

**KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN ELEKTRO-EĞRİLMİŞ  
POLİ(ε-KAPROLAKTON) MEMBRAN ESASLI DOKU  
İSKELELERİ**

**SCAFFOLDS BASED ON ELECTROSPUN POLI(ε-  
CAPROLACTONE) MEMBRANES FOR BONE TISSUE  
ENGINEERING**

**İSMAİL ALPER İŞOĞLU**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisanüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

**2009**

**Canım Aileme...**

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda**  
**DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Başkan** : .....  
Prof. Dr. Tülin Kutsal

**Üye (Danışman)** : .....  
Prof. Dr. Erhan Bişkin

**Üye** : .....  
Prof. Dr. Ayşe Kevser Özden Pişkin

**Üye** : .....  
Doç. Dr. Petek Korkusuz

**Üye** : .....  
Doç. Dr. İbrahim Vargel

## **ONAY**

Bu tez .... / .... / .... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Erdem Yazgan  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Müdürü

# KEMİK DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN ELEKTRO-EĞRİLMİŞ POLİ(ε-KAPROLAKTON) MEMBRAN ESASLI DOKU İSKELELERİ

İsmail Alper İšođlu

## ÖZ

Tez çalışmasının ilk aşamasında, kalay oktoat katalizörlüğünde (ε-kaprolakton) monomerinden düşük ve yüksek moleköl ağırlıklı poli(ε-kaprolakton) sentezlenmiştir. Sentezlenen PCL'ler, ağırlıkça % 80 düşük - % 20 yüksek moleköl ağırlıklı polimer içerecek şekilde karıştırılmış ve blendler hazırlanmıştır. Hazırlanan blendlerden elektro-eğirme yöntemi kullanılarak örgüsüz nanofiber yapıda mikro gözenekli membranlar üretilmiştir. Membranların kimyasal ve fiziksel özellikleri çeşitli yöntemler ile incelenmiş, mekanik özellikleri test edilmiş ve *in vitro* bozunma davranışları araştırılmıştır. Karakterizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra elektro-eğirilmiş mikro gözenekli membranlardan dairesel olarak katlama yöntemi ile makro kanallara sahip üç boyutlu doku iskeleleri hazırlanmıştır. Hazırlanan membranlara ve doku iskelelerine iki farklı yaklaşımla, osteoblastik aktiviteyi arttırdığı ve yenik kemik oluşumuna katkıda bulunduğu literatürde rapor edilmiş olan simvastatin yüklenmiştir. Doku iskeleleri ve bunların simvastatin yüklü formları, hücre tutunması ve çoğalması açısından değerlendirilmek üzere *in vitro* hücre kültür çalışmasında incelenmiştir.

Çalışmanın son kısmında doku iskeleleri, kritik büyüklükteki kranial kemik defekti için onarım malzemesi olarak, iki aşamada tamamlanan hayvan çalışmalarında denenmiştir. İlk aşama hayvan çalışmasında, doku iskeleleri ve simvastatin yüklü formları denek hayvanı olarak seçilen sıçanların kranial bölgesinde oluşturulan kritik büyüklükteki defektlere yerleştirilmiş, doku cevabı ve defekt iyileşmesi açısından karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Çalışmada her gruptan 1, 3 ve 6. aylarda hayvanlar sakrifiye edilmiş, alınan örnekler fikse edilip, µCT analizleri ve histolojik değerlendirmeleri gerçekleştirilmiştir.

İkinci aşama hayvan çalışmasında doku iskeleleri ve bunların mezenkimal kök hücrelerle birleştirilmiş formları defekt iyileşmesi, yeni kemik oluşumu ve doku cevabı açısından değerlendirilmiştir. Seçilen zaman noktalarında (1, 3 ve 6. ay) kemik örnekleri çıkartılmış, fikse edildikten sonra kalınlığı 5 µmetre olan histolojik kesitler alınmıştır. Kesitler, hematoksilin eozin ve masson trikrom ile boyanmış, 20 kesitten rasgele bir kesit alınarak her bir numune için hesaplama yapılmıştır. Defektteki yeşile boyanmış yeni kemik alanı Masson trikrom boyalı kesitler üzerinden hesaplanmıştır. Yeni kemik miktarının istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığını değerlendirmek için parametrik varyans analiz testi (sırasıyla çoklu karşılaştırmalar için one way ANOVA ve post-hoc test olarak Tukey testi) yapılmıştır. Kemik iyileşmesi ve doku cevabı parametrik-olmayan testlerle (çoklu karşılaştırmalar için Kruskal-Wallis ve Beonferoni düzeltmesi ile post-hoc test olarak Mann Whitney U) analiz edilmiştir. Kortikal kemik yapılanması ve kemik iliği elemanlarının iyileşmesi her bir grup için ayrı ayrı semikantitatif olarak incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kemik doku mühendisliği, poli( $\epsilon$ -kaprolakton), elektro-eğirme, örgüsüz nanofiber membran, simvastatin, kritik büyüklükte kraniyal kemik defekti, doku iskelesi, mezenkimal kök hücre.

Danışman: Prof. Dr. Erhan Bişkin, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

# ELECTROSPUN POLY( $\epsilon$ -CAPROLACTONE) MEMBRANE BASED SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING

İsmail Alper İşoğlu

## ABSTRACT

In this study, poly( $\epsilon$ -caprolactone) in low and high molecular weights were synthesized by using stannous (II) octoate as catalyst. Blends of different molecular weight polymers were prepared by mixing in a percentage of 80:20 (low MW: high MW). Microporous membranes in nonwoven nanofiber structure were produced by electrospinning method. Structural and mechanical properties and also *in vitro* degradation behaviour were investigated.

Following characterization, three dimensional scaffolds having macrochannels were obtained by electrospun microporous membranes using spiral wounding method. Simvastatin, which has ability to enhance osteoblastic activity and lead new bone formation as shown in literature, was loaded to the membranes and scaffolds by two different approaches. Scaffolds and their drug-loaded forms were investigated *in vitro* for their cell attachment and proliferation properties.

In the final part of the study, scaffolds were applied to animals as regeneration materials for critical size cranial defects. At first stage, scaffolds and their simvastatin-loaded forms were placed into the critical size defects formed in calvaria of the rats. They were investigated in terms of tissue response and healing of the defect. Rats from each group were sacrificed at the end of the 1st, 3rd and 6th months. Samples were fixed and MicroCT analyses and histological studies were performed.

At the second stage, scaffolds and their mesenchymal stem combined forms were evaluated as their ability in defect regeneration, new bone tissue formation and tissue response. Bone tissue samples were removed in different time points

(1st, 3rd and 6th months) and histological 5  $\mu\text{m}$  sections were prepared following fixation. These sections were stained by hematoxylin eosin and Masson's trichrome and new bone quantity was calculated for each sample by random selection of one in twenty samples. Green-stained new bone area was calculated based on Masson's trichrome sections. Statistical analysis of new bone formation was evaluated by parametric variant analysis test (one way ANOVA and Tukey multiple comparison test as post-hoc). Bone regeneration and tissue response were analyzed by non-parametric tests (Kruskal-Wallis and Bonferroni correction for multiple comparisons and Mann Whitney U as post-hoc test). Cortical bone construction and healing of bone marrow components were investigated by semi-quantitatively for each group.

Keywords: Bone tissue engineering, poly( $\epsilon$ -caprolactone), electrospinning, nonwoven nanofiber membrane, simvastatin, scaffold, critical size cranial bone defect mesenchymal stem cell.

Supervisor: Prof. Dr. Erhan Bişkin, Hacettepe University, Chemical Engineering Department.

## TEŞEKKÜR

*Çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve tecrübesini paylaşan, kendisiyle çalışma fırsatı bulduğum için gurur duyduğum saygıdeğer hocam Prof. Dr. Erhan Pişkin'e;*

*Çalışmalarımın büyük bir bölümünü beraber yürüttüğüm ve kendilerinden çok şey öğrendiğim değerli hocalarım, Prof. Dr. Tülin Kutsal, Prof. Dr. Kevser Özden Pişkin, Doç. Dr. Petek Korkusuz, Doç. Dr. İbrahim Vargel, Yrd. Doç. Dr. Tarık Çavuşoğlu'na;*

*Yıllardır birlikte çalıştığım ve hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım, Bora Garipcan, Cafer Çakal, Filiz Sayar, Halil Murat Aydın, İlyas İnci, Kadriye Tuzlakoğlu, Levent Mete Özgürbüz, Memed Duman, Mustafa Oğuzhan Çağlayan, Nimet Bölgen, Oğulcan Evirgen, Sedat Odabaş, Soner Çakmak, Tolga Şirin ve kader arkadaşım Sinan Eğri'ye;*

*Güleryüzleriyle ve yardımseverlikleriyle bana çok güzel bir çalışma ortamı yaratan sevgili laboratuvar arkadaşlarım, Asya, Ayfer, Burcu Çelen, Burcu Otman, Emel, Nihan, Özlem, Zeynep ve kardeşim gibi sevdiğim Güneş'e;*

*Dostlarım, Ahmet Erkan Berhu, Berk Özkan, Bora Otman, Damla Köse, Ertuğ Ceyhan, Işın Nur Cicereli, Muhammet Gökdere, Mustafa-Duygu Soytürk, Özgür Öncel, Ulaş Cemgil Yıldırım ve Volkan-Özge-Duru Melek Özbay'a;*

*Bugüne kadar benden desteklerini esirgemeyen canlarım; annem Nigar, babam Mehmet, kardeşlerim Tunç, Orçun, Mustafa ve eşi Seda'ya;*

*Ve yıllardır her türlü huysuzluğuma katlanan, emeğini, sabrını ve sevgisini esirgemeyen, güzel nişanlım Sevil Dinçer'e en içten teşekkürlerimi sunarım.*

*İsmail Alper İşoğlu  
Eylül, 2009*

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	7
2.1. Doku Mühendisliği .....	7
2.2. Kemik Doku Mühendisliği .....	8
2.2.1. Kemik Dokusu.....	9
2.2.1.1. Kemik dokusunun yapısı.....	10
2.2.1.2. Kemik oluşumu ve resorpsiyonu .....	15
2.2.1.3. Kemik dokusunun yenilenmesi.....	19
2.3. Kemik Greftleri .....	22
2.3.1. Greft Tipleri .....	25
2.3.1.1. Otogreftler.....	25
2.3.1.2. Allogreftler .....	26
2.3.1.3. Zenogreftler .....	28
2.3.1.4. Kemik greftlerinin dezavantajları.....	29
2.4. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler .....	30

2.4.1. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Polimerik Biyomalzemeler .....	30
2.4.1.1. Sentetik polimerler .....	30
2.4.1.2. Doğal polimerler .....	33
2.4.1.3. Biyoaktif seramikler .....	35
2.4.2. Kemik Doku Mühendisliği Yapı İskeleleri .....	36
2.4.2.1. Doku iskeleleri üretim yöntemleri .....	38
2.5. Elektro-eğirme Yöntemi .....	42
2.5.1. Tarihi .....	42
2.5.2. Genel Proses Parametreleri .....	45
2.6. Statinler .....	47
2.6.1. Simvastatin .....	48
2.7. Mezenkimal Kök Hücreler .....	49
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	51
3.1. Poli( $\epsilon$ -kapralakton) Sentezi .....	52
3.2. Elektro-eğirme Yöntemi .....	52
3.2.1. Membran Hazırlanması .....	52
3.2.2. Membran Karakterizasyonu .....	54
3.2.2.1. Kimyasal ve ısı karakterizasyon .....	54
3.2.2.2. Mekanik karakterizasyon .....	55
3.2.2.3. <i>in vitro</i> bozunma davranışı .....	55
3.3. Doku iskelelerinin Hazırlanması ve Sterilizasyonu .....	56
3.4. Simvastatin Yükleme .....	56
3.5. <i>in vitro</i> Hücre Kültür Çalışması .....	57

3.6. Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Farklılaştırılması .....	57
3.7. Hayvan Çalışmaları ve Cerrahi Protokol.....	58
3.8. MicroCT Analizleri .....	62
3.9. Histolojik Değerlendirme .....	63
3.10. İstatistiksel Yöntemler .....	64
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	65
4.1. Elektro-eğrilmiş Membranların Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	66
4.1.1. FTIR Analizleri .....	68
4.1.2. NMR Analizleri .....	69
4.1.3. Membranların DSC Termogramı.....	69
4.1.4. GPC Analizleri .....	70
4.1.5. Mekanik Testler .....	71
4.1.6. Membranların <i>in vitro</i> Bozunma Davranışı .....	72
4.1.7. SEM Analizi .....	73
4.2. Doku iskelelerinin Hazırlanması ve Simvastatin Yüklenmesi .....	74
4.3. Doku İskelelerinin ve Simvastatin İçeren Formlarının <i>in vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları.....	77
4.4. Elektro-eğrilmiş PCL Esaslı Membranlardan Hazırlanan Doku İskelelerinin Ve Bunların Simvastatin Yüklü Formlarının Sıçanlar İçin Kritik Büyüklükte Kraniyal Kemik Defekt Modelinde <i>in vivo</i> İncelenmesi .....	78
4.4.1. Hayvan Çalışmaları .....	81
4.4.2. Histoloji Çalışmaları .....	84
4.4.3. MicroCT Çalışmaları .....	94

4.5. Elektro-eğrilmiş PCL Esaslı Membranlardan Hazırlanan Doku İskelelerinin ve Bunların Mezenkimal Kök Hücre İçeren Formlarının Sıçanlar İçin Kritik Büyüklükte Kraniyal Kemik Defekt Modelinde <i>in vivo</i> İncelenmesi.....	97
4.5.1. Hayvan alışmaları.....	97
4.5.2. Histoloji alışmaları .....	98
4.5.3. MicroCT alışmaları .....	105
5. SONUÇLAR .....	107
6. KAYNAKLAR.....	114
ZGEMİş .....	139

