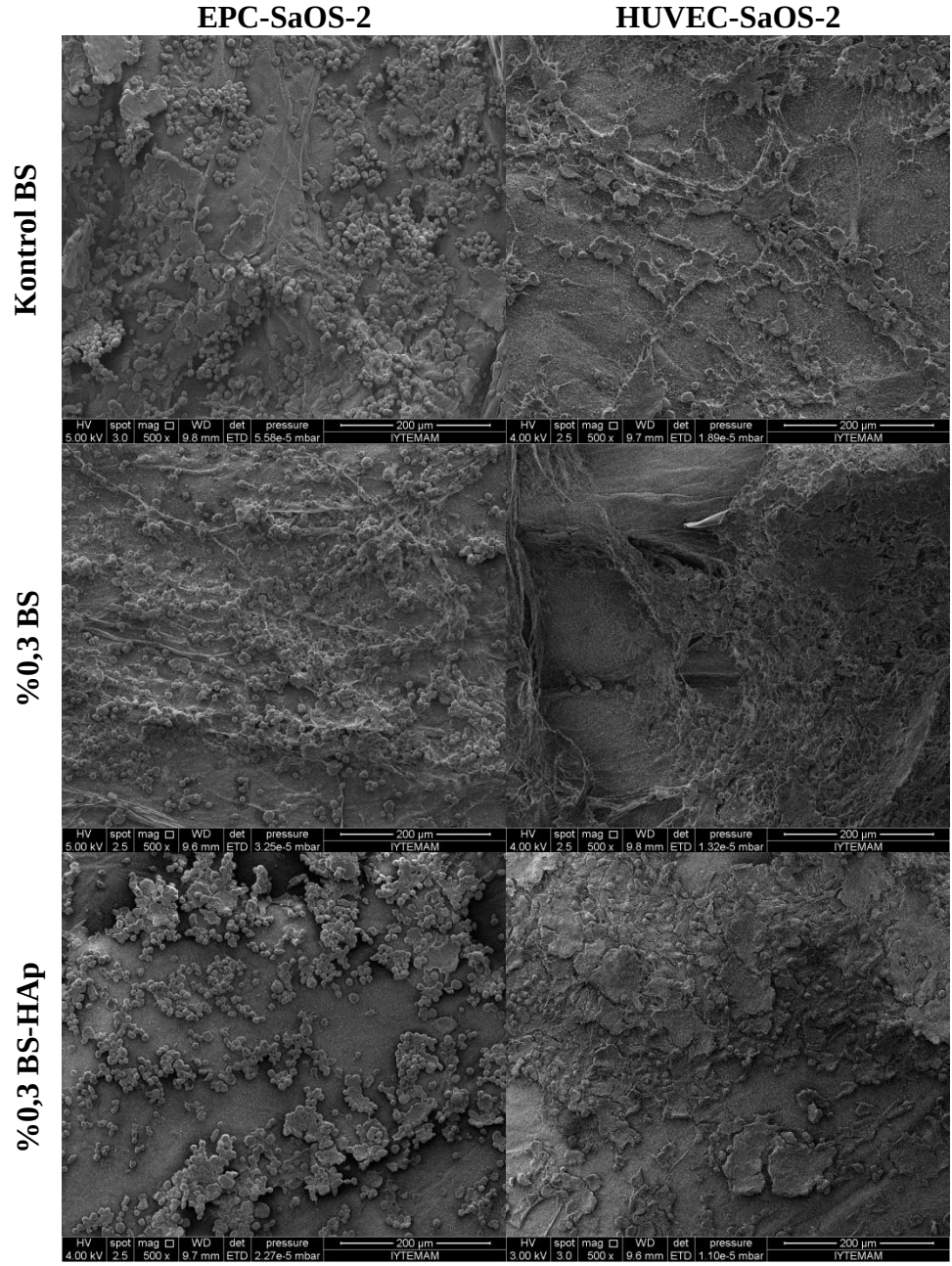


Şekil 4.22. Kokültürlerin BS üzerine ekildikten sonraki ve 72. saatteki ters faz ışık mikroskop görüntüleri. Ölçek çizgileri 100 µm'ye denk gelmektedir.

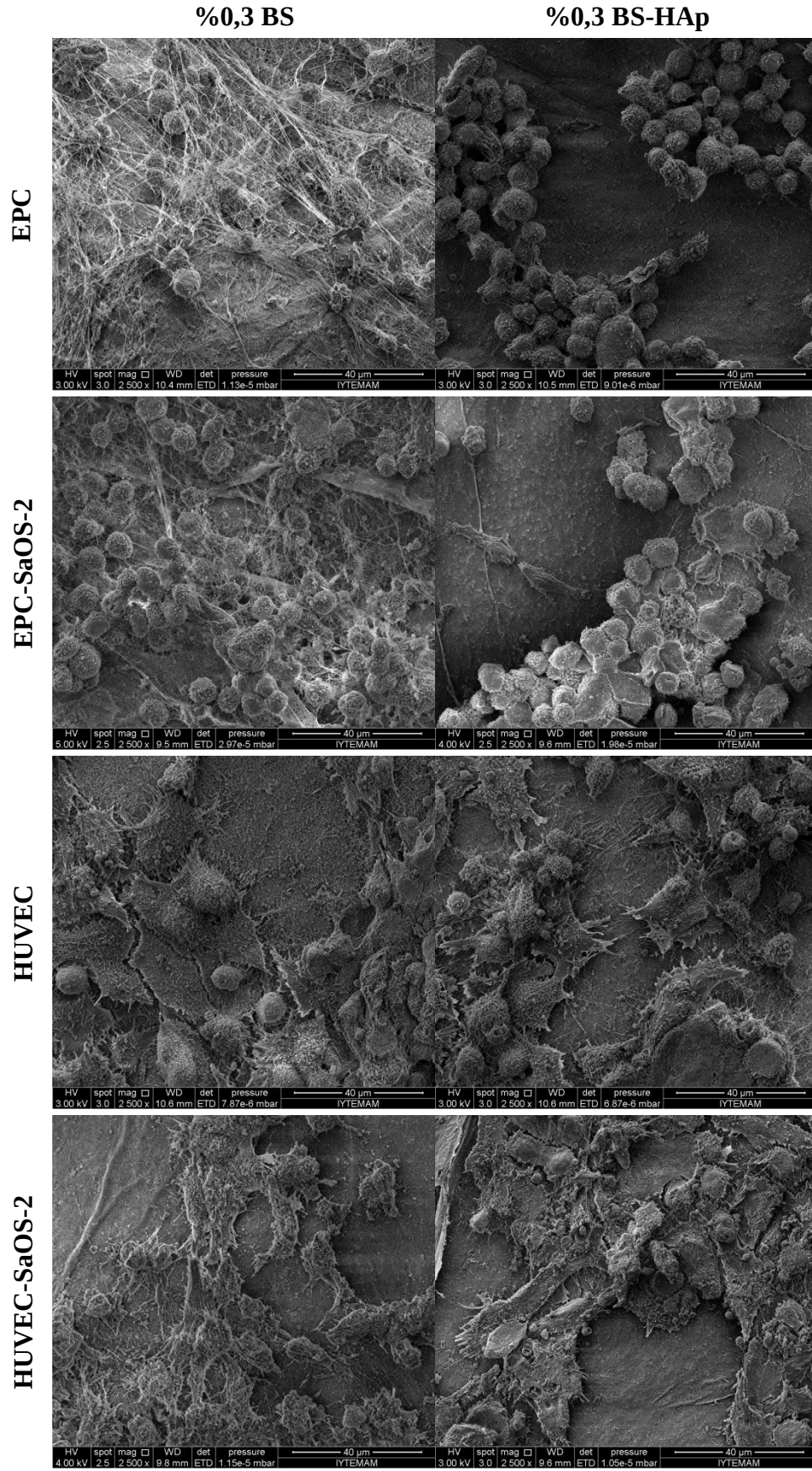
Aynı kültürlerin SEM fotoğrafları Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'te gösterilmiştir. SEM fotoğraflarında kokültürdeki hücre tipleri birbirinden ayırt edilebilmektedir. Hücrelerin BS'ye tutundukları, üreyebildikleri ve hücre-hücre etkileşimleri kurdukları görülebilmektedir. Şekil 4.23'te HUVEC-SaOS-2 kokültürünün EPC-SaOS-2 kokültürüne göre daha çok hücre-hücre etkileşimi göstererek tüp formu oluşturmaya yatkın olduğu görülmektedir.

Şekil 4.24'te ise %0,3 agar içeren besin ortamında üretilen BS'de kulture edilen EPC'lerin porların arasına girebildiği, ancak HUVEC'lerin yüzeye tutundukları rahatça görülmektedir. BS'nin HAp'lı eşleniğinde por çapları küçülmüş ve hücreler porların arasına girmeden yüzeye tutunmuşlardır. Ancak BS heterojen bir yapıya sahip olmadığından bu görüntülerin tüm iskeleyi temsil edemeyeceği düşünülmüştür.

Hücreler yüzeyde bile birbirleri ile etkileşime girip tüp formu oluşturmak için yan yana dizilmişlerdir.



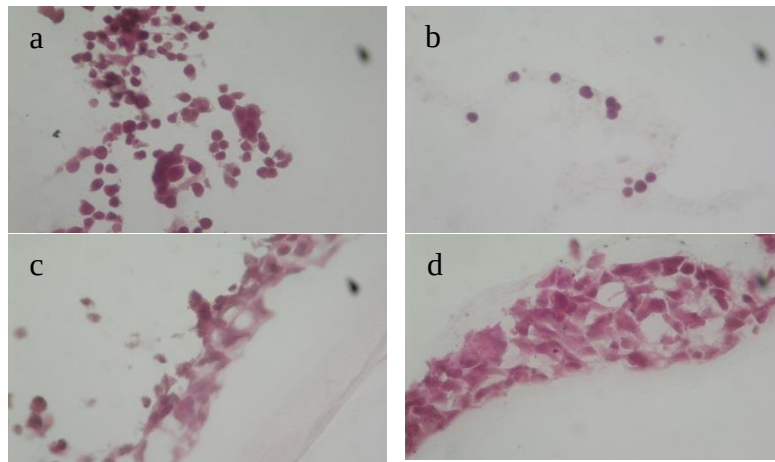
Şekil 4.23. Kükültürlerin, BS ve BS-HAp kompoziti üzerinde 500 büyütmedeki SEM fotoğrafları.



Şekil 4.24. EPC, HUVEC, EPC-SaOS-2 ve HUVEC-SaOS-2 kültürlerinin 2500 büyütme altında BS ve BS-HAp kompoziti üzerindeki SEM fotoğrafları.

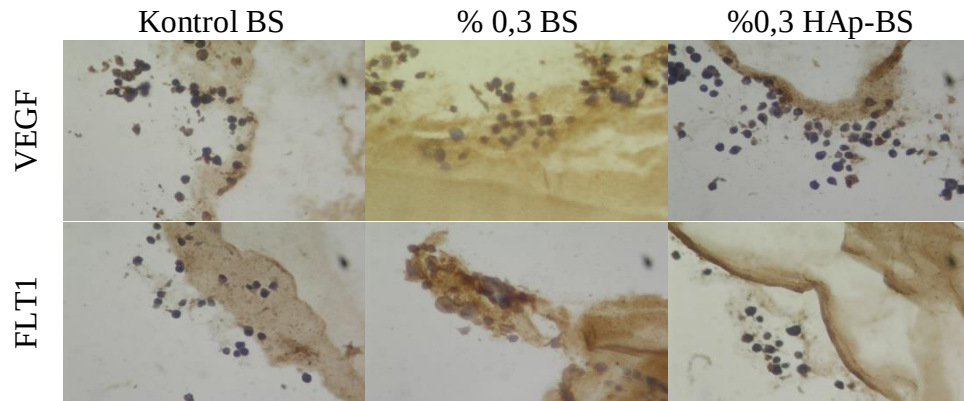
4.7.2.3. 3B BS üzerindeki kültürlerin H&E ve immunohistokimyasal boyamaları

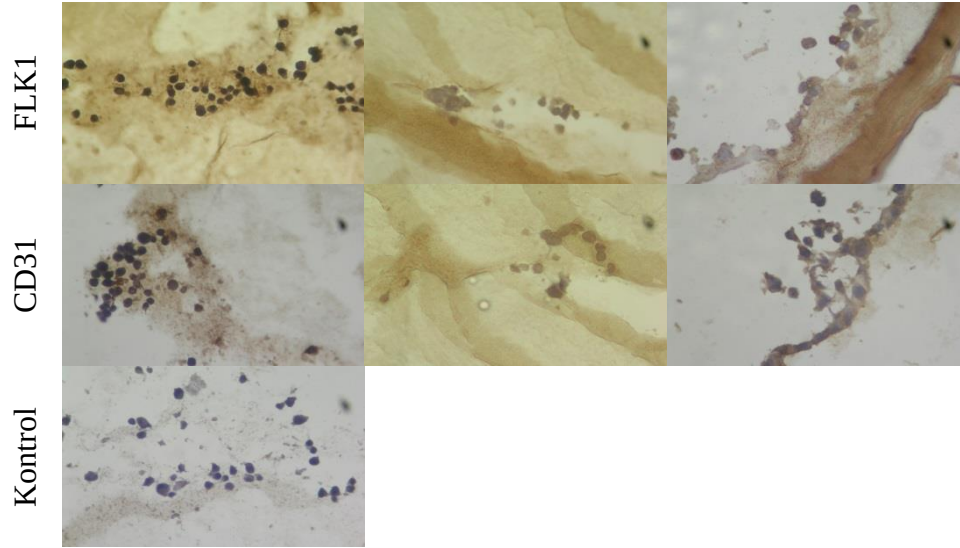
BS üzerinde kültive edilen hücrelerin, iskeledeki konumlarını belirlemek amacı ile hücreler H&E boyama protokolüne göre boyanmış ve görüntüleri ışık mikroskopunda incelenmiştir (şekil 4.25). Fotoğraflar incelendiğinde BS kesitlerindeki hücreler görülmektedir. En az hücre sayısına EPC-SaOS-2 kokültüründe rastlanmaktadır. HUVEC ve HUVEC-SaOS-2 kokültürü, EPC ile yapılan denemelere göre, t p oluşturma açısından daha başarılı sonuç vermiştir. EPC’lerde herhangi bir t p oluşturmaya yönelik dizilim görülmemekte, ancak HUVEC’lerde boşluklu yapılara rastlanmaktadır.