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Doku mühendisliğinin temel prensibi: 1) Hücrelerin izole edilmesi, 2: uygun hücre kültüründe sayılarının çoğaltılması, 3) büyüme faktörleri ve sitokinlerle birlikte uygun bir doku iskelesine ekimi 4) kültür ortamına koyma, 5) hazırlanan dokunun hasarlı bölgeye implante edilmesi .....	7
Şekil 2.2.	Kemik dokusunun ayrıntılı yapısı.....	11
Şekil 2.3.	Kompakt ve spongiyöz kemiğin şematik görünümü .....	12
Şekil 2.4.	Kemik hücrelerinin ve farklılaşma yollarının şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.5.	Endokondral kemikleşme.....	16
Şekil 2.6.	İntramembranöz kemikleşme.....	17
Şekil 2.7.	Kırık bölgesinde yeni oluşan kırık dokusu.....	20
Şekil 2.8.	Simvastatinin moleküler yapısı. ....	48
Şekil 3.1.	Isı ve katalizör varlığında poli( $\epsilon$ -kaprolakton) polimerizasyon reaksiyonu ..	52
Şekil 3.2.	Elektro-eğirme deney düzeneği. ....	53
Şekil 3.3.	Elektro-eğirme ile örgüsüz nanofiber yapıda membran eldesi.....	54
Şekil 3.4.	Kritik büyüklükte açılan kraniyal kemik defektinin şematik gösterimi .....	59
Şekil 3.5.	Defekt oluşturmak için kullanılan döner testere ve ucu.....	59
Şekil 3.6.	Kraniyumda döner testere kullanılarak defektin oluşturulması .....	60
Şekil 3.7.	Doku iskelelerinin oluşturulan kraniyal defekte yerleştirilmesi.....	61
Şekil 3.8.	Kök hücrelerin defekt alanına ve/veya doku iskelesi içerisine enjeksiyonu.....	61
Şekil 4.1.	Elektro-eğirme yöntemi ile hazırlanmış PCL membranlar.....	67
Şekil 4.2.	Membranlara ait FTIR spekturumu .....	68

Şekil 4.3.	Membranlara ait <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	69
Şekil 4.4.	Membranlara ait DSC termogramı.....	70
Şekil 4.5.	PCL'e ait çekme-uzama grafiği.....	71
Şekil 4.6.	Membranların 3 aylık <i>in vitro</i> bozunma davranışı .....	72
Şekil 4.7.	Membranların 1000 ve 5000 büyütmede SEM görüntüleri.....	73
Şekil 4.8.	Mikro gözeneklere ve makro kanallara sahip doku iskelesinin 50 ve 2500 büyütmede SEM görüntüleri .....	75
Şekil 4.9.	<i>in vitro</i> hücre kültür çalışması sonuçları.....	78
Şekil 4.10.	Doku iskelesi grubunda defekt bölgesinin 6. ay sonundaki görünümü ....	82
Şekil 4.11.	Fikse edilmek üzere 6. ay sonunda alınmış numune.....	82
Şekil 4.12.	1. ay sonuçları: Kontrol kavitesi boyunca beyin (Br) bölgesi gözlenmiştir. Kemikleşme kontrol grubunda (A, B) başlangıç seviyesindedir. Doku iskelesi yerleştirilmiş gruplarda defekt onarım prosesi çok daha ileri seviyededir (C-H). Kollajen fiberler (pembe: HE; yeşil: MT) ve kan damarları (oklar), doku iskelesinin makro kanalları (yıldız) boyunca yerleşmişler, biyouyumluluğu göz önüne sermişlerdir (C-H). Kullanılan kısaltmalar HE: Hematoksilen Eozin, MT: Masson Trikrom, I: Doku iskelesi, CT: Bağ dokusu, BM: Kemik iliği, CB: Kompakt kemik, NB: Yeni kemik, Co: Kollajen fibriller, Br: Beyin. ....	85
Şekil 4.13.	3. ay sonuçları: Kontrol grubu, doku iskelesi grupları ile karşılaştırıldığında defekt bölgesini dolduran organize olmamış gevşek bağ dokusu ile çok düşük bir iyileşme seviyesi sergilemiştir (A, B). Elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenmiş grupta yeni kemik oluşumu kortikal köşelerde başlamıştır (E, F). Aktif osteoblastlar tarafından çevrelenen yeni kemik matrisi yeşil ve olgun kemik matrisi ise MT ile kırmızı olarak gösterilmiştir. Bozunan biyomalzeme partikülleri ile sınırlandırılmış makro kanallar, genişlemiş ve oldukça yüksek vasküler fibröz kallus ile dolmuşlardır (G, H). Kollajen fiberler	

- (HE ile pembe, MT ile mavi) ve kan damarlarının doku iskelesi ile yakın ilişkide olduğu gözlenmiştir. Kullanılan kısaltmalar: HE: Hematoksilen Eozin, MT: Masson Trikrom, I: Doku iskelesi, CT: Bağ dokusu, BM: Kemik iliği, CB: Kompakt kemik, NB: Yeni kemik, Co: Kollajen fibriller ..... 86
- Şekil 4.14. 6. ay sonuçları: Kritik büyüklükteki kemik defekti hiç bir grupta tam olarak kemikleşmemiştir. Kontrol kavitesi düzensiz fibröz doku ile kaplanmış durumda kalmıştır (A, B). Doku iskeleleri gruplarında iyileşme süreci hızlanmıştır. Doku iskeleleri perilerden başlayarak içlere doğru bozunmuş, içerileri fibröz ve kemiksi kallus ile dolu makro kanallı küçük bölümlere ayrılmıştır (C, D). Elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenen grupta, kortikal kemiğin şekil değiştirmesi kemik iliğinin yenilenmesine izin vermiştir (E-H). Kullanılan kısaltmalar: HE: Hematoksilen Eozin, MT: Masson Trikrom, I: Doku iskelesi, CT: Bağ dokusu, BM: Kemik iliği, CB: Kompakt kemik, NB: Yeni kemik, Co: Kollajen fibriller ..... 87
- Şekil 4.15. Gruplara ait 3 aylık  $\mu$ -CT görüntüleri: (A) elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenmiş grup; (B) boş doku iskelesi grubu; (C) elektro-eğirme sonrası simvastatin damlatılmış grup; (D) kontrol grubu ..... 94
- Şekil 4.16. Gruplara ait 6 aylık  $\mu$ -CT görüntüleri: (A) elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenmiş grup; (B) boş doku iskelesi grubu; (C) elektro-eğirme sonrası simvastatin damlatılmış grup; (D) kontrol grubu ..... 95
- Şekil 4.17. Gruplara ait karşılaştırmalı  $\mu$ -CT analiz sonuçları ..... 96
- Şekil 4.18. *Doku iskelesi + kök hücre grubunda* defekt bölgesinin 6. ay sonundaki görünümü ..... 98
- Şekil 4.19. Yukarıdaki üst grup kontrol, alt grup doku iskelesi gruplarına ait kompakt kemikle sınırlı kraniyal defekt alanına ait mikrograflarıdır. Sol sütun 30, orta sütun 90, sağ sütun ise 180 günü göstermektedir. E, F, G ve J inset kavitenin içindeki bağ dokusu alanlarına ait görüntülerdir. Doku iskelesi, makro kanallarının içinde kavitede düzenli kemik

oluşumuna rehberlik etmektedir. G, J, I ve L'de doku iskelesinin makro kanalları ile fibroblastlar, kan damarları ve kollajen fibriller yakın temas halindedir. KK: Kompakt kemik, YK: Yeni kemik, BD: Bağ dokusu, S: Doku iskelesi, Ko: Kollajen fibril, HE: Hematoksilen eozin, MT: Masson trikrom..... 100

- Şekil 4.20. Yukarıdaki üst grup kök hücre, alt grup doku iskelesi + kök hücre gruplarına ait kompakt kemikle sınırlı kranial defekt alanı mikrograflarıdır. Sol sütun 30, orta sütun 90, sağ sütun ise 180 günü göstermektedir. Doku iskelesi + hücre gruplarında kavitede doku iskelesinin makro kanallarında yeni kemik miktarının sadece kök hücre grubuna göre daha fazla olduğu izlenmektedir. K'da kavite merkezindeki damardan zengin intramembranöz kemikleşme alanı izlenmektedir. L insette kavitenin merkezinde yıldızla işaretli bölgedeki kemik spikülü görülmektedir. . KK: Kompakt kemik, YK: Yeni kemik, BD: Bağ dokusu, S: doku iskelesi, Ko: Kollajen fibril, Dm: Damar, HE: Hematoksilen eozin, MT: Masson trikrom..... 101
- Şekil 4.21. Yeni kemik/toplam defekt alanına ilişkin tanımlı istatistikler..... 103
- Şekil 4.22. Doku cevabına ilişkin tanımlı istatistikler..... 103
- Şekil 4.23. Kan damarı sayısına ilişkin tanımlı istatistikler..... 104
- Şekil 4.24. Osteoblastlarla çevrili yeni kemik uzunluğuna ilişkin tanımlı istatistikler 104
- Şekil 4.25. *Doku iskelesi + kök hücre grubunun 6. ayına ait üç boyutlu genel  $\mu$ -CT görüntüsü..... 106*

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Islak kemiğin bileşimi.....	10
Çizelge 3.1.	Histolojik analiz için kullanılan semi kantitatif skorlama yöntemi .....	63
Çizelge 4.1.	PCL için FTIR spektrumundaki karakteristik pikler .....	68
Çizelge 4.2.	PCL molekül ağırlığı verileri .....	70
Çizelge 4.3.	PCL molekül ağırlığı verileri .....	70
Çizelge 4.4.	Membranların ortalama fiber ve ortalama gözenek boyutu dağılımı.	74
Çizelge 4.5.	Denek hayvanlarında 1, 3 ve 6. aylar sonunda yapılan gözlem sonuçları.....	83
Çizelge 4.6.	Kontrol grubu (Grup A) için doku yanıtı ve defekt iyileşmesine ait tanımsal istatistikler (N=2).....	90
Çizelge 4.7.	Boş doku iskelesi grubu (Grup B) için doku yanıtı ve defekt iyileşmesine ait tanımsal istatistikler (N=5).....	91
Çizelge 4.8.	Elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenen doku iskelesi grubu (Grup C) için doku yanıtı ve defekt iyileşmesine ait tanımsal istatistikler (N=5). .....	92
Çizelge 4.9.	Elektro-eğirme sonrasında simvastatin damlatılan doku iskelesi grubu (Grup D) için doku yanıtı ve defekt iyileşmesine ait tanımsal istatistikler (N=5) .....	93
Çizelge 4.10.	<i>Doku İskelesi + kök hücre grubuna</i> ait tüm denek hayvanları için 6. ay $\mu$ -CT değerleri.....	105

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$^1\text{H-NMR}$	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans
$\mu\text{-CT}$	: Mikro-Bilgisayarlı Tomografi
ARF	: Aktivasyon, Resorbsiyon, Formasyon
BMP	: Kemik Morfojenik Protein
DMEM	: Dulbecco Modified Eagle's Medium
DMF	: Dimetilformamid
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik asit
EGF	: Endotel Büyüme Faktörü
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri İlaç ve Gıda İdaresi
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FTIR	: Fourier Transform Enfraruj Spektroskopisi
GPC	: Jel Geçirgenlik Kromatografisi
HA	: Hidroksiapatit
HI	: Heterojenlik İndeksi
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
MEM	: Minimum Essential Medium
$M_n$	: Sayıca Molekül Ağırlığı
$M_w$	: Ağırlıkça Molekül Ağırlığı
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi
PCL	: Poli( $\epsilon$ -kaprolakton)
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TCP	: Trikalsiyum Fosfat
TGF- $\beta$	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
UV	: Morötesi

## 1. GİRİŞ

Doku mühendisliği, memeli dokularındaki yapı-fonksiyon ilişkilerinin anlaşılması ve doku fonksiyonlarının düzeltilmesi ve/veya artırılması amacıyla biyomalzemelerin geliştirilmesine yönelik, mühendislik ve yaşam bilimlerinin yöntem ve temellerini birleştiren alternatif bir bilim dalıdır. Doku mühendisliğinde temel prensip, işlevini yitirmiş dokuların tedavisi için, hastadan veya başka bir vericiden sağlıklı hücrelerin izole edilmesi, hücrelerin biyoaktif ajanlarla birlikte bir doku iskelesi üzerine ekilmesi, dokuların üç boyutlu olarak vücuttaki doğal formuna en uygun şekilde vücut dışında üretilmesi, üretilen dokuların hasarlı bölgeye implante edilmesi şeklinde tanımlanmaktadır (Rabkin ve Schoen, 2002).

Kemik doku mühendisliği, günümüzde kemik onarımı ve yenilenmesi için sunduğu yeni ve gelişimci yaklaşımıyla hızla yayılan bir çalışma alanı olmuştur. Günümüzde uygulanan geleneksel tedavi yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlar için alternatif bir çözüm arayışındadır (Burg et al., 2000). Özellikle geniş ölçekli kemik defektlerinin tedavisinde biyoaktif ajanlar ve büyüme faktörleri, kemik matrisleri ve benzeri biyolojik bileşikler içeren malzemelerin kullanıldığı yeni yaklaşımlar geliştirilmeye çalışılmaktadır (Pişkin et al., 2009) .

Kemik dokusu, organizmadaki diğer bağ dokularda olduğu gibi hücreler, lifler ve temel maddeden oluşmuş ancak yapısındaki kalsiyumdan ötürü sertleşmiş bir destek dokusudur. Beslenme, metabolik, hormonal ve mekanik koşullara çok duyarlı olduğu için aktif doku olarak kabul edilmektedir. İskelet sisteminin en önemli yapı taşı olan kemik, kaslarla birlikte çalışarak vücut hareketini sağlamakta, sert yapısından dolayı hayati önemi olan organların korumasını görevini yerine getirmektedir. Ayrıca, kan hücrelerinin yapıldığı kemik iliğini içermesi ve metabolik önemi olan kalsiyum deposu olması kemiğin metabolizmada destek dokusu olma dışında önemli rolleri olduğunu ortaya koymaktadır.

Kemik dokusu, yapısal bütünlüğünün bozulduğu kırık ve/veya defektlerde sürekli aktivasyon-resorpsiyon döngüsü ile kendini yenileme özelliğine sahiptir. Ancak belli büyüklük ve sınırların dışındaki hasarların bu fizyolojik mekanizma ile onarım mümkün değildir. Günümüzdeki klinik uygulamalarda; travmalardan, tümörlerden veya kazalardan kaynaklanan geniş kemik defektlerinin tedavisinde otojenik, allojenik, zenojenik veya seramik kemik greftleri kullanılmaktadır (Damiens, 1991).