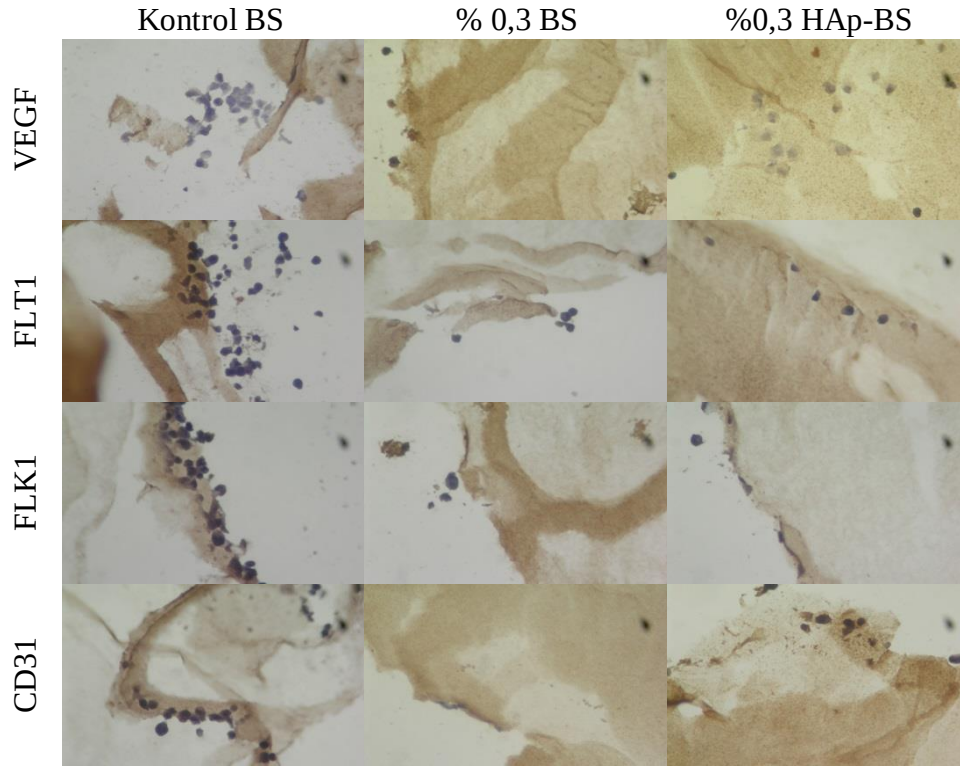
şekil 4.25. BS’lerin üzerindeki kültürlere yapılan H&E boyama sonuçlarını gösteren fotoğraflar. a.EPC, b. EPC-SaOS-2 hücreleri, c. HUVEC, d. HUVEC-SaOS-2 hücreleri. Fotoğraflar 40X büyütmede çekilmiştir.

Kültürde anjiyogenezi belirlemek için hücreler anti-VEGF, VEGF reseptörlerini belirlemek için anti-flk 1, anti-flt-1 ve EC’leri belirlemek için anti-CD31 antik ruları ile işaretlenmiştir (şekil 4.26 - 4.29). Pozitif boyanan hücreler kahverengi, kontrol grubundaki hücreler ise mavi renkte görünmektedir.

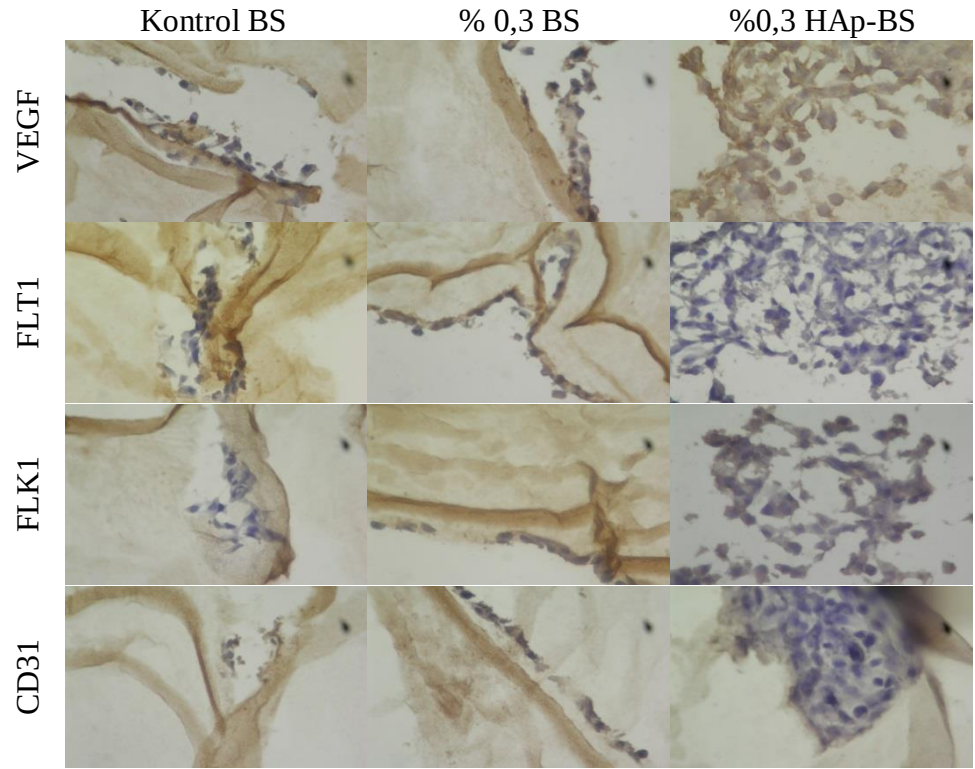




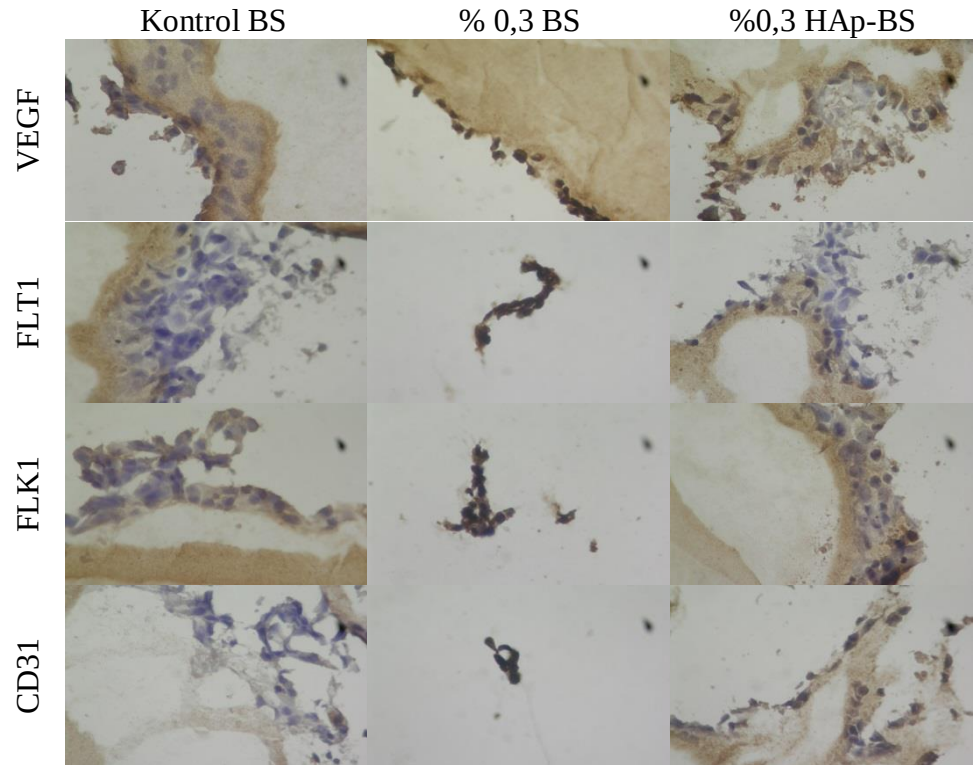
Şekil 4.26.EPC hücrelerinin immunohistokimyasal boyama sonuçlarını gösteren fotoğraflar. Fotoğraflar 40X büyütmede çekilmiştir.



Şekil 4.27.EPC-SaOS-2 hücrelerinin immunohistokimyasal boyama sonuçlarını gösteren fotoğraflar. Fotoğraflar 40X büyütmede çekilmiştir.



Şekil 4.28. HUVEC hücrelerinin immunohistokimyasal boyama sonuçlarını gösteren fotoğraflar. Fotoğraflar 40X büyütmede çekilmiştir.

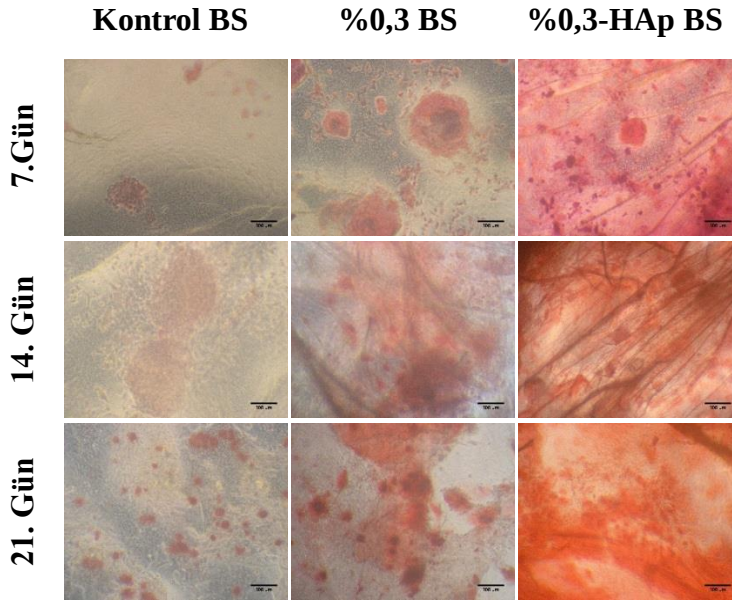


Şekil 4.29. HUVEC-SaOS-2 hücrelerinin immunohistokimyasal boyama sonuçlarını gösteren fotoğraflar. Fotoğraflar 40X büyütmede çekilmiştir.

4.8. SaOS-2 hücrelerinin 3B BS üzerinde osteojenik farklılaşma potansiyellerinin incelenmesi

SaOS-2 hücre hattının liyofilize BS ve BS-HAp kompoziti üzerinde minerilizasyon tespiti için yapılan Alizarin red S ve Von Kossa boyamalarının ters faz ışık mikroskobu görüntüleri, bu hücrelerin osteojenik farklılaşma ortamında mineral depozitleri oluşturabildiğini göstermektedir. Alizarin red S boyaması sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 4.30'da, Von Kossa boyaması sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 4.31'de verilmiştir.

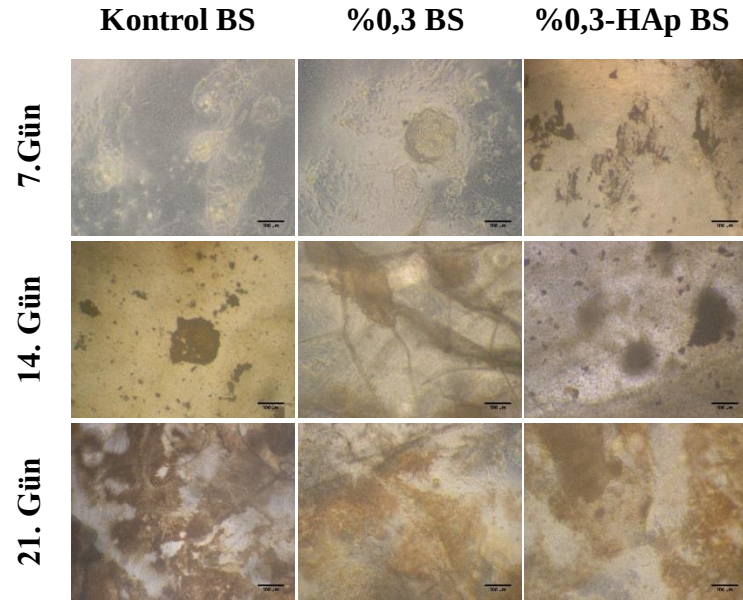
Alizarin red S boyamasında görüntülerdeki koyu kırmızı bölgeler kalsiyum depozitlerini göstermektedir. Tüm BS tiplerinde SaOS-2 hücrelerinin osteojenik farklılaşma ortamında kalsiyum depozitleri oluşturduğu gözlemlenmektedir (Şekil 4.30). Kalsiyum depozitlerinin yoğunluğunun inkübasyon süresi ile paralel olarak arttığı tespit edildi. Ayrıca HAp içeren BS'nin Alizarin red S boyaması sonucunda, HAp içermeyen BS'lere göre daha pembe bir görüntü verdiği gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin HAp'ın temelde Ca-P yapılı bir mineral olmasından kaynaklandığı ve HAp'ın boyanarak bu rengi BS'ye verdiği düşünülmektedir.



Şekil 4.30. Alizarin red S boyaması ile SaOS-2 kültürünün 7-14 ve 21. günlerdeki BS ve BS-HAp kompoziti üzerindeki ters faz ışık mikroskobu görüntüleri. Fotoğraflardaki ölçek çubukları 100 µm'ye karşılık gelmektedir.

Alizarin red S boyamasından alınan sonuçları desteklemek amacıyla yapılan Von Kossa boyamalarının görüntüleri Şekil 4.31'de verilmiştir.

Osteojenik farklılaşma ortamında yapılan tüm denemelerde gün sayısı arttıkça siyaha boyanma miktarında artış gözlemlenmiştir.



Şekil 4.31. Von Kossa boyaması ile SaOS-2 kültürünün 7-14 ve 21. günlerdeki BS ve BS-HAp kompoziti üzerindeki ters faz ışık mikroskobu görüntüleri. Fotoğraflardaki ölçek çubukları 100 μm 'ye karşılık gelmektedir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Doğuştan var olan veya sonradan oluşan kemik defektleri, tüm dünyada milyonlarca insanın hayat kalitesini olumsuz yönde etkileyen hastalıklardandır. Bu defektlerin iyileştirilmesi amacıyla kemik greftlerinin kullanımı çok yaygınlaşmıştır. Dünya çapında her yıl 800.000'den fazla hasta, kemik grefti ameliyatları geçirmektedir (Yang, P. et al., 2013). Çeşitli dezavantajları olmasına rağmen allogreftler ve metal ve seramik gibi yapay greftler, özellikle ortopedide geniş kullanım alanına sahip olan greftlerdir. Ancak son yıllarda kemik doku mühendisliği ürünlerinin kullanımına yönelik çalışmalar artmıştır. Çünkü kemik doku mühendisliği ile yapılan çalışmalarda, dezavantajları olan greftlerin yerine, kemiğin en iyi ve en hızlı şekilde iyileşebilmesi için kullanılacak yeni yapay greftler elde edilebilir. Bu amaçla üretilen yapay kemik greftlerinin sahip olması gereken önemli özellikler; kemik mikroçevresini en iyi şekilde taklit etmesi, biyouyumlu olması, biyobozunur olması, kemiğin mekanik dayanımına uygun olması, hücre tutunması, hücre göçü, hücre çoğalması ve farklılaşmasına izin vermesidir. HAp, biyouyumluluğu yüksek ve kimyasal yapısı kemiğe oldukça benzeyen bir materyal olduğundan, uzun yıllardır klinik olarak ve yapay kemik greftlerinde oldukça fazla kullanılan bir materyaldir (Sopyan et al., 2007). Çeşitli çalışmalarla biyouyumluluğu kanıtlanmış ve osteoblast büyümesini tetiklediği gösterilmiştir (Tazi et al., 2012). HAp, tek başına bir doku iskelesi olarak kullanılabilir, ancak kırılabilirlik, düşük çekme mukavemeti ve düşük kopma dayanımına sahip olduğu için (Family et al., 2012) tam olarak kemiğin mekanik özelliklerini yansıtamamaktadır ve genellikle çeşitli malzemeler ile kompozit olarak kullanımı tercih edilmektedir.

BS, yüksek çekme mukavemeti, elastik modülü ve hidrofilik özellikleri ile çok önemli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olan doğal bir polimerdir. Morfolojik olarak, BS'nin fibröz yapısı kemiğin kolajen yapısına çok benzerdir. Bütün bu özelliklerinin dışında yüksek biyouyumluluğu sayesinde kemik doku mühendisliğinde çok kullanışlı bir iskele materyalidir (Tazi et al., 2012). Çalışmada BS ile HAp bir araya getirilerek kompozit oluşturulmaya, böylece hem BS'nin hem de HAp'ın avantajlarından faydalanılmaya çalışılmıştır. Daha önce yapılan kemik doku iskelesi çalışmalarında BS-HAp kompozitleri oluşturulmuş, ancak çoğunlukla BS, CaCl_2 solüsyonunda bekletilerek HAp depozitlerinin presipitasyonu ile kaplanması ile bu tip iskeleler üretilmeye çalışılmıştır (Fang et al., 2009; Hong et al., 2006; Saska, S et al., 2011; Wan, Y. et al., 2007; Wan, Y. Z. et al., 2006; Zimmermann et al., 2011). Bu çalışmada ise HAp, BS'nin sıvı

üretim ortamının içerisinde %0,025 oranında eklenerek süspanse edilmiş ve BS üretimi bu şekilde gerçekleştirilmiştir. BS'nin karakterizasyonu FTIR, XRD, EDS ve SEM ile gerçekleştirilmiştir. FTIR spektroskopisi, uzun örnek hazırlama prosedürlerine gerek duyulmadan, kızıl ötesi ışığın örnek tarafından soğurulması prensibine dayanan, fonksiyonel gruplarının titreşimlerinden kaynaklanan yapısal, bileşimsel ve fonksiyonel bilgilerin elde edilmesini sağlayan bir tekniktir. XRD, bir kristal fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak, X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanan ve bu şekilde o kristalin kırınım profillerinden tanımını yapabilen bir yöntemdir. EDS ise, örnek üzerinde istenilen bir alanda elementel kompozisyonu tanımlamak için kullanılan bir tekniktir. SEM cihazında gerçekleştirilen EDS analizinde, örnek üzerine taramalı elektron demeti düşürülür ve bu elektronların bazıları numunedeki elektronlarla çarpışarak yörüngelerinden çıkması sağlanır. Boşalan pozisyonlar x-ışınları yayan yüksek enerjili elektron tarafından doldurulur. Yayılan x-ışınları analiz edilerek numunenin elementel kompozisyonu tespit edilebilir.

BS-HAp kompozitinin FTIR sonuçlarından elde edilen BS'ye spesifik 3348 cm^{-1} 'deki -OH, 2896 cm^{-1} 'deki C-H, 1033 cm^{-1} 'deki C-O grupları (Adina et al., 2010; Mitrofanov et al., 2010; Wan, Y. Z. et al., 2006) ile HAp'a spesifik 950 cm^{-1} - 1000 cm^{-1} arasındaki PO_4^{3-} grupları (Grande et al., 2009; Rivera-Muñoz, 2011; Zahra et al., 2014; Zhou et al., 2008) ve XRD sonuçlarından elde edilen BS'ye spesifik ($14,988^\circ$, $16,487^\circ$ ve $22,782^\circ$) pikler (Tomé et al., 2011; Wan, Y. Z. et al., 2006) ile HAp'a spesifik ($25,879^\circ$, $31,662^\circ$, $32,767^\circ$, $34,005^\circ$, $39,633^\circ$, $46,563^\circ$, $49,415^\circ$ ve $53,212^\circ$) piklerin (Grande et al., 2009) görülmesi kompozitin başarı ile oluşturulduğunu gösterir niteliktedir. EDS analizinde BS ve BS-HAp kompozitine bakılmış ve BS'de Ca ve P elementlerine rastlanmazken, kompozitte bu elementlere rastlanmıştır. HAp'ın molekül formülü $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ olduğundan sitokiyometrik olarak elde edilmesi gereken Ca/P oranı 1,667'dir. EDS analizi sonucunda kompozitte bulunan Ca/P oranı ise 1,651 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuç kompozitte HAp kristallerinin olduğunu desteklemektedir.

BS'nin nano-poröz yapısı kemik dokusunun vaskülarizasyonuna izin vermeyecek şekilde yapılanmıştır. Kemik dokusunun hızlı iyileşebilmesi için vaskülerize olabilmesi büyük önem taşır ve hem hücrelerin iskele içine girebilmesi hem de vaskülarizasyona izin vermesi için iskele por çaplarının 100-350 μm olması gerekmektedir (Sopyan et al., 2007). Bu sebeple BS'nin por çaplarının artırılması gerekmektedir. Yapılan tez çalışmasında BS'nin üretim ortamına çeşitli oranlarda (%0,1 - %0,3 - %0,4 - %0,5 - %0,7 - %0,9) agar

eklenmiş ve eklenen agarların sıvı besin ortamını kısmen katılaştırarak, *A. xylinum*'un sıvı-hava ara yüzeyinde poröz bir BS üretmesi amaçlanmıştır. Üretilen BS'ler içerisinde agar konsantrasyonu arttıkça por çapının artması beklenmiştir. Ancak yapılan SEM incelemelerinde, agar konsantrasyonu % 0,4 ve üzerine çıktığında por çaplarının küçüldüğü, %0,9 agarlı ortamda ise BS üretimi olmadığı gözlenmiştir. Üretimin olmama sebebinin, agar konsantrasyonunun artışı ile HS ortamının katılığının artması ve *A. xylinum* bakterilerinin hava-sıvı ara yüzeyinde BS'yi yekpare bir şekilde üretememesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Konsantrasyonun %0,4'e çıkmasıyla por çaplarının gittikçe küçülmesini ise, konsantrasyon arttıkça agarın dibe çökmesi ve üretimin normal BS'de olduğu gibi agarsız sıvı-hava ara yüzeyde olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. HAp ve % 0,5 - % 0,7 agar içeren ortamlarda üretilen BS'lerin ise HAp'sız ortamda üretilen eşleniklerine göre por çaplarının daha büyük olduğu gözlemlenmiştir, ancak fotoğraflar (Bkz. Bölüm 4.6.3) dikkatle incelendiğinde büyük porların altında sıkıca örülmüş BS olduğu görülmektedir. Büyük porlu BS görünümünün yeni üretilen BS katmanından kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı görüntü HAp içeren ortamda üretilen kontrol BS'de de gözlemlenmiştir. % 0,1 ve % 0,3 agar içeren ortamlarda üretilen BS'lerin por çaplarının ise genişlediği görülmektedir. %0,3 agarlı ortamda üretilen BS'nin por çaplarının normale göre en az 5-10 kat arttığını ancak istenen por çapı değerlerine ulaşamadığını gözlemlenmiştir. Amaç, en geniş por çapına sahip BS'yi üretmek olduğundan % 0,3 agarlı ortamda üretilen BS'nin vaskülarizasyon denemesinde kullanılacak en uygun örnek olduğuna karar verilmiştir. Sonuç olarak üretilen daha poröz yapıdaki ve HAp içeren BS kompoziti, vaskülerize kemik modelinin oluşturulabilmesi amacıyla iskele olarak kullanılmıştır. Üretilen iskeleler sterilize edildikten sonra bir gün süre ile vaskülarizasyon ortamında şartlandırılmıştır. Bu şekilde pek çok vaskülarizasyon stratejisinden biri olan iskele modifikasyonu yöntemi kullanılmıştır (Lovett et al., 2009). İskele bir gün süreyle şartlandırıldığında vaskülarizasyon ortamında bulunan büyüme faktörleri ile basitçe yüklenir ve bu faktörler sayesinde hücrelerin tüp oluşumu göstermesine yardımcı olur.