Cerrahi girişimlerde tercih edilen ve altın standart olarak kabul edilen greft türü, hastanın kendinden alınan otojenik kemik greftleridir. Ancak bu tür greftlerin, morbitite-mortalite artırıcı özellik taşıması, her zaman yeterli miktar ve nitelikte uygun kemik bulunamaması, ek bir cerrahi operasyon alanı gerektirmesi, operasyon süresinin uzaması, hastanın psikolojik stresini artırması ve operasyon sonrası dönemde hastada ağrı ve enfeksiyon problemleri yaratması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Cook et al., 1993; Özeç, 2003). Alıcı ile aynı türden ancak genetik olarak farklı bireylerden elde edilen allojenik greftler, donör alan morbititesinin olmaması ve ek cerrahi işlem gerektirmemesi gibi avantajlarından dolayı tercih edilmektedir. Allogreftlerin hazırlanmasında uygulanan geliştirilmiş biyoteknolojik işlemler her ne kadar immünolojik reaksiyon ve hastalık taşıma potansiyelini azaltmış ancak bu sorunlara tam olarak bir çözüm getirememiştir. Ayrıca, otojenik greftlerle karşılaştırıldıklarında osteojenik özellikleri ve kanlanmaları daha düşük, resorpsiyon oranları çok daha yüksektir. Başka türlerden elde edilen zenogreftlerin genellikle memeli hayvanların kemiklerinden ya da mercanların dış iskeletlerinden elde edilirler. Zenogreftlerin kullanım alanları, alıcıda immün cevap oluşturmaları, ev sahibi kemik ile greft arasındaki damarlarda gelişen mikro anastomozların tıkanmaları nedeni ile oldukça kısıtlıdır. Seramik kemik greftler, son yıllarda giderek artan kullanım alanı bulmaktadırlar. Hidroksiapatit ile trikalsiyum fosfat ve kalsiyum fosfat içeren seramikler en çok kullanılan seramiklerdir. Bunların dışında biyolojik orijinli olmayan, biyobozunur özellik göstermeyen ancak kontur düzeltme ve yük taşıma özelliği olan titanyum, paslanmaz çelik ve krom-kobalt-molibden alaşımları gibi malzemeler kullanılmaktadır (Fonseca ve Walker, 1991). Ancak bunların özellikle büyüme

çağındaki hastalarda kullanımı uygun değildir. Yetişkin hastalar için ise sınırlı alanlarda ve miktarlarda kullanılmaktadır (Metzger et al., 2006).

Yukarıda özetlenen greft malzemelerin tüm bu dezavantajları, araştırmacıları geniş çaplı kemik defektlerinin tedavisi için yeni arayışlara yönlendirmiştir. Alternatif çözümlere yönelik yeni yaklaşımlardan bir tanesi de, gözenekli yapıda biyobozunur doku iskeleleri, bunların aktif ajan ve kök hücre içeren formlarının kemik dokusu yenilenmesinde kullanılmasıdır.

İdeal bir doku iskelesi, öncelikle hücrelerin yapışmasına, çoğalmasına ve doku iskelesi boyunca üç boyutlu olarak büyümesine izin verecek, damarlanmayı ve atıkların uzaklaştırmasını sağlayacak birbirleri ile bağlantılı gözenek yapısına sahip olmalıdır (Boyan et al., 1996, Whang et al., 2000). Aranılan diğer bir özellik ise doku iskelesinin özellikle üzerine yük binen kemik dokusu için yeterli mekanik dayanıma sahip olmasıdır. Doku iskelesi biyobozunur olmalı, bozunma hızı dokunun yenilenme hızına benzerlik göstermeli, bozunma sonucu ortaya çıkan ürünlerin toksik özellik göstermemesi gerekmektedir. Aynı zaman yapı bozunurken hücre çoğalmasını ve hücre dışı matrisi desteklemeye devam etmelidir (Temenoff et al., 2000). Tüm bu özelliklerin yanında kemik doku mühendisliği için kullanılacak doku iskelelerinin biyoyumlu olması, implante edildiği bölge ve çevre dokularla entegre olması, yüksek bir immün cevap oluşturmaması beklenmektedir. Tüm bu özelliklere ek olarak, doku iskelelerinin sterillenebilir olması, endüstriyel üretim için ölçek büyütme izin veren bir şekilde ve istenilen geometride üretilebilmesi, kemik doku mühendisliği iskeleleri için büyük önem taşımaktadır.

Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak doku iskelelerinin üretiminde doğal ve sentetik polimerler kullanılmaktadır. Bu polimerlerden, çözücü döküm ve partikül özütlemesi, gaz köpüklendirme, hızlı prototipleme, serbest katı formlama, mikroküre sinterleme, faz ayırma ve elektro-eğirme teknikleri kullanılarak doku iskeleleri üretilmektedir (Rezwan et al., 2006).

Elektro-eğirme yöntemi çapları nanometreden mikrona kadar değişebilen örgüsüz fibröz yapılar oluşturmak için geleneksel fiber fabrikasyon teknikler karşısında eşsiz bir teknolojidir. Elektro-eğirme yöntemi ile oluşturulmuş nanofibröz doku iskeleleri son derece yüksek bir yüzey-hacim oranına, ayarlanabilir gözenekliliğe, geniş bir boyut ve şekil yelpazesine uyarlanabilecek şekillendirilebilirliğe sahiptir. Buna ek olarak, iskele bileşimlerini kontrol ederek istenilen özelliklere ve fonksiyonlara sahip doku iskeleleri üretilebilir. Bu avantajlara bağlı olarak, elektro-eğirme ile elde edilen nanofibröz iskele yapılar geçmiş olduğumuz yıllar içerisinde malzemelerin farklı kompozisyonlarından yararlanılarak filtrasyon, optik ve kimyasal sensörler, elektrot malzemeleri ve biyolojik iskeleleri gibi geniş uygulama alanlarını kapsayacak şekilde araştırılmıştır. Birçok sentetik ve doğal polimerden elektro-eğirme yöntemi ile biyomedikal kullanım amaçlı nanofibröz doku iskelesi üretilmektedir. Özellikle, poli( $\alpha$ -hidroksi asit) grubuna ait, poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) ve poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL), biyouyumlulukları, elastomerik yapıları, biyobozunma özellikleri ve proses edilebilme kolaylıkları nedeniyle son yıllarda en çok araştırılan polimerlerin başında gelmektedir.

Poli ( $\epsilon$ -kaprolakton), biyobozunur alifatik poliesterlerden olup, diğer alifatik poliesterlerden farklı olarak  $-60^{\circ}\text{C}$  civarında düşük camsı geçiş sıcaklığına ve  $59-64^{\circ}\text{C}$  aralığında değişen erime sıcaklığına sahiptir. PCL'in bozunma sıcaklığı  $350^{\circ}\text{C}$  olduğundan yüksek sıcaklık dayanımlıdır (Engelberg ve Kohn, 1991). PCL yarı kristalin sentetik bir polimerdir ve kristalinitesi %60'a kadar çıkabilir. Düşük camsı geçiş sıcaklığına sahip olduğu için oda sıcaklığında her zaman kauçuğumsu haldedir. Toksik özellikleri çok düşüktür ve birçok terapötik ilaç yüksek geçirgenlik sergiler (Sosnik ve Cohn, 2003). Bu özelliğinden dolayı kontrollü ilaç salım uygulamalarında tercih edilmektedir. Enzimatik hidrolizin rol aldığı *in vivo* bozunması poli( $\alpha$ -hidroksi asit)'lere göre daha yavaştır.

Son yıllarda kemik defektlerinde kemik oluşumunun uyarılması için, sistemik olarak kullanılan bazı ilaçlarının lokal uygulamasının alternatif bir yöntem olabileceği ileri sürülmüştür. Hidroksimetilglutaril-koenzim A redüktaz (HMG-CoA redüktaz) inhibitörleri olarak tanımlanan statinler, yüksek kan kolesterol seviyesi bulunan

hastalarda serum kolesterol konsantrasyonunu düşürmek için yaygın olarak kullanılan en etkili ilaçlardır. Statinler tarafından HMG-CoA redüktaz enziminin inhibisyonu sonucu statinlerin kolesterol düşürücü etkilerinin dışında sinir sistemi, immün sistem, kardiyovasküler sistem ve iskelet sistemi üzerinde de bazı yararlı etkilere neden olduğu belirtilmektedir. Statinlerin iskelet sistemi üzerine, osteoklastların aktivasyonunu inhibe ederek ve kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2) geninin açığa çıkmasını sağlayıp kemik oluşumunu arttırarak yararlı etki gösterdikleri çalışmalarda yer almaktadır. Statin grubu ilaçların bir üyesi olan simvastatinin de özellikle lipofilik olması nedeniyle kemiğe etkisinin daha fazla olabileceği ifade edilmiştir. *In vivo* çalışmalarda özellikle lokal olarak uygulandığında simvastatinin, kemik gelişiminde statinler arasında en etkili olduğu belirtilmiştir (Thylin, 2002).

Son yıllardaki en önemli yaklaşımlardan bir diğeri de kök hücre tedavileridir. Buna paralel olarak kemik doku mühendisliğinde yetişkin hücreler yerine kök hücrelerinin kullanımı hızla önem kazanan bir olgudur. Mezenkimal kök hücreler (MSC), kan yapımını destekleyen ve en az osteojenik, adipojenik ve kondrojenik soya farklılaşa bilen multipotent progenitörlerdir. Bu özellikler, mezenkimal kök hücrelerini, hücre esas tedaviler için kullanışlı bir hücre grubu haline getirmiştir. Günümüzde, kemik iliği, mezenkimal kök hücrelerin hem deneysel hem de klinik uygulamalarında ana kaynak durumundadır. Ancak, bu kaynaktan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin sayısı ve farklılaşma kabiliyetlerinin yaşa bağlı olarak azalış gösterdiği bilinmektedir. Dolayısıyla diğer kaynaklar yoğun olarak araştırılmaktadır. Kordon kanı, taşıdığı çoğalma ve farklılaşma kabiliyeti yüksek mezenkimal kök hücreleri ile kemik iliğine alternatif bir kaynak durumundadır. Mezenkimal kök hücrelerinin kordon kanından saflaştırılması, hücre kültür ortamlarında çoğaltılması ve istenilen yönde farklılaştırılması için uygun tekniklerin geliştirilmesi yapılan çalışmalar arasındadır.

Bu çalışmanın amacı, elektro-eğirme tekniği ile hazırlanan örgüsüz nanofiber yapıda ve mikro gözeneklere sahip poli( $\epsilon$ -kaprolakton) membranlardan üç boyutlu, makro kanallara sahip biyobozunur doku iskelelerinin üretilmesi ve bunların kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmasıdır. Bu amaca ulaşmak için öncelikle PCL, iki farklı molekül ağırlığında (yüksek ve düşük) sentezlenmiş ve sentezlenen

polimerlerden hazırlanan blendler elektro-eğirme tekniği ile proses edilmiştir. Elde edilen membranlardan üç boyutlu mikro gözeneklere ve makro kanallara sahip doku iskelesi oluşturulmak üzere dairesel şekilde katlanmıştır. Kemik oluşumunu artırması/hızlandırması beklenen simvastatin, elektro-eğirme sırasında polimer çözeltisi ile birlikte ve elde edilen membranlardan doku iskelesi üretildikten sonra olmak üzere iki farklı yolla yüklenmiştir.

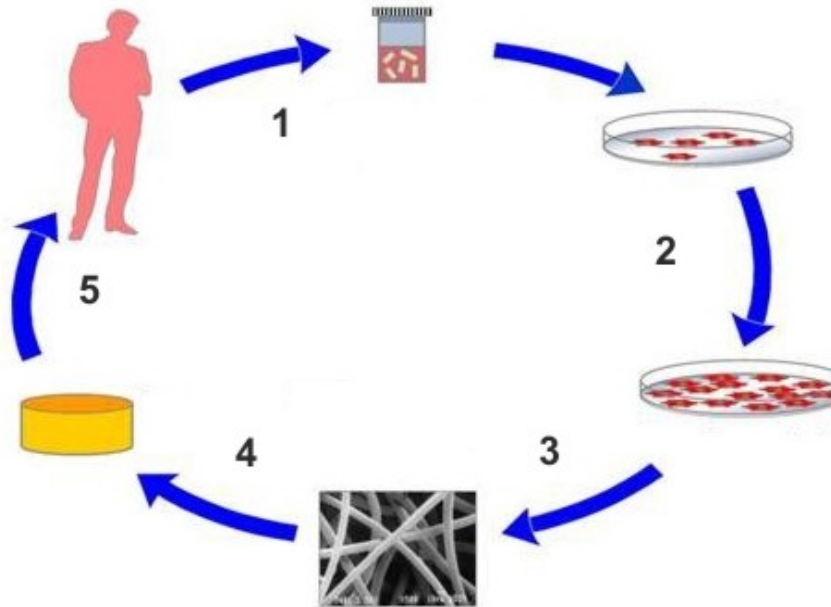
Sunulan tez çalışmasının son bölümünde, iki ayrı aşamada hayvan çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, üretilen doku iskeleleri, bunların simvastatin yüklü formları denek hayvanı olarak belirlenen sıçanların kranial bölgelerinde oluşturulan kritik boyda kemik defektlerine (kendi kendine yenilenme şansı olmayan büyüklükte defekt) yerleştirilmiş ve *in vivo* test edilmiştir. İkinci aşama hayvan çalışmasında doku iskeleleri ve bunların mezenkimal kök hücre aşılınmış formları, yine sıçanların kranial bölgesinde oluşturulan defektlerde onarım malzemesi olarak denenmiş, kemik iyileşmesi ve doku cevabı bakımından değerlendirilmiştir. Her iki çalışma ayrı ayrı 6 ay boyunca yürütülmüş ve 1, 3 ve 6. aylarda tüm gruplardan numuneler alınarak microCT analizleri ve histolojik değerlendirmeleri gerçekleştirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Doku Mühendisliği

“Doku mühendisliği” terimi ilk olarak 1987’de California Üniversitesi’nden Dr. Fung tarafından Birleşik Devletler Ulusal Bilim Kurumu’nda (National Science Foundation, NSF) gerçekleştirilen bir toplantıda kullanılmıştır. Doku mühendisliği, yapay organ ve/veya doku yaratmak ya da işlevini yitirmiş dokuların yenilenmesi sağlamak için malzeme ve mühendislik bilimini, yaşam bilimleri ile bir araya getiren disiplinler arası bir bilim dalıdır (Langer ve Vacanti 1993).

Doku mühendisliğinde temel prensip, hastadan veya başka bir vericiden alınan hücrelerin bir doku iskelesi üzerine ekilmesi, dokuların üç boyutlu olarak vücuttaki doğal formuna en uygun şekilde vücut dışında hücre/doku kültür ortamında üretilmesi, üretilen dokuların hasarlı dokuların yerine vücuda implante edilmesidir. Daha sonra doğal doku yenilenme süreci başlamakta, kan damarları yapının içine nüfus etmekte ve doku iskelesi bozunurken yerine yeni dokunun oluşmasına kılavuzluk etmektedir. Doku mühendisliğinin temel prensibi şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Doku mühendisliğinin temel prensibi: 1) Hücrelerin izole edilmesi, 2) uygun hücre kültüründe sayılarının çoğaltılması, 3) büyüme faktörleri ve sitokinlerle birlikte uygun bir doku iskelesine ekimi 4) kültür ortamına koyma, 5) hazırlanan dokunun hasarlı bölgeye implante edilmesi

Doku iskelesi, hücrelerin yapışmasına, çoğalmasına ve farklılaşmasına olanak sağlayan hücre dışı matris (“extracellular matrix”, ECM) olarak bir çatı oluşturmaktadır (Agrawal ve Ray, 2001; Sachols et al., 2003). Gerçek dokuda bulunan ECM, hücreler için fiziksel destek sağlamasının yanı sıra, hücre gelişmesi ve farklılaşması gibi çok önemli işlevleri yerine getirmektedir. Geniş çaplı bir doku hasarında, hasarlı bölgeye yalnızca hücrelerin yerleştirilerek söz konusu hasarın giderilmesi mümkün değildir. Bu nedenle yapay bir ECM oluşturacak bir iskeletin hücrelerle birlikte bu bölgeye yerleştirilmesi gerekmektedir. Yeni doku geliştikten ve hücreler yeni ECM oluşturabilecek kapasiteye ulaştıkları zaman iskeleye gerek kalmayacaktır. Bu sebeple doku iskelesinin en büyük özelliği biyobozunur olmasıdır.

Mevcut teknolojide doku mühendisliği üzerine yapılan çalışmalarında kısa vadede büyük gelişmeler beklenmektedir. Tıp, biyoloji ve malzeme teknolojilerindeki ilerlemeler sayesinde doku mühendisliği alanının gelecekte de bugün sahip olduğu önemi koruyacağı öngörülmektedir. Günümüzde doku mühendisliği prensipleri kullanılarak geliştirilen çeşitli organ ve doku sistemleri mevcuttur. Damar, sinir, karaciğer, kalp, nefes borusu, deri, idrar kesesi, kas, kornea, kemik ve kıkırdak dokuları bu dokular arasında sayılabilir.

## **2.2. Kemik Doku Mühendisliği**

Kemik doku mühendisliği, kemik onarımı ve yenilenmesi için sunduğu yeni ve gelişimci yaklaşımıyla hızla yayılan bir çalışma alanı olmaktadır. Genel olarak kemik doku mühendisliği yaklaşımı, yukarıda açıklandığı gibi doku hücreleri ve biyolojik ajanların bir araya gelerek doku iskeleleriyle beraber kullanımı olarak tanımlanır. Gelişmiş bir doku iskelesi yüksek kalite, güvenilirlik, süreklilik ve maliyet etkinliği sunmalıdır. Ayrıca, tedavi ve ameliyat dönemleri içinde gelişecek durumlara karşı ihtiyaçları karşılamalıdır. Kemik doku iskeleleri için konuma bağlı olarak istenen bir diğer özellik ise gözenekliliktir. Üç boyutlu bir doku iskelesi, hücrelerin tutunması, çoğalması ve farklılaşması için gerekli desteği sağlamalı ve genel olarak doğal kemik dokusunun şekline uygun tanımlanmalıdır.

Kemik yenilenmesi için geliştirilen birçok doku mühendisliği uygulaması ümit vericidir. Bunun yanında, üretilen doku iskelelerinin etkinliğinin araştırılması için

yapılan *in vitro* kültür çalışmalarından ve hayvan deneylerinden elde edilen ektopik modellerin, insan vücudunda her zaman bekleneni vermemesi kemik doku mühendisliği çalışmalarının en önemli sorunudur. Doku iskeleleriyle üretilen yapay kemik yamalarıyla ilgili çözülmeye çalışılan bir diğer problem ise damarlanmanın sağlanamamasıdır. Kemik doku mühendisliğindeki gelişmeler ve ileriye dönük eğilimler, karşılaşılan sorunların, kemiğin doğal yapısını taklit eden biyomalzemelerin tasarımı ile çözüleceği öngörülmektedir.

Bu bilgiler ışığında, kemik doku mühendisliği yaklaşımını açıklamak ve sunduğu yeni stratejileri açıklamak adına öncelikle kemik dokusu ve kemikleşme süreci ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Daha sonra kemik dokusu kayıplarının tedavisi için mevcut teknolojide kullanılan kemik greftlerine değinilmiş, ardından alternatif bir tedavi yöntemi olan kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan doku iskelelerinin sahip olması gereken özellikler, bu doku iskelelerinin üretiminde kullanılan biyomalzemeler ve sözü geçen malzemelerin üretim yöntemleri örnekler ile birlikte kısaca özetlenmiştir.

### **2.2.1. Kemik Dokusu**

Kemik, organizmanın en sert ve temel yapısıdır ve yaşam süresince kendini yenileyen, değişen fonksiyonel ihtiyaçlara ve mekanik streslere adapte olup yapısını değiştirebilen dinamik bir dokudur (Bronzino, 1995; Noyan, 1990; Park ve Lakes, 1992). Organizmadaki diğer bağ dokularında olduğu gibi kemik dokusu da hücreler, lifler ve temel maddeden oluşmuş ancak yapısındaki kalsiyumdan ötürü sertleşmiş bir destek dokusudur. Kemik dokusu beslenme, metabolik, hormonal ve mekanik koşullara çok duyarlı bir dokudur. Bu nedenle aktif doku olma özelliğini taşır. Vücudun hareket edebilme kabiliyeti için kaslarla birlikte bütünleyici bir göreve sahiptir. Kıkırdaklar da destek vermek suretiyle bu fonksiyona yardımcı olur. Kemik dokusu, iskeletimizin ağırlık taşıma kapasitesini belirler ve iç organlarımızı darbelere karşı korur. Bu yapısal işlevlerinin yanında, kalsiyum ve fosfor iyonlarını yapısında depolayarak ve kandaki önemli elektrolitlerin derişimlerini ayarlayarak homeostazda görev alır (Stevens, 2008). Ayrıca bağışıklık ve diğer dokulara oksijen ulaştırılması için çok önemli olan beyaz ve kırmızı kan hücrelerinin üretimi kemiklerin ortalarında yer alan kırmızı kemik iliğinde gerçekleşmektedir (Sikavitsas et al., 2001).

Vücut içindeki değişik yük taşıma şartları, makroskopik açıdan birbirinden farklı geometriye, mekanik özelliklere ve boyutsal dağılıma sahip kemik yapılarının oluşmasına neden olmuştur. Vücudumuzda, uzuvlardaki uzun kemikler, bileklerdeki kısa kemikler, kafatasındaki yassı kemikler ve omurlardaki düzensiz kemikler gibi birbirinden farklı özelliklere sahip 206 tane kemik vardır (Stevens, 2008).

### 2.2.1.1. Kemik dokusunun yapısı

Kemik dokusunun %70'i inorganik bileşiklerden %30'u organik bileşiklerden oluşmuştur. Islak kemiğin bileşimi Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Islak kemiğin bileşimi

---

%22 Organik matris

%95 Kollajen

%5 Diğer

%Mineral

%85 Hidroksiapatit (HA)

%15 Diğer (Sitrat, -OH, karbonat, florür)

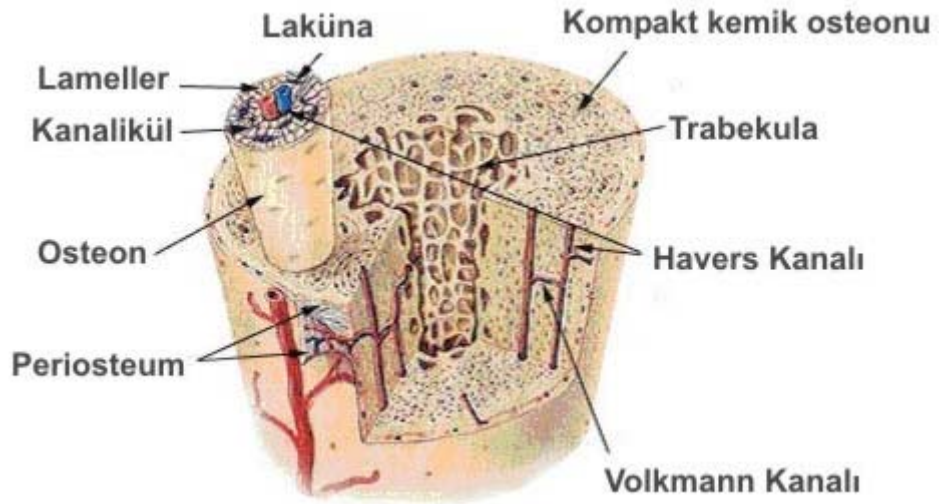
%9 Su

---

İnorganik bileşiklerin başında kalsiyum, fosfat, sitrat, magnezyum gibi maddeler gelir. Kalsiyum ve fosfat hidroksiapatit kristalleri şeklindedir ve kemik kollajenlerinin yanında amorf madde ile birlikte iç içe organize olmuşlardır. Hidroksiapatit kristallerinin kemikteki önemi, kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır. İnorganik maddeler kemiğin kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturmaktadırlar.

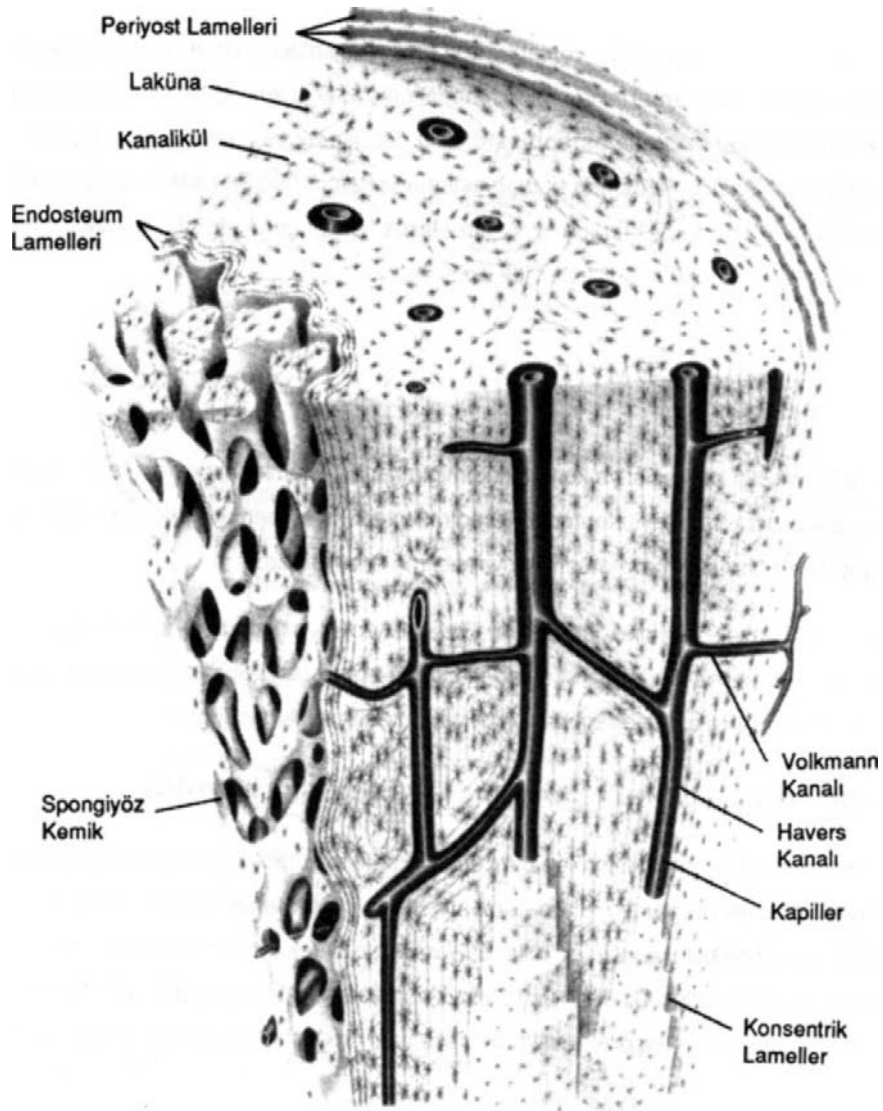
Organik kısmın büyük bir bölümü kollajen liflerden (Tip I), protein ve glikozaminoglikanlardan oluşan temel maddeden (amorf madde) yapılmıştır.

Gelişmiş bir kemik dokuda lifler paralel ve belirli aralıklarla aralarında gözenekler bırakacak şekilde yerleşmiş olup aralarında dokuya sertlik veren hidroksiapatit kristalleri yerleşiktir. Doku kollajenlerden zengin olduğundan bu liflere uygun boya ile gayet iyi boyanırlar. Histolojik incelemede dokuya eğer dekalsifikasyon uygulanırsa inorganik tuzların ortadan kalkmasıyla kemik demineralize olur ve yumuşar, ancak mikroskobik yapısını, şeklini ve sağlamlığını korur. Bunun yanı sıra histolojik teknik organik elemanların ortadan kaldırılmasına yönelik ise kemiğin sağlamlığı ve esnekliği bozulur ve kolay kırılır hale gelir. Başka bir anlatımla kemiğin organizmadaki gerekli işlevlerini tam olarak yerine getirebilmesi ancak dokudaki organik, inorganik elemanların ve matrisin uyumlu birlikteliğine bağlıdır. Kemiği çevreleyen periyosteum sıkı bağ dokusu yapısındadır. Kollajen fiberler, kemik dokusunu delerek periyosttan çıkar ve periyostla kemik arasındaki bağı sağlamlaştırırlar. Sağlayıcı kollajen fiberleri “Sharpey fiberleri” diye tanınırlar. Fibroblast türündeki periyosteum hücreleri bölünerek çoğalıp osteoblastlara dönüşebilirler. Yeniden oluşan bu osteoblastlar taze kemik yapımı ve onarımında önemli bir rol oynarlar. Endosteum periyosttan daha incedir. Periyosteum ve endosteum bağ dokuları aracılığıyla kemiğe gelen damar ve sinirler “Volkman kanalları” içinde kemik dokusunun derinliklerine inerler. Kemiğin ayrıntılı yapısı şekil 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2.2. Kemik dokusunun ayrıntılı yapısı

Kemik, kompakt (sıkı) ve spongiyöz (sünger) kemik dokusu olmak üzere iki farklı kemik dokusundan meydana gelmektedir. Bu iki farklı doku, bileşim olarak aynıdır fakat kompakt kemiğin yoğunluğu spongiyöz kemiğe oranla daha fazladır. Kompakt kemik dokuya ait gözeneklilik değeri %10 civarındadır. Spongiyöz kemik ise, gözenekliliği %50-90 arasında değişen bir yapıdadır ve buna bağlı olarak mekanik açıdan kompakt kemik dokusuna göre oldukça zayıftır. Kompakt kemik ve spongiyöz kemik dokusunun şematik görünümü Şekil 2.3'de verilmiştir.