Kemik dokusunu oluşturacak hücre olarak osteoblast benzeri yapıya sahip olan SaOS-2 hücre hattı, vaskülarizasyon çalışmaları için ise bu konuda sıklıkla kullanılan iki hücre hattı olan EPC ve HUVEC seçilmiştir. Endotel hücrelerin öncelikle 3B bazal membran matriks üzerinde tüp formu oluşturma yetenekleri incelenmiştir. İlk denemede en iyi tüp oluşumunu gözlemek için her iki hücre tipi için kullanılması gereken hücre sayısı, kültür ortamı ve inkübasyon süresi belirlenmeye çalışılmıştır. Deneme sonucunda her iki hücre hattı için 2×10^6

hücre/ml hücre yoğunluğu ve EGF, FGF ve VEGF gibi büyüme faktörleri ile asokorbik asit, heparin ve hidrokortizon gibi vaskülarizasyonu tetikleyici faktörler içeren vaskülarizasyon ortamının daha başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. HUVEC'ler sadece 2 saatte hücre-hücre etkileşimi göstererek tüp formu oluşturmaya başlarken, EPC'lerde bu süre 24 saate çıkmaktadır. Bütün bu sonuçlar literatür verileri ile uyusmaktadır (Arnaoutova et al., 2009; Hur et al., 2004). EPC'ler endotel öncülleri olduğundan tüp formu oluşturabilmeleri için öncelikle endotel hücreye farklılaşmakta daha sonra tüp formu oluşturabilmektedir. HUVEC'ler ise endotel hücre olduklarından direk tüp formu oluşturabilmektedir. Bu sebeple vaskülarizasyonu başlatabilmeleri için aralarında 20-22 saatlik fark olması beklenen bir sonuçtur. EPC-SaOS-2 kokültürü (1:1) ise aynı hücre sayısı ve kültür ortamı kullanılmasına rağmen sadece EPC kültürüne göre çok daha kısa bir sürede (2-4 saat) tüp oluşumu göstermiştir. HUVEC-SaOS-2 kokültüründe ise damarlanma süresinde bir fark görülmemiştir. Endotel hücrelerin, büyüme faktörlerini aşırı sentezleyecek şekilde transfekte edilmiş hücrelerle kokültürünün vaskülarizasyonu arttırdığı bilinmektedir (Geiger et al., 2007; Yang, J. et al., 2006). Kanseri hücrelerinin de büyüme faktörlerini aşırı sentezleme yetenekleri vardır. SaOS-2'ler osteosarkoma hücreleri olduğundan anjiyogenik faktörleri aşırı salgılama yeteneğine sahiptir. Endotel hücreler ile SaOS-2'lerin kokültürleri, endotel hücrelerin daha hızlı göçü ve proliferasyonunu sağlayarak daha çabuk tüp formu oluşturmalarını sağlamaktadır. Kanseri hücrelerinden salınan anjiyogenik faktörler, endotel hücrelerin yüzey reseptörlerine bağlanarak genlerini aktive eder ve bu şekilde endotel hücrelerin büyümesini ve göçünü arttırıcı proteinlerin sentezlemelerini sağlar (Nishida et al., 2006). Bu durum EPC'ler ile SaOS-2'nin kokültüründe daha kolay göze çarpmaktadır. EPC'lerin kokültürdeyken 22 saat daha önce tüp formu oluşturmalarının sebebinin, SaOS-2'lerin aşırı büyüme faktörü sentezleme yeteneğinden olduğu düşünülmektedir.

Hücre konsantrasyonunu ve vasatı belirledikten sonra ikinci denemede BS üzerinde kültivasyona geçilmiştir. BS üzerinde endotel hücrelerinin vaskülarizasyon çalışmaları için hücre konsantrasyonunun farklı olabileceğini düşünülerek hem 1×10^6 hücre/ml hem de 2×10^6 hücre/ml konsantrasyon denenmiştir. Ayrıca bu denemede BS'nin liyofilize halde ya da ıslak olarak kullanılmasına karar verilmeye çalışılmıştır. Deneme sonucunda EPC'lerin 1×10^6 hücre/ml hücre konsantrasyonda, liyofilize BS'de tüp oluşturabilecek şekilde göç ettikleri gözlemlenmiştir. HUVEC'lerin ise aynı BS çeşidinde ve hücre konsantrasyonunda tüp oluşumuna benzer yapı gösterdikleri gözlemlenmiştir.

Islak BS'nin ters faz ışık mikroskobunda farklı katmanları liyofilize BS kadar rahat gözlemlenemediğinden tüp oluşumu yalnızca liyofilize edilmiş BS'lerde gözlemlenmiş olabilir. Bu denemenin sonucunda vaskülerize kemik modeli oluşturabilmek için kullanılacak hücre konsantrasyonu 1×10^6 hücre/ml ve liyofilize BS tipi belirlenmiştir.

Seçilen BS tipi üzerinde inkübe edilen EPC, HUVEC kültürleri ile EPC-SaOS-2 ve HUVEC-SaOS-2 kokültürlerinde tüp oluşumunu gözlemlemek için ters faz ışık ve floresans mikroskopta incelenmiştir. Ayrıca BS'lerden alınan histolojik kesitler ile hücre lokalizasyonlarını belirlemek için H&E boyama, incelenen hücrelerdeki ilgili proteinlerinin ekspresyonunu gösterebilmek için de immunohistokimyasal boyamalar yapılmıştır. İmmunohistokimyasal boyamalarda yapılan kontrol boyamanın amacı, uygulanan protokolün başarılı olup olmadığını belirlemek ve varsa spesifik olmayan boyamaları gözlemleyebilmektir. Yapılan kontrol boyamasına göre bütün immunohistokimyasal boyama sonuçlarında fonda görülen açık kahverengi boya, spesifik olmayan bir boyamadır ve BS'yi göstermektedir. Kontrol boyamada görülen hücrelere hiçbir antikor ile işaretleme yapılmamıştır ve boyama sonucunda hem çekirdekleri hem de sitoplazmaları mavi renkli gözlemlenmişlerdir. Ancak antikor boyaması pozitif çıkan hücreler koyu kahverengi görülmektedir. İncelenen proteinin ekspresyonu sitoplazmada gerçekleşiyorsa hücre sitoplazması, çekirdekte gerçekleşiyorsa hücre çekirdeği kahverengi gözlemlenir (van der Loos, 2010).

İmmunohistokimyasal boyama sonuçlarında, H&E boyamada olduğu gibi hücreler çoğunlukla selülozun kenarlarında gözlemlenmiş, orta kısımlar boş kalmıştır. Bu sonuç BS'nin por çapının yeterince açılmadığına bağlı olarak hücrelerin iskelenin alt katmanlarına çok fazla ilerleyemediğini göstermektedir. SEM görüntülerinde EPC'lerin BS liflerinin alt katmanlarına girdiği görülmüştür, immunohistokimyasal analizden anlaşıldığı üzere hücreler ya tam olarak yüzeyde ya da yüzeye çok yakın konumda bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre BS por çapının yeterince artırılması ile hücrelerin tüp formu oluşturmalarının sağlanabileceği görülmüştür. Çünkü hücreler iskeleye güçlü bir etkileşim ile bağlanmakta ve iskele boyunca ilerlemeye çalışmaktadır. H&E boyama sonuçları incelendiğinde HUVEC kültürü ve HUVEC-SaOS-2 kokültürlerinin sonucu EPC ile yapılan kültürlere göre daha umut verici sonuçlar vermiştir. Alınan kesitlerin H&E boyamasında HUVEC kültürlerinin tüp benzeri yapılar oluşturduğu görülmüş, ancak EPC kültürlerinde bu gibi yapılara rastlanmamıştır.

Yapılan immunohistokimyasal incelemeler sonucunda BS üzerindeki tüm kültürlerin, içermeleri beklenen VEGF, flt-1 (VEGFR1), flk-1 (VEGFR2) ve CD31 proteinlerini belirli oranlarda ifade ettikleri tespit edilmiştir. Anjiyogenez ve vaskülarizasyonun düzenleyicisi olan VEGF sitokini, normalde HUVEC gibi endotel hücrelerde bol miktarda sentezlenmektedir. EPC'lerin göçünde ve farklılaşmasında, damar oluşumunda, EC'lerin aktivasyonu, göçü ve proliferasyonunda, tüp formu oluşumunda VEGF büyük rol oynamaktadır (Prior et al., 2004). Tüm BS tiplerindeki EPC ile HUVEC kültürlerinde ve kokültürlerde, VEGF proteininin yüksek miktarda ifade edildiği görülmüştür. Buna bağlı olarak, kültürlerde VEGF'in aktive ettiği proseslerin başladığı sonucuna varılabilmektedir.

EPC-SaOS-2 kokültürlerinin tüm antikor boyamaları için pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Kullanılan EPC hücrelerinin CD31 proteinini ifade ettikleri bilinmektedir. Bu sebeple CD31 işaretlemesinin pozitif sonuç vermesi beklenen bir sonuçtur. Ayrıca bir entotel hücre belirteci olan CD31 proteininin işaretlemesi HUVEC'lerde de beklendiği üzere pozitif sonuç vermiştir. Ancak kontrol BS'de HUVEC-SaOS-2 kokültürlerinde CD31 protein ifadesinin %0,3 BS ve %0,3 HAp-BS örneklerine göre daha az miktarda olduğu gözlemlenmiştir. Bu örnekte CD31 ifadesinin olmadığı hücrelerin SaOS-2 hücrelerini temsil ettiği düşünülmektedir.

VEGF reseptörlerinin temel olarak EC'lerde ve kemik iliği kökenli monosit gibi hücrelerde bulunduğu bilinmektedir (Shen et al., 1993). Çalışmada Flt-1 ve flk-1 ekspresyonu her kültürde gözlemlenmiş ancak ekspresyon oranlarında farklılıklar görülmüştür. Flt-1 ve flk-1 reseptörleri EPC'lerin göçünde büyük önem taşımaktadır, bu sebeple EPC kültürlerinde her iki reseptör tipinin de bol miktarda ifade edildiği görülmektedir. Flt-1 ekspresyonu, HAp-BS kompozitindeki HUVEC kültüründe, kontrol BS'de ve HAp-BS kompozitinde ise HUVEC-SaOS-2 kokültüründe oldukça az tespit edilmiştir. Flk-1 ekspresyonu ise sadece HUVEC kültürü kontrol BS'de diğerlerine oranla daha az gözlemlenmiştir. Flk-1 reseptörü vaskülerizasyon ve anjiyogenezden asıl sorumlu olan reseptördür ve flt-1 reseptörü VEGF'i bağlayarak flk-1 reseptörüne bağlanmayı engelleyebilmekte, böylece vaskülerizasyon aktivitesinin azalmasında görev alabilmektedir (Park et al., 1994). Xue'nun çalışmasında flt-1 reseptörünün antikorlar ile bloke edilmesi sonucu anjiyogenezde belirgin artış görülmüştür. Anjiyogenez başladığında flk-1, sonlandığında ise flt-1 reseptörlerindeki ekspresyon miktarının arttığı gözlemlenmiştir (Xue et al., 2009). Çalışmada elde

edilen flt-1 reseptörünün az ifade edildiği kültürlerin aslında vaskülarizasyon için en uygun kültürler olabileceği düşünülmektedir. Çünkü bu kültürlerde vaskülarizasyondan asıl sorumlu olan flk-1 reseptörü bol miktarda ifade edilmekte ve VEGF'in flk-1'e bağlanmasını engelleyecek flt-1 reseptörü çok fazla bulunmamaktadır. Yalnızca kontrol BS'deki HUVEC kültüründe flk-1 ekspresyonu diğer BS tiplerine göre daha az olarak belirlenmiştir. Bunun sebebinin, por çapları çok küçük olan kontrol BS'nin, EPC'den daha büyük olan HUVEC'lerin vaskülarizasyon için göç edememeleri ve dolayısıyla vaskülarizasyon prosesinin başlamaması olduğu düşünülmektedir.

SaOS-2 hücrelerinin osteoblastik farklılaşma yeteneğini ve mineralize HDM oluşturabildiğini gözlemlemek için deksametazon, askorbik asit ve β -gliserofosfat içeren osteojenik farklılaşma ortamında 21 gün boyunca inkübe edilmişlerdir. Mineralize HDM, çoğunlukla tip 1 kolajen, az ama önemli miktarda osteokalsin, matriks gla proteini, osteopontin, kemik sialoprotein, kemik morfogenetik protein, TGF- β ve HAp içermektedir. Osteoblast farklılaşması; hücre proliferasyonu, matriks olgunlaşması ve matriks mineralizasyonu olmak üzere üç aşamada karakterize edilir (Stein and Lian, 1993). Matriks olgunlaşması ve mineralizasyonunun; hücrelerin konfluent olması ve ortama osteojenik faktörlerin eklenmesi ile arttığı bilinmektedir (Kasperk et al., 1995). Hücre proliferasyonu sırasında pek çok HDM proteini salgılanır, matriks olgunlaşması ise yüksek miktarda alkalin fosfat ekspresyonu ile karakterizedir. Osteokalsin, osteopontin, kemik sialoprotein gibi proteinlerin üretimi için genler ifade edilir ve mineralizasyon tamamlanır. Hücrelerin mineralize matriks oluşturabilmesi için ortama eklenen osteojenik faktörlerin pek çok farklı ve mineralizasyonu indükleyici etkileri bulunmaktadır. Dekametazon, glikokortikoid yapılı bir steroidtir ve yapılan çalışmalar ile hücre büyümesini ve kalsiyum fosfat depozitlerinin oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir. Cheng ve arkadaşlarının insan kemik iliği stromal hücreleri ile yaptığı çalışmada, deksametazonun ayrıca alkalin fosfat üretimini arttırdığı görülmüştür (Cheng et al., 1996). Bir monosakkarit türevi olan askorbik asidin ise hücre büyümesini, kolajen sentezini ve alkalin fosfat aktivitesini arttırdığı bilinmektedir (Choi et al., 2008). β -gliserofosfat, alkalin fosfat enzimi ile hidrolize olur ve ortama yüksek miktarda fosfat iyonu verir. Böylece hücreler bu fosfat iyonlarını kullanarak mineralizasyonu sağlayabilmektedir (Coelho and Fernandes, 2000). Bütün bu osteojenik faktörlerin varlığında SaOS-2'lerin osteoblastik farklılaşma ve mineralize HDM oluşturduklarını gözlemlemek amacıyla yapılan denemenin sonucunda, bu faktörlerin varlığında mineralizasyon gözlemlenirken, faktörlerin eksikliğinde

mineralizasyon gözlemlenmemiştir. Deneme 21 gün boyunca devam ettirilmiş ve süre arttıkça oluşan mineral depozitleri de artmıştır. BS üzerinde yapılan mineralizasyon denemesinde farklı tip BS'lerin SaOS-2'lerin mineralize HDM oluşturmasında fark oluşturup oluşturmadığı gözlenmiş ve her bir farklı tip BS üzerindeki kültüre osteojenik faktörler içeren vasat eklenerek 21 gün boyunca inkübe edilmiştir. 7 – 14 ve 21. günün sonunda yapılan Alizarin red S ve Von Kossa boyamalarına göre her tip BS'de mineralizasyon olduğu gözlemlenmiştir. HAp içeren BS iskenin özellikle Alizarin red S boyamasında pembe renk alma sebebinin, BS'nin içerisinde bulunan HAp olduğu düşünülmektedir.