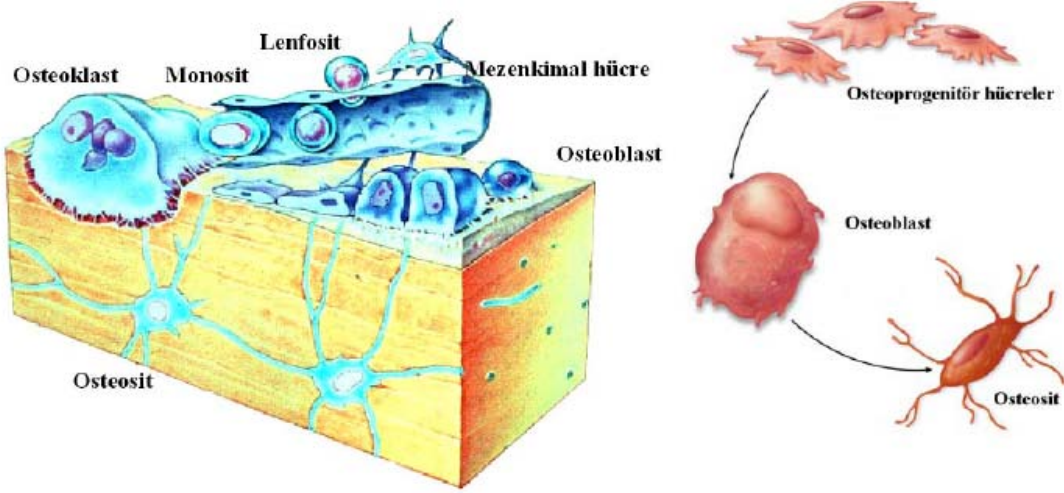


Şekil 2.3. Kompakt ve spongiyöz kemiğin şematik görünümü

Kemik dokusunda resorpsiyon (eski kemiğin yıkımı), kemik oluşumu, mineral homeostazi ve kemik iyileşmesi gibi farklı proseslerin gerçekleşmesinden farklı kemik hücreleri sorumludur. Bu hücreler işlevleri ve buldukları yerler açısından birbirinden ayrılmaktadır.

Kemik hücrelerinin %90'ından fazlasını laküna adı verilen kendilerine özel boşlukların içerisine yerleşmiş olan osteositler oluşturur. Gelişimlerini tamamlamış olduklarından sentez yapamazlar. Diğer kemik hücreleri ile etkileşerek kemik oluşumu, resorpsiyonu ve iyileşmesini koordine ederler. Kemikte bulunan farklılaşmamış mezenkimal hücreler, kemik hasarı gibi uyarıcı olaylar gerçekleştiğinde osteoblasta dönüşen kök hücrelerdir. Osteoblastlar, kemik dokuya ait organik matrisin sentezlenmesinden sorumlu, hücrelerarası maddedeki kollajen fiberleri ile amorf maddeyi yapıp salgılayan genç kemik hücreleridir. Kemik örtü hücreleri, kemik resorpsiyonundan sorumlu osteoklast hücrelerinin kemiğe kolay tutunmasını sağlamak için kemik yüzeyindeki ince tabakanın kaldırılmasından sorumludur (Buckwalter et al., 1995). Ayrıca çok çekirdekli dev kemik hücreleri olan osteoklastlar kemik dokusunun yenilenmesinde işlev görürler; kemik dokusunu eriterek ortadan kaldırabilme yeteneğine sahiptirler.

Osteositlerin uzantıları sert kemiğin içindeki özel kanalcıklarda yer alırlar ve karşılaştıkları kılcal damarlardan beslenirler. Bütün kemiklerin dışında bağ dokusu yapısındaki doğurucu periyosteum bulunur. İçlerinde eş yapıda olan ve kemik iliğini çevreleyen bölge olan endosteum yer alır. Osteositler, yassı oval biçimli hücrelerden olup uzantıları kemik kanalcıklarının içinde hafifçe büzülmüş olarak dururlar. Osteoblastlar, kemik dokusunun yüzeyine yakın olarak seriler oluştururlar ve uzantıları aracılığıyla birbirleri ile ilişkide bulunurlar. Araları, salgıladıkları hücrelerarası madde ile dolan osteoblastlar durağan evreye girerek osteositlere dönüşürler. Osteoklastlar, içlerinde çok sayıda çekirdek bulunan çok büyük ve hareketli hücrelerdir. Resorpsiyon sırasında kemik yüzeylerinde gözlenirler. Osteoklastların kemik dokusuna bakan yüzeylerine yakın bölgede kalsiyum kristalleri ile kollajen fiber kalıntıları bulunur. Şekil 2.4'te Kemik hücrelerinin ve farklılaşma yolları şematik olarak gösterilmiştir (Kierszenbaum, 2002).



Şekil 2.4. Kemik hücrelerinin ve farklılaşma yollarının şematik gösterimi

Gelişmekte olan ilk kemik dokusunda (primer kemik) kollajen fiberler düzensiz olarak yerleşirler. Amorf maddeye çöken mineraller azdır bu nedenle primer kemik doku kalıcı değildir. Sözü geçen primer kemik dokusu ortadan kaldırıldıktan sonra yerini ikinci olgun kemik dokusu (sekonder kemik) alır. Sekonder kemikte bulunan osteositler başlangıçta meydana gelen doku ile kıyaslandığında daha seyrek bulunurlar. Hücreler arası maddede yer alan kollajen fiberler özgün biçimli lamelleri oluştururlar. İç içe dairesel lamellerin yaptığı bir bütünün ortasında gevşek bağ dokusuyla içinde yer alan damar ve sinirlerin bulunduğu bir merkez kanalı bulunur. Bu yapı "Havers kanalı" olarak adlandırılır. Bir Havers kanalı ile çevresindeki lamellerden oluşan bütün yapıya "osteon" ya da "Havers sistemi" adı verilir. Lamellerin arasında kendine özgü lakünaların içinde osteositler yerleşirler. Tek tek lamellerin ve osteonların aralarını amorf madde doldurur. Periyosteum ile endosteumun altında çepeçevre birbirine paralel lameller birkaç sıra olarak dolanırlar, aralarında osteonlar bulunur. Her osteon kemiğin eksenine doğru uzanır. Ortadaki Havers kanalını sayıları 15-20 arasında değişebilen kollajen lameller çevrelerler. Osteonların ortalarındaki Havers kanalları dar açılı dallanmalarla Volkmann kanallarını oluşturur. Volkmann kanalları, periyosteum ve kemik iliğiyle ilişki kurarlar. Havers sisteminin enlemesine kesitinde bir lameli oluşturan kollajen fiberlerin yönü uzun eksene neredeyse koşut olarak seçilirken

ondan sonra gelen lameldeki fiberlerin oblik olarak yönlendikleri göze çarpar. Havers kanallarının genişliği çok değişebilir. Özellikle genç osteonların ortalarındaki kanalların çapları geniştir. Havers sistemleri kemiğin yıkılıp yapılması sürecinde ortadan kaldırılıp yeniden oluşturulurlar.

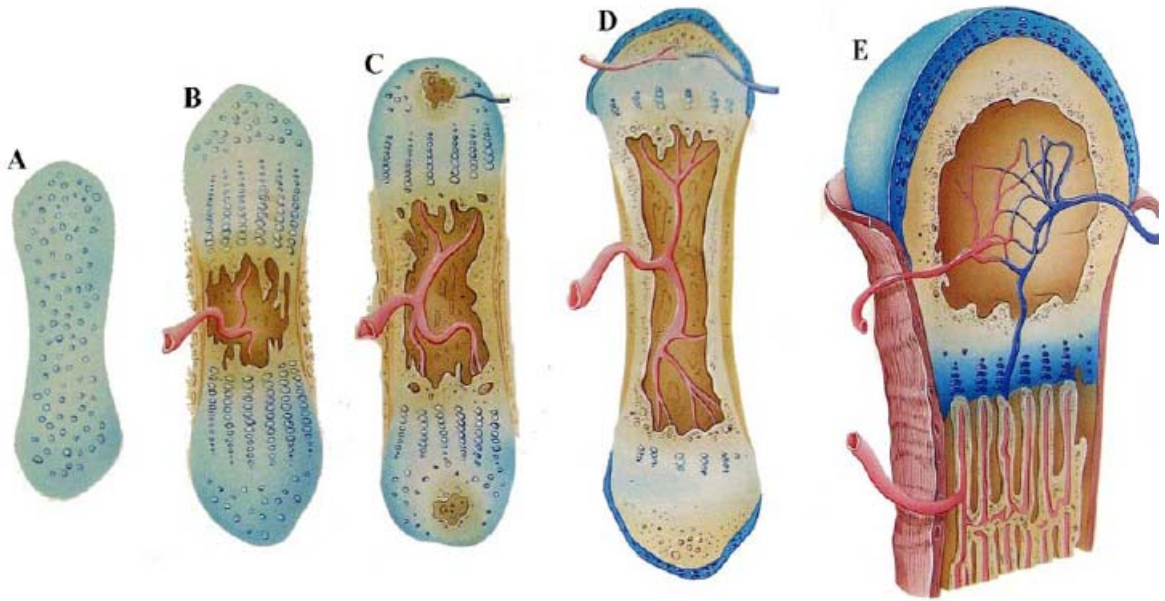
### **2.2.1.2. Kemik oluşumu ve resorpsiyonu**

Kemik dokusu, enkondral ve intramembranöz (mezenkimal) olmak üzere iki yoldan oluşur. Bunlardan intramembranöz kemikleşme bağ dokusu, enkondral kemikleşmeye ise kıkırdak dokunun katılımıyla oluşmaktadır. Kemikleşme hangi türde olursa olsun ilk oluşan kemik dokusu primer kemik yani olgunlaşmamış kemiktir. Oluşan bu primer kemik kalıcı olmayıp yerini esas yani olgun lamelli kemik dokuya bırakmaktadır.

#### **Endokondral kemikleşme**

Endokondral kemikleşmede, kemik hiyalin kıkırdak çatinın içerisinde gelişmektedir. Mezenkimal hücre organizasyonu ile ilk olarak kondrositler gelişir. Modelin diyafiz kıkırdağını örten perikondriyumun iç katında bulunan mezenkimal hücreler osteoprogenitör hücrelere, onlar da osteoblastlara farklılaşır. Osteoblastlar üst üste yerleşen kemik lamellerini oluşturur. Bu sayede yeni kemiğin periyosteumu ile kıkırdak dokusu arasında silindir biçimde bir kemik manşet ortaya çıkar. Çatinın merkez kesimine yerleşimli kondrositler aktif olarak bölünerek çoğalır. Kemik manşet, kondrositlerin beslenmesine engel olur. Oluşan iskemi, kondrositlerde önce hipertrofiye neden olmaktadır. Ardından diyafizin orta kısmından başlayarak tahrip olarak ölmelerine neden olur. Kıkırdak modelin ortasında birbiriyle devamlı boş kaviteler oluşur. Periyosteumdaki osteoklastlar kemik manşeti yer yer delerek foramen nutrisyumları açarlar. Periyosteumdaki kan damarları bu deliklerden girerek, osteoprogenitör ve hematopoetik hücreleri taşırlar. Damarlarla gelen kalsiyum ve fosfor iyonları, alkalen fosfataz aracılığıyla birleşerek kıkırdak matrisine çöker ve böylece diyafizde bir kemikleşme merkezi ortaya çıkar. Diyafizde şekillenen boşluklara kan damarları ile gelen mezenşim hücrelerinden farklılaşan osteoblastlar, kalsifiye kıkırdak matrisi üzerine tek sıra dizilerek kemik dokusu yapmaya başlarlar. Böylece ortaları kalsifiye kıkırdak, yüzeyleri ise kemik dokusundan meydana gelen kemik trabekülleri ortaya çıkar. Kemik trabekülleri ile

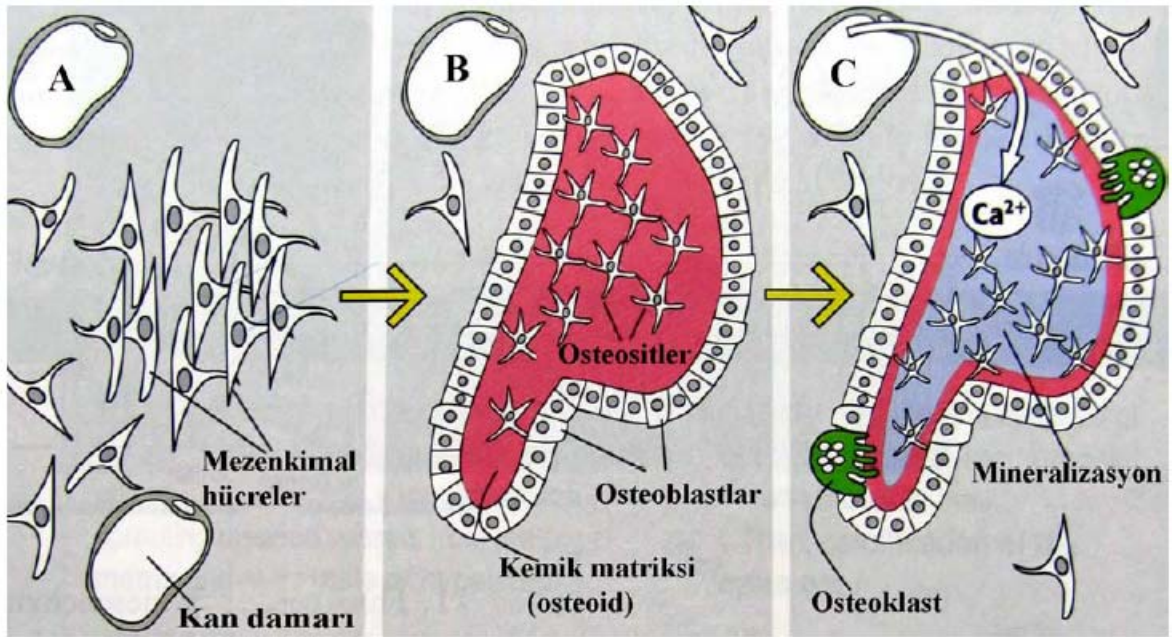
kan damarlarının aralarında kalan boşluklarda kemik iliği şekillenir. Bu arada kıkırdak modelin epifizleri ile diyafizi arasında kondrositler mitoz ile çoğalarak alt alta dizilen gruplar yaparlar. Bu sayede modelin boyu da devamlı olarak uzar. Kemik manşet kalınlaşıp, epifizlere doğru uzanır ve kondrositlerin bulunduğu bölgeyi dıştan sarar. Kemikleşme merkezinde olduğu gibi önce kıkırdak matris, ardından da ilk şekillenenlerin devamı halinde kemik trabekülleri oluşur (Fındıkçoğlu, 2006). Endokondral kemikleşme epifizlere yaklaşıncaya, epifizlerin içlerinde ikincil kemikleşme merkezleri belirir. Daha perifer yerleşimli kondrositler ise mitotik aktivite göstermeyen hipertrofik kondrositlerdir. Kondrositlerin bu sıralı dizilimi epifizyal büyüme plağı olarak adlandırılır. Epifizyal büyüme plağının distal kesiminde yer alan kondrositler kendilerini çevreleyen hücre dışı matrisi mineralize eder. Bu alanı çevreleyen ince mezenkimal hücre tabakasından (periost) köken alan hücreler (osteoblastlar), osteoklastlar ve kan damarları, epifizyal büyüme plağının distal kesimindeki mineralize matrisi işgal eder. Bu sayede kemikleşme tamamlanır. Aksiyel kemikler, kafa tabanı kemikleri, mandibulanın bir kısmı endokondral kemikleşir. Şekil 2.5.'te endokondral kemikleşme şematik olarak gösterilmiştir (Gartner ve James, 2000).