6. ÖNERİLER

BS-HAp kompoziti üzerinde SaOS-2 hücreleri ile oluşturulmuş kemik modelinde, EPC ve HUVEC'ler ile vaskülarizasyon sağlanması amaçlanan bu çalışmanın sonucunda, BS'nin por çaplarının normale göre 5-10 kat arttırıldığı, fakat bu artışın efektif vaskülarizasyon için yeterli olmadığı gözlemlenmiştir. EPC'lerin SEM fotoğraflarında BS liflerinin arasına girdiği, ters faz ışık mikroskopunda endotel hücreler ile tüp oluşumu gözlemlense de, histolojik çalışmalarda hücrelerin iskele boyunca çok fazla ilerleyemedikleri görülmüştür. Bundan sonraki çalışmalarda farklı teknikler ile BS por çapları arttırılarak daha iyi damarlanmaya elverişli olacak şekilde BS modifiye edilebilir.

BS her ne kadar kemiğe yakın mekanik ve fiziksel özellikler taşısa da, bir doku iskelesinin taşıması gereken önemli özelliklerden biri olan biyobozunurluk özelliğine sahip değildir. Bu yöntem ile hastanın kendi hücreleri kullanılarak elde edilebilecek vaskülerize kemik grefti, kemik hasarlarının onarımında kullanıldığında bozunmayacağı için, hastanın kemik hücreleri iskelenin bulunduğu yeri tamamen dolduramayacaktır. Bu sorunun üstesinden gelmek için, BS'nin biyobozunurluğu istenilen bozunma hızında olacak şekilde ayarlanabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acton, Q.A.**, 2013, Blood Vessels—Advances in Research and Application, Q. A. Acton (Ed.), Scholarly Editions, USA, 437 pp.
- Adina, C., Florinela, F., Abdelmoumen, T., and Carmen, S.**, 2010, Application of FTIR spectroscopy for a rapid determination of some hydrolytic enzymes activity on sea buckthorn substrate, *Rom Biotech Lett*, 15, 5738-5744 pp.
- Ahn, J.B., Rha, S.Y., Shin, S.J., Jeung, H.-C., Kim, T.S., Zhang, X., Park, K.H., Noh, S.H., Roh, J.K., and Chung, H.C.**, 2010, Circulating endothelial progenitor cells (EPC) for tumor vasculogenesis in gastric cancer patients, *Cancer Letters*, 288(1), 124-132 pp.
- Aktaş, S.H., ve Akbulut, H.**, 2010, Kemoterapinin kolon kanseri, meme kanseri ve mide kanserinde VEGF düzeylerine etkisinin *in vivo* ve *in vitro* incelemesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Temel Biyoteknoloji, 56 s.
- Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H.K., and Benton, G.**, 2009, The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: State of the science and the art, *Angiogenesis*, 12(3), 267-274 pp.
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., and Isner, J.M.**, 1999, Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization, *Circ Res*, 85(3), 221-228 pp.
- Augustin, G., Antabak, A., and Davila, S.**, 2007, Retracted: The periosteum: Part 1: Anatomy, histology and molecular biology, *Injury*, 38(10), 1115-1130 pp.
- Aydemir, B., ve Sari, E.K.**, 2010, Platelet kaynaklı büyüme faktörünün yapısı, fonksiyonları ve gelişim üzerine etkileri, *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 4(3), 209-214 s.
- Bäckdahl, H., Esguerra, M., Delbro, D., Risberg, B., and Gatenholm, P.**, 2008, Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(6), 320-330 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Bäckdahl, H., Helenius, G., Bodin, A., Nannmark, U., Johansson, B.R., Risberg, B., and Gatenholm, P.,** 2006, Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells, *Biomaterials*, 27(9), 2141-2149 pp.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., and Tomic-Canic, M.,** 2008, Growth factors and cytokines in wound healing, *Wound Repair and Regeneration*, 16(5), 585-601 pp.
- Baselga, J.,** 2002, Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy, *The Oncologist*, 7(Supplement 4), 2-8 pp.
- Bates, D.O.,** 2010, Vascular endothelial growth factors and vascular permeability, *Cardiovascular Research*, 87(2), 262-271 pp.
- Bauer, T.W., and Muschler, G.F.,** 2000, Bone graft materials: An overview of the basic science, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 371, 10-27 pp.
- Bellido, T., Plotkin, L.I., and Bruzzaniti, A.,** 2014, Bone Cells, Basic and Applied Bone Biology, San Diego: Academic Press, USA, 27-45 pp.
- Bettinger, C.J., Weinberg, E.J., Kulig, K.M., Vacanti, J.P., Wang, Y., Borenstein, J.T., and Langer, R.,** 2006, Three-dimensional microfluidic tissue-engineering scaffolds using a flexible biodegradable polymer, *Advanced Materials*, 18(2), 165-169 pp.
- Bueno, E.M., and Glowacki, J.,** 2009, Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration, *Nature Reviews Rheumatology*, 5(12), 685-697 pp.
- Buschmann, J., Welti, M., Hemmi, S., Neuenschwander, P., Baltes, C., Giovanoli, P., Rudin, M., and Calcagni, M.,** 2010, Three-dimensional co-cultures of osteoblasts and endothelial cells in degradable foam: Histological and high-field magnetic resonance imaging analyses of pre-engineered capillary networks in bone grafts, *Tissue Engineering Part A*, 17(3-4), 291-299 pp.
- Bussolino, F., Mantovani, A., and Persico, G.,** 1997, Molecular mechanisms of blood vessel formation, *Trends in Biochemical Sciences*, 22(7), 251-256 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Cancedda, R., Dozin, B., Giannoni, P., and Quarto, R.,** 2003, Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone, *Matrix Biology*, 22(1), 81-91 pp.
- Carmeliet, P.,** 2000, Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis, *Nature Medicine*, 6(4), 389-396 pp.
- Carmeliet, P.,** 2003, Angiogenesis in health and disease, *Nature Medicine*, 9(6), 653-660 pp.
- Carmeliet, P.,** 2005, Angiogenesis in life, disease and medicine, *Nature*, 438(7070), 932-936 pp.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K.,** 2011, Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis, *Nature*, 473(7347), 298-307 pp.
- Cartmell, S.H., Porter, B.D., García, A.J., and Guldberg, R.E.,** 2003, Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs in vitro, *Tissue Engineering*, 9(6), 1197-1203 pp.
- Chan, B., and Leong, K.,** 2008, Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations, *European Spine Journal*, 17(4), 467-479 pp.
- Cheng, K.-C., Catchmark, J.M., and Demirci, A.,** 2011, Effects of cmc addition on bacterial cellulose production in a biofilm reactor and its paper sheets analysis, *Biomacromolecules*, 12(3), 730-736 pp.
- Cheng, S.L., Zhang, S.F., and Avioli, L.V.,** 1996, Expression of bone matrix proteins during dexamethasone-induced mineralization of human bone marrow stromal cells, *Journal of Cellular Biochemistry*, 61(2), 182-193 pp.
- Cheng, X., Wang, Z., Yang, J., Ma, M., Lu, T., Xu, G., and Liu, X.,** 2011, Acidic fibroblast growth factor delivered intranasally induces neurogenesis and angiogenesis in rats after ischemic stroke, *Neurological Research*, 33(7), 675-680 pp.
- Choi, K.-M., Seo, Y.-K., Yoon, H.-H., Song, K.-Y., Kwon, S.-Y., Lee, H.-S., and Park, J.-K.,** 2008, Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation, *Journal of bioscience and bioengineering*, 105(6), 586-594 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Chu, T.-M., Halloran, J., Hollister, S.J., and Feinberg, S.E.,** 2001, Hydroxyapatite implants with designed internal architecture, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(6), 471-478 pp.
- Chung, J.C.-Y., and Shum-Tim, D.,** 2012, Neovascularization in tissue engineering, *Cells*, 1(4), 1246-1260 pp.
- Ciechańska, D.,** 2004, Multifunctional bacterial cellulose/chitosan composite materials for medical applications, *Fibres Textiles Eastern Eur*, 12, 69-72 pp.
- Clarke, B.,** 2008, Normal bone anatomy and physiology, *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 3(Supplement 3), S131-S139 pp.
- Coelho, M., and Fernandes, M.,** 2000, Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part ii: Effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation, *Biomaterials*, 21(11), 1095-1102 pp.
- Coffin, J., and Poole, T.,** 1988, Embryonic vascular development: Immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos, *Development*, 102(4), 735-748 pp.
- Conesa, C., Ríos, A., Ramírez, P., Rodríguez, M.M., Rivas, P., Canteras, M., and Parrilla, P.,** 2003, Psychosocial profile in favor of organ donation, *Transplantation Proceedings*, 35(4), 1276-1281 pp.
- Cross, M.J., and Claesson-Welsh, L.,** 2001, Fgf and vegf function in angiogenesis: Signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition, *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(4), 201-207 pp.
- Currey, J.D.,** 2002, *Bones: Structure and Mechanics*, Princeton University Press, USA, 436 pp.
- Czaja, W.K., Young, D.J., Kawecki, M., and Brown, R.M.,** 2007, The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications, *Biomacromolecules*, 8(1), 1-12 pp.
- D'antonio, J.A., Capello, W.N., Borden, L.S., Bargar, W.L., Bierbaum, B.F., Boettcher, W.G., Steinberg, M.E., Stulberg, S.D., and Wedge, J.H.,** 1989, Classification and management of acetabular abnormalities in total hip arthroplasty, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 243, 126-137 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Delloye, C., Cornu, O., Druetz, V., and Barbier, O.,** 2007, Bone allografts what they can offer and what they cannot, *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 89(5), 574-580 pp.
- Dobaczewski, M., Chen, W., and Frangogiannis, N.G.,** 2011, Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(4), 600-606 pp.
- Drake, C.J., and Fleming, P.A.,** 2000, Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo, *Blood*, 95(5), 1671-1679 pp.
- Erol, N.,** 2007, Vasküler endotelial büyüme faktörü ve anti-vegf ajanlar, *Journal of Retina-Vitreus*, 15, 35-40 s.
- Esguerra, M., Fink, H., Laschke, M.W., Jeppsson, A., Delbro, D., Gatenholm, P., Menger, M.D., and Risberg, B.,** 2010, Intravital fluorescent microscopic evaluation of bacterial cellulose as scaffold for vascular grafts, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 93(1), 140-149 pp.
- Esser, S., Lampugnani, M.G., Corada, M., Dejana, E., and Risau, W.,** 1998, Vascular endothelial growth factor induces ve-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells, *Journal of Cell Science*, 111(13), 1853-1865 pp.
- Family, R., Solati-Hashjin, M., Nik, S.N., and Nemati, A.,** 2012, Surface modification for titanium implants by hydroxyapatite nanocomposite, *Caspian Journal of Internal Medicine*, 3(3), 460 pp.
- Fang, B., Wan, Y.-Z., Tang, T.-T., Gao, C., and Dai, K.-R.,** 2009, Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells on hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposite scaffolds, *Tissue Engineering Part A*, 15(5), 1091-1098 pp.
- Feher, J.,** 2012, Overview of the Cardiovascular System and the Blood, Quantitative Human Physiology, Boston: Academic Press, USA, 419-427 pp.
- Ferrara, N., and Davis-Smyth, T.,** 1997, The biology of vascular endothelial growth factor, *Endocrine Reviews*, 18(1), 4-25 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ferrara, N., and Henzel, W.J.**, 1989, Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 161(2), 851-858 pp.
- Ferrari, G., Cook, B.D., Terushkin, V., Pintucci, G., and Mignatti, P.**, 2009, Transforming growth factor-beta 1 (tgf- β 1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (vegf)-mediated apoptosis, *Journal of cellular physiology*, 219(2), 449-458 pp.
- Folkman, J.**, 1995, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nature medicine*, 1(1), 27-30 pp.
- Fox, I. F.**, 1993, Human Physiology, W.C. Brown, USA, 312 pp.
- Friedlaender, G.E., Lin, S., Solchaga, L.A., Snel, L.B., and Lynch, S.E.**, 2013, The role of recombinant human platelet-derived growth factor-bb (rhpdgf-bb) in orthopaedic bone repair and regeneration, *Current Pharmaceutical Design*, 19(19), 3384-3390 pp.
- Gan, Y., Dai, K., Zhang, P., Tang, T., Zhu, Z., and Lu, J.**, 2008, The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion, *Biomaterials*, 29(29), 3973-3982 pp.
- Gaze, D. C.**, 2012, The Cardiovascular System - Physiology, Diagnostics and Clinical Implications, InTech, USA, 492 pp.
- Geiger, F., Lorenz, H., Xu, W., Szalay, K., Kasten, P., Claes, L., Augat, P., and Richter, W.**, 2007, Vegf producing bone marrow stromal cells (BMSC) enhance vascularization and resorption of a natural coral bone substitute, *Bone*, 41(4), 516-522 pp.
- Geva, E., Ginzinger, D.G., Zaloudek, C.J., Moore, D.H., Byrne, A., and Jaffe, R.B.**, 2002, Human placental vascular development: Vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-a, anjyopoietin-1, and anjyopoietin-2, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(9), 4213-4224 pp.
- Giannoudis, P., Psarakis, S., and Kontakis, G.**, 2007, Can we accelerate fracture healing?: A critical analysis of the literature, *Injury*, 38(1), S81-S89 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Giannoudis, P.V., Dinopoulos, H., and Tsiridis, E.,** 2005, Bone substitutes: An update, *Injury*, 36(3), S20-S27 pp.
- Giannoudis, P.V., Tzioupis, C.C., and Tsiridis, E.,** 2006, Gene therapy in orthopaedics, *Injury*, 37(1), S30-S40 pp.
- Gómez Barrena, E., Rosset, P., Müller, I., Giordano, R., Bunu, C., Layrolle, P., Konttinen, Y.T., and Luyten, F.P.,** 2011, Bone regeneration: Stem cell therapies and clinical studies in orthopaedics and traumatology, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(6), 1266-1286 pp.
- Gordan, J.D., and Simon, M.C.,** 2007, Hypoxia-inducible factors: Central regulators of the tumor phenotype, *Current Opinion in Genetics & Development*, 17(1), 71-77 pp.
- Götz, W., Gerber, T., Michel, B., Lossdörfer, S., Henkel, K.O., and Heinemann, F.,** 2008, Immunohistochemical characterization of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel (nanobone®) osteogenesis: A study on biopsies from human jaws, *Clinical Oral Implants Research*, 19(10), 1016-1026 pp.
- Grande, C.J., Torres, F.G., Gomez, C.M., and Carmen Bañó, M.,** 2009, Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications, *Acta Biomaterialia*, 5(5), 1605-1615 pp.
- Gutierrez, J., Retegi, A., Algar, I., Mondragon, G., Tercjak, A., and Mondragon, I.,** 2012, Conductive properties of hybrid tio 2/bacterial cellulose fibres by electrostatic force microscopy, *J Colloid Interface Sci.*, 377(1), 88-93 pp.
- Hadjipanayi, E., and Schilling, A.F.,** 2013, Hypoxia-based strategies for angiogenic induction: The dawn of a new era for ischemia therapy and tissue regeneration, *Organogenesis*, 9(4), 261 pp.
- Helenius, G., Bäckdahl, H., Bodin, A., Nannmark, U., Gatenholm, P., and Risberg, B.,** 2006, In vivo biocompatibility of bacterial cellulose, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 76(2), 431-438 pp.
- Hing, K., Best, S., Tanner, K., Bonfield, W., and Revell, P.,** 1999, Quantification of bone ingrowth within bone-derived porous hydroxyapatite implants of varying density, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 10(10), 663-670 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Hobzova, R., Duskova-Smrckova, M., Michalek, J., Karpushkin, E., and Gatenholm, P.**, 2012, Methacrylate hydrogels reinforced with bacterial cellulose, *Polymer International*, 61(7), 1193–1201 pp.
- Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T., and De Bruijn, E.A.**, 2004, Vascular endothelial growth factor and angiogenesis, *Pharmacol Rev*, 56(4), 549-580 pp.
- Hollinger, J.O.**, 2011, An Introduction to Biomaterials, CRC press, 664 pp
- Hollister, S.J., Liao, E.E., Moffitt, E.N., Jeong, C.G., and Kemppainen, J.M.** 2009, Defining design targets for tissue engineering scaffolds, *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Springer, 521-537 pp.
- Hong, L., Wang, Y., Jia, S., Huang, Y., Gao, C., and Wan, Y.**, 2006, Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route, *Materials Letters*, 60(13), 1710-1713 pp.
- Hristov, M., Erl, W., and Weber, P.C.**, 2003, Endothelial progenitor cells: Isolation and characterization, *Trends in Cardiovascular Medicine*, 13(5), 201-206 pp.
- Hur, J., Yoon, C.-H., Kim, H.-S., Choi, J.-H., Kang, H.-J., Hwang, K.-K., Oh, B.-H., Lee, M.-M., and Park, Y.-B.**, 2004, Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(2), 288-293 pp.
- Hutmacher, D.W., Schantz, J.T., Lam, C.X.F., Tan, K.C., and Lim, T.C.**, 2007, State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(4), 245-260 pp.
- Irvin, M.W., Zijlstra, A., Wikswo, J.P., and Pozzi, A.**, 2014, Techniques and assays for the study of angiogenesis, *Experimental Biology and Medicine*, 0, 1-13 pp.
- Johnson, E.O., Troupis, T., and Soucacos, P.N.**, 2011, Tissue-engineered vascularized bone grafts: Basic science and clinical relevance to trauma and reconstructive microsurgery, *Microsurgery*, 31(3), 176-182 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Jose, M.V., Thomas, V., Johnson, K.T., Dean, D.R., and Nyairo, E.,** 2009, Aligned plga/ha nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 5(1), 305-315 pp.
- Jose, M.V., Thomas, V., Xu, Y., Bellis, S., Nyairo, E., and Dean, D.,** 2010, Aligned bioactive multi-component nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering, *Macromolecular Bioscience*, 10(4), 433-444 pp.
- Jurgens, W.J., Kroeze, R.J., Bank, R.A., Ritt, M.J., and Helder, M.N.,** 2011, Rapid attachment of adipose stromal cells on resorbable polymeric scaffolds facilitates the one-step surgical procedure for cartilage and bone tissue engineering purposes, *Journal of Orthopaedic Research*, 29(6), 853-860 pp.
- Kasperk, C., Wergedal, J., Strong, D., Farley, J., Wangerin, K., Gropp, H., Ziegler, R., and Baylink, D.J.,** 1995, Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80(8), 2511-2517 pp.
- Kelm, J.M., Djonov, V., Ittner, L.M., Fluri, D., Born, W., Hoerstrup, S.P., and Fussenegger, M.,** 2006, Design of custom-shaped vascularized tissues using microtissue spheroids as minimal building units, *Tissue Engineering*, 12(8), 2151-2160 pp.
- Keramaris, N., Calori, G., Nikolaou, V., Schemitsch, E., and Giannoudis, P.,** 2008, Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of vegf, *Injury*, 39, S45-S57 pp.
- Keshk, S.,** 2014, Bacterial cellulose production and its industrial applications, *J Bioprocess Biotech*, 4(150), 2 pp.
- Khoo, C.P., Micklem, K., and Watt, S.M.,** 2011, A comparison of methods for quantifying angiogenesis in the matrigel assay in vitro, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 17(9), 895-906 pp.
- Kiliç, T., Yildirim, Ö., Şahin, S., ve Pamir, M.N.,** 2005, Glial tümörlerin anjiogenezi, *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 15(1), 1-9 s.
- Kim, B.-S., and Mooney, D.J.,** 1998, Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering, *Trends in Biotechnology*, 16(5), 224-230 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kim, H.J., Kim, U.-J., Kim, H.S., Li, C., Wada, M., Leisk, G.G., and Kaplan, D.L.**, 2008, Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds, *Bone*, 42(6), 1226-1234 pp.
- King, R.J.B., and Robins, M.W.**, 2006, Cancer Biology, Pearson/Prentice Hall, USA, 292 pp.
- Klemm, D., Schumann, D., Kramer, F., Heßler, N., Hornung, M., Schmauder, H.-P., and Marsch, S.**, 2006, Nanocelluloses as innovative polymers in research and application, Polysaccharides ii, *Springer*, 49-96 pp.
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., and Marsch, S.**, 2001, Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery, *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1561-1603 pp.
- Koç, A., Emin, N., Elçin, A.E., and Elçin, Y.M.**, 2008, *In vitro* osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells in a microgravity bioreactor, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 23(3), 244-261 pp.
- Kofron, M.D., and Laurencin, C.T.**, 2006, Bone tissue engineering by gene delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(4), 555-576 pp.
- Kraehenbuehl, T.P., Aday, S., and Ferreira, L.S.**, 2011, Scaffolding for Three-Dimensional Embryonic Vasculogenesis, *Springer*, 49-67 pp.
- Kraus, K.H., and Kirker-Head, C.**, 2006, Mesenchymal stem cells and bone regeneration, *Veterinary Surgery*, 35(3), 232-242 pp.
- Lamalice, L., Le Boeuf, F., and Huot, J.**, 2007, Endothelial cell migration during angiogenesis, *Circulation Research*, 100(6), 782-794 pp.
- Lanza, R., Langer, R., and Vacanti, J.P.**, 2011, Principles of Tissue Engineering, Academic Press, USA, 1936 pp.
- Lechler, R.I., Sykes, M., Thomson, A.W., and Turka, L.A.**, 2005, Organ transplantation—how much of the promise has been realized?, *Nature Medicine*, 11(6), 605-613 pp.
- Legeros, R.Z.**, 2002, Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 395, 81-98 pp.
- Leonhardt, H.**, 1993, Color Atlas and Textbook of Human Anatomy: Internal Organs (Vol. 2), Thieme Medical Publishers, 456 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Lerner, U.H.**, 2012, Osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes: Unveiling their intimate-associated responses to applied orthodontic forces, *Seminars in Orthodontics*, 18(4), 237-248 pp.
- Lieu, C., Heymach, J., Overman, M., Tran, H., and Kopetz, S.**, 2011, Beyond vegf: Inhibition of the fibroblast growth factor pathway and antiangiogenesis, *Clinical Cancer Research*, 17(19), 6130-6139 pp.
- Lin, W.-C., Lien, C.-C., Yeh, H.-J., Yu, C.-M., and Hsu, S.-H.**, 2013, Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications, *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 603–611 pp.
- Lindner, V., and Reidy, M.**, 1991, Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(9), 3739-3743 pp.
- Liu, C., Xia, Z., and Czernuszka, J.T.**, 2007, Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering, *Chemical Engineering Research and Design*, 85(7), 1051-1064 pp.
- Lobov, I.B., Brooks, P.C., and Lang, R.A.**, 2002, Anjiyopietin-2 displays vegf-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 11205-11210 pp.
- Lokmic, Z., Stillaert, F., Morrison, W.A., Thompson, E.W., and Mitchell, G.M.**, 2007, An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct, *The FASEB Journal*, 21(2), 511-522 pp.
- Lovett, M., Lee, K., Edwards, A., and Kaplan, D.L.**, 2009, Vascularization strategies for tissue engineering, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 15(3), 353-370 pp.
- Lutolf, M., and Hubbell, J.**, 2005, Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering, *Nature Biotechnology*, 23(1), 47-55 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ma, J., Van Den Beucken, J.J., Yang, F., Both, S.K., Cui, F.-Z., Pan, J., and Jansen, J.A.,** 2010, Coculture of osteoblasts and endothelial cells: Optimization of culture medium and cell ratio, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 17(3), 349-357 pp.
- Ma, P.X.,** 2004, Scaffolds for tissue fabrication, *Materials Today*, 7(5), 30-40 pp.
- Maneerung, T., Tokura, S., and Rujiravanit, R.,** 2008, Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing, *Carbohydrate Polymers*, 72(1), 43-51 pp.
- Martin, R., Chapman, M., Sharkey, N., Zissimos, S., Bay, B., and Shors, E.,** 1993, Bone ingrowth and mechanical properties of coralline hydroxyapatite 1 yr after implantation, *Biomaterials*, 14(5), 341-348 pp.
- Metallo, C.M., Mohr, J.C., Detzel, C.J., De Pablo, J.J., Van Wie, B.J., and Palecek, S.P.,** 2007, Engineering the stem cell microenvironment, *Biotechnology Progress*, 23(1), 18-23 pp.
- Meyer, U., Wiesmann, H.-P., Berr, K., Kübler, N., and Handschel, J.,** 2006, Cell-based bone reconstruction therapies-principles of clinical approaches, *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 21(6), 899 pp.
- Mironov, V., Kasyanov, V., and Markwald, R.R.,** 2011, Organ printing: From bioprinter to organ biofabrication line, *Current Opinion in Biotechnology*, 22(5), 667-673 pp.
- Mitrofanov, R., Budaeva, V., and Sakovich, G.,** 2010, Preparation and properties of bacterial cellulose gel films, *Chemistry for Sustainable Development*, 18, 503-508 pp.
- Mitsudomi, T., and Yatabe, Y.,** 2010, Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer, *FEBS Journal*, 277(2), 301-308 pp.
- Neufeld, G., Cohen, T., Shrager, N., Lange, T., Kessler, O., and Herzog, Y.,** 2002, The neuropilins: Multifunctional semaphorin and vegf receptors that modulate axon guidance and angiogenesis, *Trends in Cardiovascular Medicine*, 12(1), 13-19 pp.
- Niklason, L.E., and Langer, R.,** 2001, Prospects for organ and tissue replacement, *JAMA*, 285(5), 573-576 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., and Kojiro, M.,** 2006, Angiogenesis in Cancer, *Journal of Vascular Health and Risk Management*, 2(3), 213–219 pp.
- Nomi, M., Atala, A., Coppi, P.D., and Soker, S.,** 2002, Principals of neovascularization for tissue engineering, *Molecular Aspects of Medicine*, 23(6), 463-483 pp.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., and Salomon, D.S.,** 2006, Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer, *Gene*, 366(1), 2-16 pp.
- Novosel, E.C., Kleinhans, C., and Kluger, P.J.,** 2011, Vascularization is the key challenge in tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(4–5), 300-311 pp.
- Olad, A., and Farshi Azhar, F.,** 2014, The synergetic effect of bioactive ceramic and nanoclay on the properties of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite–montmorillonite scaffold for bone tissue engineering, *Ceramics International*, 40(7, Part A), 10061-10072 pp.
- Onishi, M., Ichikawa, T., Kurozumi, K., and Date, I.,** 2011, Angiogenesis and invasion in glioma, *Brain Tumor Pathology*, 28(1), 13-24 pp.
- Park, J.E., Chen, H.H., Winer, J., Houck, K.A., and Ferrara, N.,** 1994, Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to flt-1 but not to flk-1/kdr, *Journal of Biological Chemistry*, 269(41), 25646-25654 pp.
- Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., and Moore, M.A.,** 2000, Expression of vegfr-2 and ac133 by circulating human cd34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors, *Blood*, 95(3), 952-958 pp.
- Peister, A., Woodruff, M.A., Prince, J.J., Gray, D.P., Hutmacher, D.W., and Guldberg, R.E.,** 2011, Cell sourcing for bone tissue engineering: Amniotic fluid stem cells have a delayed, robust differentiation compared to mesenchymal stem cells, *Stem Cell Research*, 7(1), 17-27 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Peng, F., Yu, X., and Wei, M.,** 2011, In vitro cell performance on hydroxyapatite particles/poly (l-lactic acid) nanofibrous scaffolds with an excellent particle along nanofiber orientation, *Acta Biomaterialia*, 7(6), 2585-2592 pp.
- Place, E.S., George, J.H., Williams, C.K., and Stevens, M.M.,** 2009, Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering, *Chemical Society Reviews*, 38(4), 1139-1151 pp.
- Platt, J.L.,** 1998, New directions for organ transplantation, *Nature*, 392(6679 Suppl), 11-17 pp.
- Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P.,** 2011, Basic and therapeutic aspects of angiogenesis, *Cell*, 146(6), 873-887 pp.
- Powers, C., Mcleskey, S., and Wellstein, A.,** 2000, Fibroblast growth factors, their receptors and signaling, *Endocrine-Related Cancer*, 7(3), 165-197 pp.