Şekil 2.5. Endokondral kemikleşme

## İntramembranöz kemikleşme

İntramembranöz kemikleşmede geçici kıkırdak çatı olmaksızın bir zarın içinde mezenkimal hücre organizasyonu ile kemik gelişimi gerçekleşir. Mezenkimal kemik oluşumu kafa kaidesinin lateral kesimlerinde mezenkimal hücrelerin yoğunlaşması ile başlar. Mezenkimal hücre organizasyonu ile osteojenik aktiviteye sahip hücreler orta hatta doğru ilerler. Bu mezenkimal hücrelerden köken alan osteoblastlar kemik matrisi sentezler. Bu matris içinde gömülen osteoblastlar farklılaşarak osteositlere dönüşür. Her iki taraftan ilerleyen kemik oluşumu orta hatta sütür hattını oluşturur. Eş zaman içinde gelişen birçok kemikleşme merkezlerinin bir araya gelip kaynaşmalarından süngerimsi görünüm ortaya çıkar. Arada kalan bağ dokusuna damarlar girerek dallanırlar. Bağ dokusu hücrelerinin mitozla bölünüp farklılaşmalarından yeni osteoblastlar ve hücreler arası madde kemik dokusuna eklenir. Kemikleşme merkezleri bu yolla genişler, birbirleriyle kaynaşarak kemiğin hiyalin kıkırdağından oluşan bir taslak ortaya çıkar. Organizmada kafatası, sternum, pelvis gibi yassı kemiklerde, yüz kemiklerinde, mandibulanın processus coronoideus ve simfisis dışındaki bölgelerinde, kısa ve uzun kemiklerin kompakt kısımlarında görülür. Şekil 2.6'da intramembranöz kemikleşme şematik olarak gösterilmiştir (Kierszenbaum, 2002).



Şekil 2.6. İntramembranöz kemikleşme

Yaşam boyunca kemik sürekli olarak yıkılır ve yeniden oluşturulur. Çocuklarda kalsiyum dönüşüm hızı yıllık %100 iken erişkinlerde bu oran yıllık %18'e düşer. Kemiğin tekrar biçimlenmesi genellikle, biçimlenmeye olanak sağlayan hücre grubunun küçük bölgelerde oluşturduğu yerel bir işlemdir. Önce, osteoklastlar kemiği yıkar ve sonrasında osteoblastlar yine aynı bölgede yeni kemik dokusunu meydana getirir. Bu süreç yaklaşık 100 gün sürer. Öte yandan şekil değişimi, yani bir bölgede yıkılan kemiğin şeklini değiştirerek başka bölüme eklemesi de olabilir. Osteoklastlar kortikal kemik içine bir tünel açıp bunları osteoblastlar izlerken, trabeküler kemikte yeniden yapılanma, trabeküllerin yüzeyinde gerçekleşir. Herhangi bir anda, insan iskeletinde bulunan 2 milyon şekillendirme birimleri tarafından, kemik kütlelerinin ortalama %5'i yeniden oluşmaktadır. Yenilenme hızı, kompakt kemiklerde yılda %4, trabeküler kemiklerde %20'dir. Kemiğin tekrar şekillenmesi, yer çekimi ve diğer etmenlerin iskelet üzerine yaptıkları baskı ve güç ile kısmen ilişkilidir ve sistematik dolaşımdaki hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından düzenlenir.

Yeni oluşan kemik yatağında kalsifikasyonu oluşturan işlemin ayrıntıları yapılan kapsamlı araştırmalara henüz tam olarak gün ışığına çıkartılamamıştır. Kalsifikasyonun birçok genin varlığında gerçekleştiği bilinmektedir ve deney hayvanları üzerinde yürütülen çalışmalarda sözü geçen genlerden herhangi birinin kullanılmaması durumunda, kıkırdak dokusunun oluşmasına rağmen kemik dokusunun oluşmadığı gözlenmiştir. Genel olarak osteoblastlar, fosfat esterlerini hidrolize eden bir alkalen fosfataz salgırlar. Hidroliz sonucu serbest kalan fosfat osteoblastların çevresindeki fosfat derişimini artırır ve kalsiyum fosfatın çökmesine neden olur (Bancroft ve Stevens, 1996).

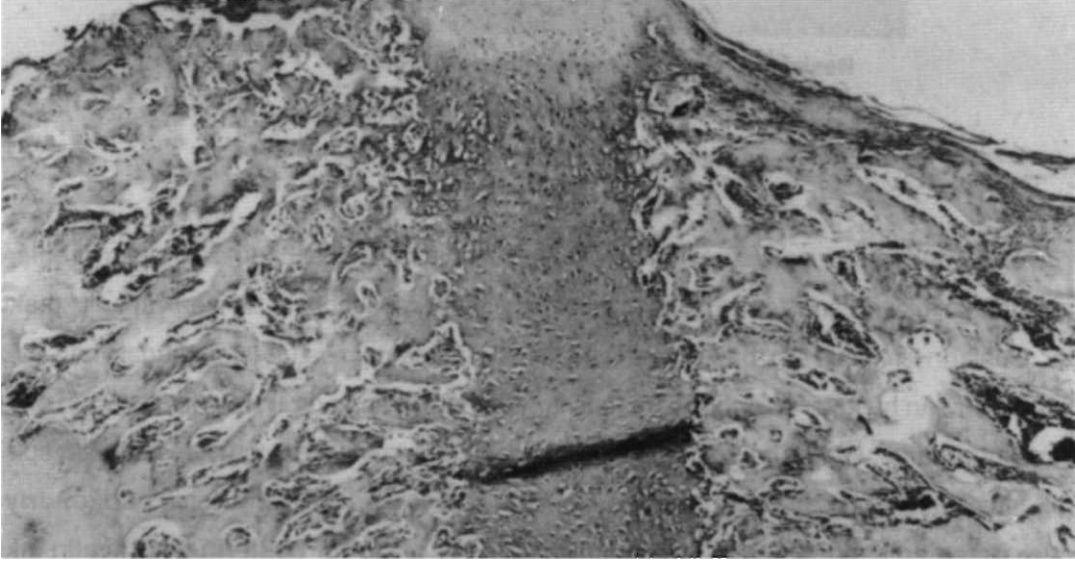
Kollajene ek olarak, çok sayıda kemik proteini yalıtılmış ve tanımlanmıştır. Kemiğin yapısal proteinleri (BMP'ler) kemik büyümesini uyarır ve bunların, vücutta sinir sistemi ve diğer birçok dokunun gelişmesinde de rol oynadığı bilinmektedir. Yatak Gla proteini (MGP) ve kemik Gla proteininin (BGP, osteokalsin) her ikisi de  $\gamma$ -karboksillenmiş glutamik asit kalıtı (Gla) içerir ve  $\gamma$ -karboksilasyon, K vitamini tarafından kataliz edilir. Gla kalıntıları  $Ca^{2+}$ 'ya bağlanır. Fakat K vitamini yetmezliği, sadece fetüste iskelet anormalliklerine neden olur. Osteoblastlarda iki ek protein,

osteonektin ve osteopontin sentezi yapılır. Kalsifikasyon başlayınca, osteokalsin ve osteopontin sentezi artar.

Kemik oluşumu ve yıkımının sonunda mineralize olmuş ve mekanik açıdan dayanıklı bir doku oluşur. İskelet yapısının mineralizasyonu kemik ve kıkırdağın hücre dışı matris özellikleriyle yakından ilişkilidir. ECM ağının ana bileşeni olarak kollajenler, mineralize ve bundan dolayı dayanıklı bir matrisin oluşturulmasında çok önemlidir. Kollajenler insan vücudunda en yaygın bulunan proteinlerdir ve tüm proteinlerin yaklaşık olarak % 30'unu oluştururlar. Farklı kollajen tipleri, bunların keşfedilme sırasına göre Roma rakamlarıyla gösterilmiştir. Bu farklı kollajen tipleri, bağ dokusunun çok çeşitli fizyolojik koşullara adapte olması için gereken yapısal birimleri sağlar (Gartner ve James, 2000).

### **2.2.1.3. Kemik dokusunun yenilenmesi**

Organizmada herhangi bir nedenle hasar gören dokular belirli bir oranda kendilerini yenileyebilmektedirler. Kemik dokusu onarım işini en iyi yapan dokuların başında gelmektedir. Kemiğin kırılması durumunda, kırık bölgesinde yeni bir kemik dokusu oluşarak bölge tamamen normal işlevini geri kazanmaktadır. Kırık meydana geldiğinde dokunun kan damarları da hasar gördüğünden kırık bölgesinde kanama oluşur ve o bölgede kan pıhtılaşır. Ortama gelen nötrofiller ve makrofajlar hasarlı dokuyu ortadan kaldırır. Bölgede fibroblastların ve damarların çoğaldığı gözlenir. Bu bölge daha sonra fibröz bir doku yapısı haline gelir ve kırık yeri kıkırdak dokuya dönüşür. Bu yeni dokuya kemik kallusu denir. Bu arada kırık bölgesindeki periyosteum ve endosteumun osteoblastları çoğalarak kırık bölgesine gelirler ve burada bir hücre katı oluştururlar. Daha sonra enkondral kemikleşme olduğu gibi primer kemik oluşmaktadır. Bölgede ayrıca intra-membranöz kemikleşme de olur. Onarım sırasında önce primer kemik dokusu gelişmektedir. Bu doku henüz olgunlaşmamış kemik dokusudur. Doku daha sonra yavaş yavaş ortadan kaybolurken yerini sekonder yani esas kemik dokuya bırakır. Böylece onarılmış kemik o bölgede tamamen normal şekline kavuşur ve fonksiyonlarını yerine getirir bir duruma gelir. Şekil 2.7'de kırık bölgesinde yeni oluşan doku gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Kırık bölgesinde yeni oluşan kırıkta dokusu

Kemik onarım ve yıkım süreçlerinin başlangıcında aktive olan hücreler, yeni oluşan kemik, defekt alanını çevreleyen dış yumuşak doku tabakası ve komşu kortikal kemik ve kemik iliği ile etkileşim içindedirler. Bu alanlarda çok çeşitli hücreler ve sinyal molekülleri yer alır ve bunlar onarılan dokunun özelliklerinden sorumludur. Periyosteum'un birincil hücre kaynağı olduğu düşünülmektedir (Nakahara, 1990). Periyosteum içerisindeki hücreler, dokunun işlevini yitirmesinden başlayarak çeşitli morfojenler üretirler (Bostrom, 1995). Bu sinyal moleküllerinin lokal olarak bazı iskelet sistemi hücrelerini farklılaşmaları için tetiklediği öngörülmektedir. Doku onarımında yer alan diğer hücrelerin ise komşu kortikal ve kanselöz kemikten geldiği açıktır. Kemik iliğinden ve/veya kas dokusundan geldiği düşünülen mezenkimal kök hücreler ise, yeni kemik oluşumunda yer alan hücreler için bir diğer kaynak olduğuna inanılmaktadır. Kemik onarımı, defekt alanının genişliğine bağlıdır. Literatürde tanımlanan kritik büyüklükteki defektler kendiliğinden iyileşirken, kritik defektler tamamen yeni kemik dokusuyla doldurulamamaktadır. Yeni kemik oluşumunda besin maddeleri de yine bir diğer önemli parametre olduğundan, difüzyon ve vaskülerizasyon bu aşamada belirleyici olan iki etmendir. Her ne kadar yeni onarılan dokudaki iskelet yapısı hücreleri için başlangıç morfojenik sinyallerin kaynağı ve tabiatı tamamen belirlenmemiş olsa da, birçok sinyal faktörü tanımlanmıştır. Kemik oluşum

mekanizmalarını başlatan ve sürdüren sinyallerin periyosteum ya da kemik iliğinden kaynaklandığı varsayılmaktadır.

Günümüzde enflamatuvar sitokinlerin, morfojenlerin, proteazların ve anjiyojenik faktörlerin onarım cevabına yönlendirilmeleri oldukça fazla araştırılmış olsa da bu moleküllerin kemik dokusunun yenilenmesindeki rolleri henüz tam olarak açıklanamamıştır. İnterlökinlerin altında, TGF- $\beta$  ailesinin üyeleri olan interferonlar ve tümör nekroz faktörü alfanın iskelet oluşumunda ve kemik onarımında büyük önemi olduğu varsayılmaktadır (Joyce, 1990; Rosier, 1998). Aralarında birkaç BMP ve GDF'nin olduğu dönüştürücü büyüme faktörü ailesinin bazı üyelerinin onarım olayının çeşitli aşamalarından sorumlu olduklarına ilişkin bulgular vardır (Cho, 2002).

Mikroskobik incelemelerde kanselöz kemik iyileşmesinde hızlı vaskülerizasyon dışında kortikal kemiklerden farklı bulgulara rastlanmamıştır. Yeni oluşan kemiğin, kemik greftinde yer alan ve buradan çoğalan osteoprogenitör hücrelerden ve kemik iliği stromasındaki perivasküler yapılardan geliştiği gösterilmiştir. Pek çok araştırmacı, nedenini tam olarak açıklayamamasalar da kanselöz kemik iyileşmesinin kortikal kemik iyileşmesinden daha hızlı gerçekleştiğini göstermişlerdir (Boyne, 1966; Craft et al., 1974).

Membranöz kemik iyileşmesinin kuvvetine yönelik literatürde çok fazla çalışma yoktur. Membranöz kemiklerde üç haftalık iyileşme süresi sonrasında makro ve mikro seviyelerde yeterli kuvveti sağlayacak kemik iyileşmesinin gelişeceğini gösteren çalışmalar olduğu gibi (Craft et al., 1974), bükme testlerinde membranöz kemiklerin eşdeğeri enkontral kemiklere oranla daha sağlam olduklarını gösteren çalışmalar da bilinmektedir (Boyne, 1966).

Daha büyük boylarda kemik defektlerinin onarılabilmesi için komşu dokularda daha fazla kan akışı talebi yaratır. Vasküler dokuların büyüyen kemik dokusu içerisine girmesi ve burada büyümesi yeni periosteal kemiğin oluşumuyla ilerler ve bundan dolayı vasküler bileşenlerle periosteal cevabın oluşumu ve yayılması arasındaki etkileşimin, özellikle büyük defektlerde yeni kemik oluşumunu iyileştiren birincil yürütücü mekanizma olduğuna ilişkin kanıtlar vardır (Aydın, 2008). Aynı şekilde kan damarı duvarlarında bulunan periovasküler mezenkimal kök

hücrelerin, defekt onarımının başlatılması ve sürdürülmesine katkıda buldukları öne sürülmüştür (Bouletreau, 2002). Yeni damar oluşumunun vasküler endotel büyüme faktörü bağımlı yol ve anjiyopietin bağımlı yol üzerinden düzenlendiği varsayılmaktadır. Her iki yolun da defekt onarımında rol oynadığı bilinmektedir. Defekt onarımı her ne kadar bu hücreler ve sinyallerin içinde bulunduğu mekanizmalara düzenleniyor olsa da, defekt boyu, doku biyomekaniği ve konağın durumu gibi pek çok faktörün de etkisi altındadır.

### **2.3. Kemik Greftleri**

Kazalar, travmalar, patolojik dejenerasyon, dokudaki konjenital bozukluk ya da tümörlerden kaynaklanan ve kemik dokusunun kendi yenileyemeyeceği defektlerin kapatılması için ortopedi ve travmatolojide uzun yıllardır kemik greftleri kullanılmaktadır. ABD'de 1972 yılında 100 bin vakada kemik grefti kullanılırken bu sayı 1991'de 250 bin vakaya ulaşmış, günümüzde artarak devam etmektedir.

Kemik greftleri, kist, tümör ya da başka bir hastalık sonucu oluşan boşlukları doldurmak, uzun kemiklerin büyük defektlerle sonuçlanan kırıklarında köprü vazifesi yaparak devamlılığı sağlamak, artrodez oluşturmak, kaynamanın olmaması ya da gecikmesi durumunda destek sağlamak gibi temel endikasyonlarda kullanılmaktadır. Başarılı bir greft uygulamasında, estetik kazanım ve fonksiyonel rekonstrüksiyon ancak yumuşak doku ve kemik çatının uyum içerisinde bir arada onarıldığında sağlanabilmektedir.<sup>39</sup> Kemik greft, matris substrat ile birlikte kemik ve kan hücreleri sağlamak sureti ile yeni kemik gelişimini destekleyen kansellöz kemiğe benzer tarzda fonksiyon görür. Kemik greftler alıcıda 3 tip stimülasyon gösterir. Bunla sırasıyla; osteogenesis, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyondur.

Osteogenesis, osteoprogenitör kök hücreler varlığında ya da buna bağlı hücrel osteoblastik aktivite aracılığıyla kemik oluşumunun sağladığı süreçtir. Osteojenik greftler direkt olarak yeni kemik oluşumunu sağlayabilme yeteneğindedir. Greftin alıcıda, canlı hücrelerle yeni kemik oluşumuna yol açması greftin osteojenik özelliğini gösterir. Otolog kemik iliği hücrelerinin ve taze otojen greftlerin osteojenik özelliği vardır. Otojen greftlerde osteositler ölerek lakünaların boşalmasına yol

açmasına rağmen, preosteoklastlar, preosteoblastlar ve osteoklastlar canlılığını sürdürür. Taze allogreftlerde ise hızlı antikor oluşumu hücrel immün cevabı takiben greftin hasarı izlenir.

Osteoindüksiyon, kemik oluşumu için yapı taşı olan hücre tiplerinin farklılaşması ve biyolojik olarak bir araya toplanması ile iyileşme yönünde düzenlemelerin sağlanması sürecidir. Osteoindüktif greftler, indifferansiye dokuyu kemik oluşum yönünde diferansiye eden faktörleri sağlar. Farklılaşmamış primitif mezenkimal hücrelerde osteoblastlara farklılaşmayı uyarılma yeteneği bir greftin osteoindüktif özelliğini belirtir. Kemik matriste kırık sonrası oluşan osteoklastik kemik resorpsiyonunu takiben kimyasal işlemlerle salınan indüktif faktörler bulunur. Bone morfojenik protein ve transforming growth faktör-beta iyi tanımlanan osteoindüktif faktörlerdir.

Osteokondüksiyon, uygun greftle sağlanan doku iskelesinin üç boyutlu yüzeyinde, kemik gelişiminin uygun bir şekilde sağlanması sürecidir. Alıcıda çatı oluşturarak çevresinde ve içerisinde kemik oluşumuna yardımcı olması, o greftin osteokondüktif özelliğini belirtir. Osteokondüksiyon, kansellöz kemikte bulunan hücreleri stimüle eden yapısal ve kimyasal çevreyi gerektirir. İdeal doku iskelesi kapsamlı bir stabilite sağlarken kemik oluşum hızı ile eşit orvea da değeri azılır. Otojen greftler, allogreftler, kemik matris, kollajen ve seramikler osteokondüktif greftlerdir. Osteokondüktif materyaller alıcıda içeri büyüme (ingrowth) projesini stimüle eder. Takiben neovaskülarizasyon ve osteojenik prekürsör hücrelerin infiltrasyonu ile boyubozunur matrisi olan osteokondüktif materyaller yeni kemik oluşumuna yardımcı olur. Fakat bu materyallerde osteojenik hücreler veya simülatör faktörler bulunmaz.

İlave olarak, başarılı kemik greft için materyal, nontoksik olmasının (kan dolaşımına kimyasalları geçirmeyen) ve kansellöz kemiğin özelliklerine benzer biyomekanik özellikler göstermesinin yanında kolay elde edilebilme özelliklerine de sahip olmalıdır. Omurga cerrahları günümüzde tek ya da kombine şekilde değişik materyaller kullanmaktadır.

Klinikte farklı kullanım amaçları için farklı kemik greftleri hazırlanmaktadır. Günümüzde kullanılan iki ana kemik grefti tipi otogreft ve allogreftlerdir. Bir

otogreft, hastanın kendi vücudundan alınan bir kemik kesiti iken bir allogreft kadavradan alınmaktadır. Bu şekilde greft alma yöntemi defekt alanının cerrahi kararlılığına sahip ve doğal osteojenik davranışta kalmasını sağlar. Bununla birlikte, her iki greft tipi de bazı kontrol edilemeyen faktörlerle sınırlıdır.

Taze otojen kemik grefti, osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri ile "altın standart" olarak adlandırılan en güvenilir greft materyalidir. Otojen kemik greftlerinin kullanılması sonucunda hastaların %25-30'unda artmış kan kaybı, uzamış operasyon süresi, greft alınan sahada morbidite de artış gibi komplikasyonlar görülebilir. Ayrıca otogreft, multisegment artrodez gereken durumlarda, daha önce greft alınmış hastalarda, çocuklarda ve yaşlılarda yeterli miktarda elde edilemeyebilir. Diğer sakıncalar arasında alım için sınırlı miktarda kemiğin bulunması ve greftin önceden tahmin edilemeyen resorpsiyon özellikleri yer almaktadır.

Allogreftler için bir sınırlama da greftin yabancı dokusuna karşı gelişen immünolojik cevaptır. Doku genellikle vücut tarafından reddedilir ve bir yangı reaksiyonu başlar. Allogreftler aynı zamanda bulaşıcı reaksiyon riski taşırlar. Her ne kadar eleme sürecinde hastalık taşıyıcı dokuların çoğu elemine edilse de, bu yöntem % 100 etkin bir yöntem değildir (Gadzag, 1995).

Kraniyofasiyal çatının onarımında iliyak krest, kostalar ve tibia otogreft donör sahası olarak kullanılabilirse de bu bölgenin rekonstrüksiyonunda kraniyal kemikler ilk tercih olmaktadır. Kraniyal kemik kaynaklı otogreftler, içerdikleri canlı osteoblast ve osteoklastlar sayesinde primer kemik iyileşmesine olanak sağlarken, eğimli yapıları sayesinde özellikle kraniyal yapılandırmada defekte kolaylıkla uyum sağlamaktadırlar. (Tessier, 1982; Jackson et. al., 1986). Kraniyal kemik kaynaklı otogreftlerin kraniyofasiyal bölge onarımlarında kullanıldığından resorpsiyon oranlarının diğer otogreftlere göre daha düşük olduğu düşünülmektedir. Hastalık bulaşma riskinin olmaması ve immünolojik reaksiyon riski bulundurmamaları gibi avantajlar otogreftlerin kullanımını çekici hale getirir de yarattıkları donör saha morbiditesi, ameliyat ve anestezi zamanının uzaması, kanama, enfeksiyon ve ek cerrahi skar oluşturulması gibi dezavantajları vardır.

### **2.3.1. Greft Tipleri**

#### **2.3.1.1. Otogreftler**

Taze otojen kemik grefti, diğer greft tipleri ile karşılaştırıldığında en ideal olan ve spinal füzyon operasyonlarında güvenle kullanılan kemik greft materyalidir. Otogreft, osteojenik kemik ve kemik iliği hücreleri, osteokondüktif kartilaj matrisi, mineralleri matris proteinleri ve matrisle birlikte yer alan osteokondüktif proteinleri taşıma potansiyeline sahiptir.

Otojen greftlerin osteojenik ve osteokondüktif özellikleri mevcuttur. Bu özellikleri; içerdği canlı hücelere, kemik matris proteinlerine, kemik minerallerine ve kollajene bağlıdır. Otojen kortikal kemik grefti mekanik olarak kansellöz kemiğe oranla daha güçlüdür. Bunun dışında üstünlüğü yoktur. Kansellöz kemik, içinde barındırdığı kemik iliği hücreleri sayesinde osteojenik potansiyele sahiptir. Kansellöz kemik greftinin trabeküler yapısı, alıcı kemik ile yer değiştirme süresinin daha hızlı olmasına neden olur. Yeni oluşan damarların, kansellöz kemik içinde difüzyonu daha kolay olur. İnkorporasyon için birim hacimde daha geniş yüzey sağlar.

Otogreft uygulamalarında, alıcının greft reddetmesi ve hastalık taşıma riski söz konusu değildir. Otojen greftlerin üstün özelliklerine rağmen kan kaybı, transfüzyon riski Pelvik instabilite, Donör sahada ağrı, Heterotopik ossifikasyon, İliak herni, Sepsis, İliyak kırık, Deformite, Cerrahi süresinin uzaması gibi komplikasyonlar rapor edilmiştir.

Ayrıca, daha önce otogreft alınan hastalardan, uzun-multisegment füzyon gereken vakalardan, çocuk ve osteoporozlu kişilerden otogreft yeterli miktarda elde edilemeyebilir.

Korpus dokusunun kan ihtiyacının kesilmesi hücre ölümü ile sonuçlanır. Donör stokunun kalitesi; devamlı ve değişmez değildir, hastanın yaşı, cinsiyeti, sağlığı ve genetik dispozisyonu gibi bir takım faktörlere bağlıdır. Bu nedenle otogreft inkorporasyonu her zaman başarılabilir. Bu durum başka alternatifleri ortaya çıkarır. Her ne kadar bazı spinal füzyon prosedürleri yüksek füzyon oranları ile sonuçlansa da; dorsolateral lomber füzyon gibi birkaç yaygın kullanılan prosedür

sırasında başarısızlıklar da bildirilmiştir. Altın standart olarak düşünülse de otojen kemik grefti; her zaman ideal biyolojik performansını ortaya koyamamıştır. Greft alınan sahada yer alan birkaç sinirde (siyatik sinir, lateral femoral kutanöz sinir ve kluneal sinir) yakın diseksiyon sonucu nörolojik travma meydana gelebilir. Superior gluteal damarlara vasküler travma, siyatik çentiğe oldukça yakın diseksiyondan kaynaklanır. Vakaların %25 kadarında görülen donör yerinde kronik ağrının sebebi, sakroiliak eklem ihlalinden ve sakroiliak eklemden kemik çıkarılmasından kaynaklanabilir. Hu, omurga füzyonu sonrası iliyak kemikte greft temin edilen yerde kırık gelişen 14 hastalık bir seri bildirmiştir. Bu hastaların büyük çoğunluğu kronik medikal tedavi gören yaşlı kadınlardır. Bu nedenle, otörler bu iyatrojenik kırıkların oluşma potansiyelini minimale indirmek için bu grup hastalarda iliak kemik greft elde edilmesi sırasında dikkatli olmayı tavsiye etmektedir. Daha sonraki kadavra çalışmalarının temelinde otörler anterosuperior iliak kıyısı ve greft elde edilme yeri arasındaki uzaklığın en az 3 cm ve dorsal ileumdan uzaklığın minimum 3 cm olmasını tavsiye etmektedir.

Cerrahi komplikasyon riski teorik olarak minimuma indirilmiş olmasına rağmen bir takım konular değişmeden kalmıştır. Bunlar cerrahi sürenin uzaması ve kan kaybı, donör yeri kemik yapının geçici olarak bozulması, vasküler yaralanmalar ve kozmetik defektlerdir (Özgürbüz, 2006).

### **2.3.1.2. Allogreftler**

Mc Ewen'in 1881 yılında ilk allogreft uygulamasını takiben bu yüzyılın başlarında Lexer'de, tüm diz ekleminde osteokondral allogreft ile rekonstrüksiyon yapmıştır. 1940'lı ve 50'li yıllarda kemik depolama yöntemleri ve bu yöntemle elde edilen allogreftlerin kullanımı giderek artmıştır. Osteokondral allogreftlerin saklanması ve kullanılması ile ilgili bulguların kemik allogreftlerine uygulanması ile kemik allogreftlerinin ortopedik cerrahide kullanım alanı giderek artmıştır. Kemik allogreftlerinin primer kullanım alanı iskelet sisteminin konjenital, travmatik, neoplastik ve dejeneratif hastalıklarıdır. Spinal cerrahide allogreftlerin asıl kullanım alanı spinal deformitler ve dejeneratif hastalıklarda spinal füzyon oluşturmaktır. Travmatik, tümöral veya enfektif spinal lezyonların greftlenmesi hakkında çok az çalışma mevcuttur.