- Prior, B.M., Yang, H., and Terjung, R.L.,** 2004, What makes vessels grow with exercise training?, *Journal of Applied Physiology*, 97(3), 1119-1128 pp.
- Richardson, M.R., and Yoder, M.C.,** 2011, Endothelial progenitor cells: Quo vadis?, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(2), 266-272 pp.
- Rifkin, D.B., and Moscatelli, D.,** 1989, Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor, *The Journal of Cell Biology*, 109(1), 1-6 pp.
- Risau, W.,** 1997, Mechanisms of angiogenesis, *Nature*, 386(6626), 671-674 pp.
- Risau, W., and Flamme, I.,** 1995, Vasculogenesis, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11(1), 73-91 pp.
- Rivera-Muñoz, E.M.,** 2011, Hydroxyapatite-based materials: Synthesis and characterization, *Biomedical Engineering-Frontiers and Challenges*, Reza R. Fazel-Rezai (Ed.), Intech, Mexico, 75-98 pp.
- Rosso, F., Marino, G., Giordano, A., Barbarisi, M., Parmeggiani, D., and Barbarisi, A.,** 2005, Smart materials as scaffolds for tissue engineering, *Journal of Cellular Physiology*, 203(3), 465-470 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Rouwkema, J., Boer, J.D., and Blitterswijk, C.a.V.,** 2006, Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct, *Tissue Engineering*, 12(9), 2685-2693 pp.
- Sachlos, E., and Czernuszka, J.,** 2003, Making tissue engineering scaffolds work. Review: The application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds, *Eur Cell Mater*, 5(29), 39-40 pp.
- Salgia, R.,** 2011, Prognostic significance of angiogenesis and angiogenic growth factors in nonsmall cell lung cancer, *Cancer*, 117(17), 3889-3899 pp.
- Santos, M.I., Fuchs, S., Gomes, M.E., Unger, R.E., Reis, R.L., and Kirkpatrick, C.J.,** 2007, Response of micro-and macrovascular endothelial cells to starch-based fiber meshes for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 28(2), 240-248 pp.
- Santos, M.I., and Reis, R.L.,** 2009, Vascularization in bone tissue engineering: Physiology, current strategies, major hurdles and future challenges, *Macromolecular Bioscience*, 10(1), 12-27 pp.
- Saska, S., Barud, H., Gaspar, A., Marchetto, R., Ribeiro, S., and Messaddeq, Y.,** 2011, Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration, *International Journal of Biomaterials*, 2011 pp.
- Saska, S., Scarel-Caminaga, R.M., Teixeira, L.N., Franchi, L.P., Dos Santos, R.A., Gaspar, A.M.M., De Oliveira, P.T., Rosa, A.L., Takahashi, C.S., and Messaddeq, Y.,** 2012, Characterization and in vitro evaluation of bacterial cellulose membranes functionalized with osteogenic growth peptide for bone tissue engineering, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(9), 1-14 pp.
- Schliephake, H., Neukam, F.W., Hutmacher, D., and Wüstenfeld, H.,** 1995, Experimental transplantation of hydroxylapatite-bone composite grafts, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 53(1), 46-51 pp.
- Schmidt, A., Brixius, K., and Bloch, W.,** 2007, Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis, *Circulation Research*, 101(2), 125-136 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Segev, D.L., Gentry, S.E., Warren, D.S., Reeb, B., and Montgomery, R.A.,** 2005, Kidney paired donation and optimizing the use of live donor organs, *JAMA*, 293(15), 1883-1890 pp.
- Sekine, H., Shimizu, T., Yang, J., Kobayashi, E., and Okano, T.,** 2006, Pulsatile myocardial tubes fabricated with cell sheet engineering, *Circulation*, 114(1 suppl), I-87-I-93 pp.
- Sendemir Urkmez, A., and Jamison, R.D.,** 2007, The addition of biphasic calcium phosphate to porous chitosan scaffolds enhances bone tissue development in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 81(3), 624-633 pp.
- Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., and Dvorak, H.F.,** 1983, Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science*, 219(4587), 983-985 pp.
- Shaffer, J.W., Field, G.A., Goldberg, V.M., and Davy, D.T.,** 1985, Fate of vascularized and nonvascularized autografts, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 197, 32-43 pp.
- Shantsila, E., Watson, T., Tse, H.-F., and Lip, G.Y.,** 2008, New insights on endothelial progenitor cell subpopulations and their angiogenic properties, *Journal of the American College of Cardiology*, 51(6), 669-671 pp.
- Shen, H., Clauss, M., Ryan, J., Schmidt, A., Tijburg, P., Borden, L., Connolly, D., Stern, D., and Kao, J.,** 1993, Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes, *Blood*, 81(10), 2767-2773 pp.
- Shibuya, M.,** 2006, Vascular endothelial growth factor receptor-1 (vegfr-1/flt-1): A dual regulator for angiogenesis, *Angiogenesis*, 9(4), 225-230 pp.
- Shim, I.K., Lee, S.Y., Park, Y.J., Lee, M.C., Lee, S.H., Lee, J.Y., and Lee, S.J.,** 2008, Homogeneous chitosan-plga composite fibrous scaffolds for tissue regeneration, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84(1), 247-255 pp.
- Simmons, R.G., Marine, S.K., and Simmons, R.L.,** 1987, Gift of life: The effect of organ transplantation on individual, family, and societal dynamics, Transaction Publishers, 526 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Smith, L., and Ma, P.**, 2004, Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 39(3), 125-131 pp.
- Sopyan, I., Mel, M., Ramesh, S., and Khalid, K.A.**, 2007, Porous hydroxyapatite for artificial bone applications, *Science and Technology of Advanced Materials*, 8(1-2), 116-123 pp.
- Steffens, L., Wenger, A., Stark, G.B., and Finkenzeller, G.**, 2009, In vivo engineering of a human vasculature for bone tissue engineering applications, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9b), 3380-3386 pp.
- Stein, G., and Lian, J.**, 1993, Molecular mechanisms mediating developmental and hormone-regulated expression of genes in osteoblasts: An integrated relationship of cell growth and differentiation, *Cellular and Molecular Biology of Bone*, 1, 47-95 pp.
- Svensson, A., Nicklasson, E., Harrah, T., Panilaitis, B., Kaplan, D.L., Brittberg, M., and Gatenholm, P.**, 2005, Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage, *Biomaterials*, 26(4), 419-431 pp.
- Şimşek, A., Çakmak, G., ve Cila, E.**, 2004, Kemik greftleri ve kemik greftlerinin yerini tutabilecek maddeler, *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi*, 2(3-4), 1-14 s.
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J.M., and Asahara, T.**, 1999, Ischemia-and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization, *Nature Medicine*, 5(4), 434-438 pp.
- Taylor, D., Hazenberg, J. G., and Lee, C. T.**, 2007, Living with cracks: Damage and repair in human bone, *Nature Materials*, 6, 263 - 268 pp.
- Tazi, N., Zhang, Z., Messaddeq, Y., Almeida-Lopes, L., Zanardi, L.M., Levinson, D., and Rouabhia, M.**, 2012, Hydroxyapatite bioactivated bacterial cellulose promotes osteoblast growth and the formation of bone nodules, *AMB Express*, 2(1), 1-10 pp.
- Teitelbaum, S.L.**, 2000, Bone resorption by osteoclasts, *Science*, 289(5484), 1504-1508 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Tekeli, S.Ö., ve Emerk, K.,** 2007, Endotel progenitör hücreler, *Marmara Medical Journal*, 20(1), 59-65 s.
- Therriault, D., White, S.R., and Lewis, J.A.,** 2003, Chaotic mixing in three-dimensional microvascular networks fabricated by direct-write assembly, *Nature Materials*, 2(4), 265-271 pp.
- Timmermans, F., Van Hauwermeiren, F., De Smedt, M., Raedt, R., Plasschaert, F., De Buyzere, M.L., Gillebert, T.C., Plum, J., and Vandekerckhove, B.,** 2007, Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(7), 1572-1579 pp.
- Tomé, L.C., Pinto, R.J., Trovatti, E., Freire, C.S., Silvestre, A.J., Neto, C.P., and Gandini, A.,** 2011, Transparent bionanocomposites with improved properties prepared from acetylated bacterial cellulose and poly (lactic acid) through a simple approach, *Green Chemistry*, 13(2), 419-427 pp.
- Unger, R.E., Sartoris, A., Peters, K., Motta, A., Migliaresi, C., Kunkel, M., Bulnheim, U., Rychly, J., and James Kirkpatrick, C.,** 2007, Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials, *Biomaterials*, 28(27), 3965-3976 pp.
- Uutela, M.,** 2004, PDGF-D: A Novel Member of the Platelet-Derived Growth Factor Family, University of Helsinki, Finland, 50 pp.
- Van Cruijsen, H., Giaccone, G., and Hoekman, K.,** 2005, Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: Opportunities for combined anticancer strategies, *International journal of cancer*, 117(6), 883-888 pp.
- Van der Loos, C. M.,** 2010, Chromogens in multiple immunohistochemical staining used for visual assessment and spectral imaging: the colorful future, *Journal of Histotechnology*, 33(1), 31-40 pp.
- Vitta, S., and Thiruvengadam, V.,** 2012, Multifunctional bacterial cellulose and nanoparticle-embedded composites, *Current Science(Bangalore)*, 102(10), 1398-1405 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Wan, Y., Huang, Y., Yuan, C., Raman, S., Zhu, Y., Jiang, H., He, F., and Gao, C.**, 2007, Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: C*, 27(4), 855-864 pp.
- Wan, Y.Z., Hong, L., Jia, S.R., Huang, Y., Zhu, Y., Wang, Y.L., and Jiang, H.J.**, 2006, Synthesis and characterization of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites, *Composites Science and Technology*, 66(11–12), 1825-1832 pp.
- Wang, J., Wan, Y., Luo, H., Gao, C., and Huang, Y.**, 2011, Immobilization of gelatin on bacterial cellulose nanofibers surface via crosslinking technique, *Materials Science and Engineering: C*, 32(3), 536–541 pp.
- Wang, J.C., Kanim, L.E., Nagakawa, I.S., Yamane, B.H., Vinters, H.V., and Dawson, E.G.**, 2001, Dose-dependent toxicity of a commercially available demineralized bone matrix material, *Spine*, 26(13), 1429-1435 pp.
- Wang, X., Nyman, J., Dong, X., Leng, H., and Reyes, M.**, 2010, Fundamental biomechanics in bone tissue engineering, *Synthesis Lectures on Tissue Engineering*, 2(1), 1-225 pp.
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., and Yoshinaga, F.**, 1998, Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture, *Cellulose*, 5(3), 187-200 pp.
- Wei, B., Yang, G., and Hong, F.**, 2011, Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties, *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 533-538 pp.
- Wenger, A., Stahl, A., Weber, H., Finkenzeller, G., Augustin, H., Stark, G., and Kneser, U.**, 2004, Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering, *Tissue Engineering*, 10(9-10), 1536-1547 pp.
- White, T.D., and Folkens, P.A.**, 2005, *The Human Bone Manual*, Academic Press USA, 488 pp.
- Witton, C.J., Reeves, J.R., Going, J.J., Cooke, T.G., and Bartlett, J.**, 2003, Expression of the her1–4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer, *The Journal of Pathology*, 200(3), 290-297 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Xu, Q.B.**, 2005, Endothelial progenitor cells in angiogenesis, *Sheng Li Xue Bao*, 57(1), 1-6 pp.
- Xue, Y., Petrovic, N., Cao, R., Larsson, O., Lim, S., Chen, S., Feldmann, H.M., Liang, Z., Zhu, Z., and Nedergaard, J.**, 2009, Hypoxia-independent angiogenesis in adipose tissues during cold acclimation, *Cell Metabolism*, 9(1), 99-109 pp.
- Yang, J., Zhou, W., Zheng, W., Ma, Y., Lin, L., Tang, T., Liu, J., Yu, J., Zhou, X., and Hu, J.**, 2006, Effects of myocardial transplantation of marrow mesenchymal stem cells transfected with vascular endothelial growth factor for the improvement of heart function and angiogenesis after myocardial infarction, *Cardiology*, 107(1), 17-29 pp.
- Yang, P., Huang, X., Wang, C., Dang, X., and Wang, K.**, 2013, Repair of bone defects using a new biomimetic construction fabricated by adipose-derived stem cells, collagen i, and porous beta-tricalcium phosphate scaffolds, *Experimental Biology and Medicine*, 238(12), 1331-1343 pp.
- Yilgor, P., Tuzlakoglu, K., Reis, R.L., Hasirci, N., and Hasirci, V.**, 2009, Incorporation of a sequential bmp-2/bmp-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 30(21), 3551-3559 pp.
- Yoon, C.-H., Hur, J., Park, K.-W., Kim, J.-H., Lee, C.-S., Oh, I.-Y., Kim, T.-Y., Cho, H.-J., Kang, H.-J., and Chae, I.-H.**, 2005, Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases, *Circulation*, 112(11), 1618-1627 pp.
- Young, S., Kretlow, J.D., Nguyen, C., Bashoura, A.G., Baggett, L.S., Jansen, J.A., Wong, M., and Mikos, A.G.**, 2008, Microcomputed tomography characterization of neovascularization in bone tissue engineering applications, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14(3), 295-306 pp.
- Zaborowska, M., Bodin, A., Bäckdahl, H., Popp, J., Goldstein, A., and Gatenholm, P.**, 2010, Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration, *Acta Biomaterialia*, 6(7), 2540-2547 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Zahra, N., Fayyaz, M., Iqbal, W., Irfan, M., and Alam, S.,** 2014, A process for the development of strontium hydroxyapatite, *Materials Science and Engineering*, 60(1), 1-5 pp.
- Zhang, R., and Ma, P.X.,** 1999, Poly (α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology, *Journal of Biomedical Materials Research*, 44(4), 446-455 pp.
- Zhou, W., Wang, M., Cheung, W., Guo, B., and Jia, D.,** 2008, Synthesis of carbonated hydroxyapatite nanospheres through nanoemulsion, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(1), 103-110 pp.
- Ziche, M., and Morbidelli, L.,** 2000, Nitric oxide and angiogenesis, *Journal of Neuro-Oncology*, 50(1-2), 139-148 pp.
- Zimmermann, K.A., Leblanc, J.M., Sheets, K.T., Fox, R.W., and Gatenholm, P.,** 2011, Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications, *Materials Science and Engineering: C*, 31(1), 43-49 pp.

ÖZGEÇMİŞ

ECE BAYIR

Doğum Tarihi: 16.04.1989

Biyomühendis

E-Posta: ece.bayir@biyomuhendis.com

GSM: (555) 575 3827

Eğitim

- *Eylül, 2012 – ... Yüksek Lisans;* Ege Üniversitesi, **Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı**, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova/İzmir
- *Eylül, 2008 – Haziran, 2012 Lisans;* Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, **Biyomühendislik Bölümü**, Bornova/İzmir (Mezuniyet Not Ortalaması: 3,19)
- *Eylül, 2003 –Haziran, 2007 Lise;* İzmir Atatürk Anadolu Lisesi, İzmir

Araştırma Alanları

- Elektromanyetik alanın kanser hücreleri ve mikroorganizmalar üzerine etkisi
- Manyetik nanopartiküllerin hayvan hücreleri üzerine etkisi ve kanser tedavisinde kullanım alanları
- Bakteriyel selüloz üretim optimizasyonu, karakterizasyonu, modifikasyonu ve doku mühendisliğinde kullanımı
- Doku mühendisliği
- Kanser fizyolojisi
- Biyo-uyumlu polimerler

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- **E. Bayir**, E. Bilgi, A. Sendemir-Urkmez, E. E. Hames-Kocabas (2013), “The potential utilization of ELF-EMF for inhibition of bacterial growth”, *Electromagnetic Biology and Medicine*, baskıda.

Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler

- **E. Bayir**, E. Bilgi, A. Sendemir-Urkmez (2013), “Implementation of Nanoparticles in Cancer Therapy”, Handbook of Research on Nanoscience, Nanotechnology & Advanced Materials, Ed. Mohamed Bououdina, IGI Global.

Patentler

- E. E. Hameş Kocabaş, E. Bilgi, **E. Bayır**, S. Suphi Öncel, A. Şendimir Ürkmez, “İçi boş yapıda farklı şekillerde bakteriyel selüloz üretimi gerçekleştirmek için reaktör ve üretim yöntemi”, Türk Patent Enstitüsü (TPE), Patent başvuru no: 2014/04316, Başvuru tarihi: 15.04.2014
- E. E. Hameş Kocabaş, E. Bilgi, **E. Bayır**, A. Şendimir Ürkmez, “Hammadde Olarak Keçiyoynuzu ve Kuru Fasulye Kullanılarak Bakteriyel Selüloz Üretim Yöntemi” Türk Patent Enstitüsü (TPE), Patent başvuru no: 2013/08604, Başvuru tarihi: 16.07.2013

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

- **E. Bayır**, E. Bilgi, E. E. Hameş Kocabaş, A. Şendimir Ürkmez (2013), “The Utilization of Bacterial Cellulose and Hydroxyapatite-Bacterial Cellulose Composite as a Tissue Engineering Scaffold”, *VI. International Bioengineering Congress*, Kasım 12-15, Aydın, Türkiye
- **E. Bayır**, E. Bilgi, S. Küçükdermenci, M. Ö. Özen, A. Sendimir Ürkmez (2012), “Evaluation of the Effects of Magnetic Nanoparticles on Human Bone Cells *in vitro*”, *Nanosafety Congress-Turkey: Workshop on the safety assessment of nanomaterials: New paradigms*, Nisan 26-28, Antalya, Türkiye
- E. Bilgi, **E. Bayır**, S. Küçükdermenci, M. Ö. Özen, A. Şendimir Ürkmez (2012), “Effects of Polymer Coatings on Cellular Responses to Magnetic Nanoparticles *in vitro*”, *8th Nanoscience and Nanotechnology Congress (NANOTR VIII)*, Haziran 25 -29, Ankara, Türkiye

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- **E. Bayır**, E. Bilgi, S. Küçükdermenci, M. Ö. Özen, A. Şendimir Ürkmez (2013), “Manyetit (Fe₃O₄) Nanopartiküllerin ve Farklı Kaplamaların İnsan Osteosarkoma Hücreleri Üstüne Etkileri”, *1. Ege Nanoteknoloji Günleri*, Nisan 18-19, İzmir, Türkiye
- E. Bilgi, **E. Bayır**, A. Şendimir Ürkmez, E. E. Hameş Kocabaş (2013), “Nanofiber yapılı bakteriyel selülozun alternatif karbon kaynakları ile üretilmesi”, *1. Ege Nanoteknoloji Günleri*, Nisan 18-19, İzmir, Türkiye

- E. Bilgi, **E. Bayır**, E. E. Hameş Kocabaş, A. Şendimir Ürkmez (2013), “Bakteriyel Selülozun Manyetik Nanopartiküller ve Hidroksiapatit için Taşıyıcı Olarak Kullanılması”, *1. Ege Nanoteknoloji Günleri*, Nisan 18-19, İzmir, Türkiye
- E. Bilgi, **E. Bayır**, A. Şendimir Ürkmez, E. E. Hameş Kocabaş (2012), “Mikroorganizmaların Ketlenmesinde Elektromanyetik Alan Kullanımı”, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Eylül 3–7, İzmir, Türkiye
- E. Bilgi, **E. Bayır**, S. Küçükdermenci, M. Ö. Özen, A. Şendimir Ürkmez (2012), “Kaplama ve Kaplamasız Manyetik (Fe_3O_4) Nanopartiküllerin İnsan Osteosarkoma Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi”, *17. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı*, Ekim 3–5, İstanbul, Türkiye
- **E. Bayır**, E. Bilgi, E. E. Hameş Kocabaş, A. Şendimir Ürkmez (2012), “Çok Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alanın Sağlıklı ve Kanseri Kökenli Hücreler Üzerine Etkisi”, *17. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı*, Ekim 3–5, İstanbul, Türkiye
- **E. Bayır**, E. Bilgi, E. E. Hameş Kocabaş, A. Şendimir Ürkmez (2012), “Çok Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alanın Hayvan Hücreleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması”, *9. Ege Biyomühendislik Günleri*, Nisan 20–21, İzmir, Türkiye
- E. Bilgi, **E. Bayır**, A. Şendimir Ürkmez, E. E. Hameş Kocabaş (2012), “Çok Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alanın Mikroorganizmalar Üzerine Etkilerinin Araştırılması”, *9. Ege Biyomühendislik Günleri*, Nisan 20–21, İzmir, Türkiye

Projeler

- 2013 - "Bakteriyel Selülozun Doku İskelesi Olarak Kullanıldığı Damarlanma Sağlayabilen *in vitro* 3 Boyutlu Tümör Modeli Geliştirilmesi" Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir, Proje No: 113M243 (1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı, bursiyer öğrenci). Bu proje COST Projesi'ne dönüştürülmüştür (Chemical Approaches to Targeting Drug Resistance in Cancer Stem Cells CM1106).
- 2013 - “Bakteriyel Selüloz Doku İskelesi Üzerinde Damarlı Kemik Modeli Oluşturulması” Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No: 13-FBE-008.
- 2011 - “Çok Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alanın Mikroorganizmalar,

Sağlıklı ve Kanseri Memeli Hücreleri Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması” Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (2209 Üniversite Öğrencileri Yurt İçi / Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı).

Asistanlık Yapılan Dersler

- Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Temel Laboratuvar
- Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Mühendislik Laboratuvarı
- Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı
- Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Deneyimler

- 2011 – **Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi**, Araştırma Laboratuvarı (ARLAB) (Zorunlu yaz stajı)

Çalışılan Konular: *enzim kinetiği ve aktivite ölçümü, hayvan hücre kültürü, elektroforez yöntemleri ve uygulama alanları, kromatografik yöntemler*

- 2010 – **Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü**, Onkoloji Laboratuvarı (Gönüllü yaz stajı)

Çalışılan Konular: *DNA ekstraksiyonu, RNA ekstraksiyonu, real time PCR, hücre kültürü, hücre canlılık testleri, apoptoz deteksiyonu, özel boyama ve görüntüleme yöntemleri, cDNA çevrimi, flow sitometrisi, Western blot, agaroz jel elektroforezi*

Katılan Seminer ve Sempozyumlar

- 2013 - VI. International Bioengineering Congress, Aydın, Türkiye
- 2013 - 19th International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED2013), Aydın, Türkiye
- 2013 – İnovasyon Çalıştayı, İzmir, Türkiye
- 2013 – 1. Ege Nanoteknoloji Günleri, İzmir, Türkiye
- 2012 – 17. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, İstanbul, Türkiye
- 2012 – 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, Türkiye
- 2012 - 8th Nanoscience and Nanotechnology Congress (NANOTR VIII), Ankara, Türkiye
- 2012 – Nanosafety Congress-Turkey: Workshop on the safety assessment of nanomaterials: New paradigms, Antalya, Türkiye
- 2010 – 2. Kök Hücre Sempozyumu, İzmir, Türkiye
- 2009 - İletişim – Finans – Pazarlama ve İnsan Kaynakları alanlarında “Mini MBA” Eğitimi, İzmir, Türkiye
- 2009 – Yapay Doku ve Organ Sempozyumu, İzmir, Türkiye
- 2009 - 1. Kök Hücre Sempozyumu, İzmir, Türkiye