Taze allojen kemik greftleri immün cevap oluşturmaları nedeni ile kullanılmazlar. Allogreftlerin immunojenitesini azaltmak ve saklamak için dondurma (freezing), dondurup kurutma (freeze-drying) işlemleri uygundur. Allojen kemik greftleri canlı veya kadavra donörlerden donör seçim kriterlerine titizlikle uyularak alınır. Kadavralardan kemik en geç 24 saat içerisinde alınmalıdır. Gerekli kültür örnekleri alınmalıdır. Donör kemik steril şartlarda alınmalıdır veya sekonder olarak gaz etilen oksit ile veya gama ışınları ile sterilize edilmelidir. Greft çeşitli şekil ve boyutlarda alınır. Kemik tüm immünojeniteyi azaltmak için yumuşak dokulardan arındırılmalıdır. -70 ° C de allogrefti dondurmak immünojeniteyi azaltır ve malzemenin steril kalmasını sağlar. Etilen oksidin uzaklaştırılmasından sonra allogreft dondurup kurutma yöntemi ile saklanır. -70° C de dondurma ve kurutma yöntemleri immünojeniteyi azaltır; ama kemiğin mekanik kuvvetini de olumsuz etkiler. -70° C'de dondurma işlemi greftin tensil ve kompressif kuvveti %10 azaltır. Alıcı tarafından greftin tekrar kazanımı esnasında greftte geçici olarak %50 kuvvet kaybı olur. Otoklavda 62° C'nin üzerinde grefti ısıtmak veya gama ışınlama greftin fiziksel ve kimyasal özelliklerini bozar, mekanik özelliklerini değiştirir. Dondurulmuş, dondurulup kurutulmuş greftlerde inkorporasyon taze otojen greftlere ve sentetik greftlere göre daha yavaş olur.

Donmuş veya dondurulup kurutulmuş kemik pek çok alloantijen içerir. Hücre içi ve hücre dışı enzimlerle greft indüktif faktörleri otolize uğrarlar. Urist, bu faktörleri korumak için kimyasal sterilizasyonla bu faktörleri içeren "autolyzed antijen extracted allogeneic" (A.A.A) kemik grefti elde etmeyi başarmıştır. Allogreftler spongiyöz kemik ve kemik iliğinden zengin vertebra cisimlerine uygulandığında daha yavaş olmasına rağmen füzyon insidansı otojen greftlerle yaklaşık aynıdır. Porterio spinal füzyon hakkında güvenilir klinik sonuçlar henüz yoktur. Allogreftler başlangıçta sadece otogreft kullanımının imkansız olduğu masif greftlemeler için kullanılmasına rağmen, 1980'li yıllarda ABD'de kullanılan tüm kemik greftlerinin %34'ünü allogreftler oluşturmuştur. Allogreft en sık kullanılan otogreft benzeri materyaldir.

Allogreft popülaritesinde artışa 3 faktör yol açmıştır. Birincisi, Ulusal Organ Transplant Hareketi (The National Organ Act) ayrıntılı bir şekilde allogreft elde edilebilmesini kolaylaştırdı. İkincisi, donörün seçiminde ve dokuların gördüğü

işlemlerde titizlik, bağışlanan dokularda kalite ve güveni sağlamıştır. Üçüncüsü, yeni allogreft formların yapılması büyük ölçüde kapsamlı olarak allogreft kullanımı ve çok yönlülüğü sağlamıştır. Muhtemelen allogreftin en büyük avantajı spesifik uygulamalar için ısmarlanabilen değişik fiziksel formlarda geniş bir şekilde kullanılabilmesindedir. Yapısal allogreftin şeklini takoz, kama veya yivli kemik çiviler gibi formlarla işleyen makine aracılığıyla allogreftin hem kemik greft hem de fiksasyon cihazı olarak görev yapması sağlanabilir.

Allogreftler otogreftlerle aynı sonuçları ortaya koymamaktadır. Allogreftlerin kemik niteliği, hastalık taşınması ve immünojenik reaksiyonları uyarması sebebiyle oldukça büyük değişime uğrayabilir. Bu allogreftlerin işlenmesindeki sınırlamalar, hastalık geçişinin ve immünolojik reaksiyonun olmadığını garanti etmez ancak bu işlemler bu doğrultuda ortaya çıkan riskleri minimize eder. Allogreftin minimal işlem görmesi (taze bir şekilde alınmış kemiğin dondurulması) HIV gibi AIDS virüsünü inaktive etmesi için yeterli olmadığı bir takım araçlarla rapor edilmiştir. Bu işlemler greftin canlılığının kaybolmasına, yeni katılan kemik hücrelerde kullanılacak proteinleri tahrip ederek kemiğin osteoindüksiyon potansiyelinin azalmasına ve yeni kemik oluşumunun engellenmesine yol açar. İşlenmiş allogreftler otogreftlere oranla insan dokusunu daha az temsil ettiği için, allogreftler alıcı tarafından kolaylıkla kabul edilmez ve birleşmez. Allogreftler daha yavaş resorbe olur ve tam olarak otogreftlerde olduğu gibi yeni kemiğin yerine kullanılmaz. Donörler arasındaki farklılıklar greft için değişken, standart olmayan bir özellik yaratır. Kemiğin özelliği ve niteliği donör yaşı ve cinsiyetle değişir hatta tek donörde farklı anatomik yerlerden alınan benzer hacimdeki kemikler arasında %20 kadar dayanıklılık farkı ortaya çıkabilir.

Özet olarak; yukarıda belirtildiği gibi allogreftler kullanıma aşamasına gelinceye kadar bir takım işlemlerden geçmektedir. Bu işlemler hem maliyeti artırır, hem mekanik hem de biyolojik olarak greftin fonksiyonunu azaltır. Ayrıca allogreft risklerini de ortadan kaldırmaz (Özgürbüz, 2006).

### **2.3.1.3. Zenogreftler**

Zenogreftlerde kemik doku hayvanlardan elde edilir. Ortopedik cerrahide geniş kullanım alanı bulmuş greft materyalleridir. Değişik türler arasında yapılan bir

transplantasyon olduğu için, alıcıda ciddi immün yanıt oluşmasına neden olur. Bu yüzden kullanıma hazırlanırken antijen itelerinin elimine edilmesi gerekir. Taze alınan greftler su ile yıkandıktan sonra hidrojen peroksit ile oksitlendirilirler, protein yapının bir kısmı bu işlem ile kaybolur. Yağ çözücüler ile delipidize edilir, aseton ile kurutulur. Daha sonra gama ışınları ile sterilize edilir. Sonuçta elde edilen ürün strüktürel olarak güçlü, antijenik olarak zayıftır. Deproteinize edici proses indüktif faktörleri de yok ettiği için elde edilen materyal osteokondüktif etki gösterir. Salama ve Weissmann otojen kemik iliği eklenmiş zenogreft ile mükemmel sonuç elde etmişlerdir.

Hastalık taşıma riskinin kabul edilemez olması nedeniyle, greftin hazırlanmasında geçmişte sık kullanılan freezing ve freze-drying işlemleri daha az yaygındır. Kimyasal yıkamalar daha etkili olmuştur ancak bu işlemler osteoindüktiviteyi azaltmakta veya ortadan kaldırmaktadır.

#### **2.3.1.4. Kemik greftlerinin dezavantajları**

Enfekte alanlar greft için uygun değildir. İmplantlar böyle alanlara yerleştirilmemelidir. Kemik, kemik iliği ve implant arasında iyi bir temas sağlanması, greft materyalinin fonksiyonu ve kemik yenilenmesi için önemlidir. Dolayısıyla çevre kemik ile olan ara yüzeyin en yüksek seviyede olmasına dikkat edilmelidir. İmplantın vasküler sirkülasyonu, skar dokusu gibi fiziksel bariyerler ile engellenmemelidir. Kemik greft materyallerinin kullanımı ile ilişkin bütün kontraendikasyonlar göz önünde bulundurulmalıdır. Bunlar; kemiğin ve çevresindeki dokuların iyileşmesini olumsuz yönde etkileyecek bütün durumları içermektedir. Ayrıca, implant bölgesinde vasküler akış olamaması, pıhtılaşma hastalıkları, kronik yüksek doz steroid tedavisi, antikoagulan tedavi, metabolik hastalık veya kontrol edilmemiş diabet hastalığı gibi birçok dezavantajı da bulunmaktadır.

Günümüzdeki tedavi yöntemleri ve malzemelerinin dezavantajlarından dolayı araştırmacılar çalışmalarını mevcut kemik greftlerinin yerini tutacak biyomalzemeler üzerine yoğunlaştırmışlardır. Bu aşamada kemik doku mühendisliği yaklaşımıyla hazırlanan biyomalzemeler devreye girmektedir.

## **2.4. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler**

Biyomalzemeler, insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla canlı sistemle vücut içinde (*in vivo*) ya da dışında (*in vitro*) belli sürelerle temas eden malzeme ve/veya cihazlarda yer alan tüm materyallere verilen addır (Langer ve Wise, 1984, Scycher, 1991, Brozino, 1995). Bir biyomalzemede aranan en önemli özellikler biyoyumlu olması, toksik olmaması, biyobozunur ise biyobozunma ürünlerinin toksik etkiler göstermemesi, gerekli fiziksel ve fonksiyonel özelliklere sahip olması (mekanik dayanım, geçirgenlik, yoğunluk, elektriksel ve termal özellikler v.b.). Biyomalzemeler polimerik, metalik, seramik ve kompozit malzemeler olmak üzere 4 ana başlık altında toplanabilir. Ancak doku mühendisliğinde kullanılan başlıca biyomalzemeler “biyobozunur polimerik malzemeler” olduğundan biyobozunur özellik taşıyan malzemeler daha detaylı olarak ele alınacaktır.

### **2.4.1 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Polimerik Biyomalzemeler**

Doku mühendisliğinde doku iskelesi üretim için kullanılan biyomalzemeler geniş kapsamda doğal ve sentetik olarak ikiye ayrılır (Griffith, 2002). Doku mühendisliğinde kullanılan birçok malzeme suture, hemostatik ajan ve yara/yanık örtü materyali gibi cerrahi uygulamalardan adapte edilmiştir (Bacon, 2002; Lee ve Ansell, 2003). Bu materyaller arasında, alifatik poliesterler (poliglikolik asit, polilaktik asit ve bunların kopolimerleri) (Chen et al., 2001; Lu et al., 2000; Miko et al., 1994; Yang et al., 2004), hidroksiapatit (HA) (Kikuchi et al., 2004; Rodrigues et al., 2003; Zhang ve Ma, 1999a) ve kollajen ve kitin gibi doğal kaynaklı materyaller (Chen et al., 2001; Chung et al., 2002; Sachols et al., 2003a; Sachols et al., 2003b; Shen et al., 2000; Sukhodub et al., 2004; Yang et al., 2004) sıralanabilir. Ancak, sentetik biyopolimerlerin doğal malzemelere karşı üstünlükleri mevcuttur. Daha geniş özelliklere tolere edilebilmeleri ve daha kolay işlenebilir olmaları dolayısıyla Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (“Food and Drug Administration”, FDA) tarafından onaylanmış biyobozunur sentetik polimerler günümüzde birçok araştırmaya konu olmuştur.

#### **2.4.1.1. Sentetik biyopolimerler**

En çok kullanılan sentetik biyobozunur polimerler, polilaktik asit (PLA), poliglikolik

asit (PGA), polianhidritler, polifumaratlar (PF), poliortoesterler, polikaprolakton ve polikarbonatlar olarak sıralanabilir (Vail et al., 1999).

Doymuş alifatik poliesterler doku mühendisliğinde üç boyutlu doku iskeleleri için en sık kullanılan biyobozunur sentetik polimerlerdir. Bu grup içerisinde poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA) ve bunların kopolimeri poli(laktik-ko-glikolit) (PLGA) yer almaktadır. PDLLA ortopedik biyomedikal malzemeler konulu araştırmalarda incelenmektedir, Mükemmel hücre içi uyumluluğu nedeniyle osteokondüktif özellik taşımaktadır. Düşük molekül ağırlıklı PDLLA gelişim faktörü, antibiyotik veya thrombin inhibitör uygulamalarında ilaçlarla birleştirilerek ilaç salım sistemlerinde ve doku iskelesi üretiminde kullanılmaktadır.

Özellikle elektro-eğirme ile üretilen PLGA nanofiberlerinden elde edilen doku iskeleleri mekanik olarak çok güçlü bir yapı oluşturmuştur. Doku iskelesi boyunca yer alan nanofiberler hücre yapışmasını ve yeni ECM oluşumunu güçlendirmiştir. PLGA ve PLA-PEG blok ko-polimerinden elde edilen örgüsüz, nano fiberlere sahip doku iskelelerine plasmid DNA başarılı şekilde tutturulmuş ve doku mühendisliği için gen transferi uygulamalarında kullanılmıştır (Luu et al., 2003).

Diğer önemli sentetik biyobozunur polimerler, poli(orto esterler) ve polianhidritlerdir. Sözü geçen bu polimerler, biyouyumluluk ve çok iyi tanımlanmış biyobozunma özelliklerine sahiptirler (Muggli et al., 1999). İlk olarak kontrollü ilaç salım sistemleri için tasarlanmışlardır (Burkoth et al., 2000; Hanes et al., 1998; Ibim et al., 1998), ancak daha sonra doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmışlardır. Gözenekli poli(anhidrit-ko-imid) mikrokürelerinin biyobozunması üzerine yapılan bir çalışmada anhidrit bağlarının kopmasının çok hızlı (5 gün) gerçekleştiği gösterilmiştir (Hanes et al., 1998). Ibim ve arkadaşları (1998), poli(anhidrit-ko-imid)'in biyouyumluluğunun PLGA'ye eşit olduğunu ve kortikal kemik yenilenmesini desteklediğini göstermişlerdir.

Poli(propilen fumarat) (PPF) yapısında serbest radikal başlatıcılar varlığında çapraz bağlanmaya uygun çok sayıda doymamış çift içeren lineer bir poliesterdir ve ester bağlarının hidrolizi ile kolayca bozunabilmektedir (Hedberg et al., 2005; Peter et al., 1998). PPF'nin bozunum ürünleri (propilen glikol veya fumarik asit) biyouyumlu olduğundan vücuttan kolaylıkla uzaklaştırılmaktadır. Çeşitli moleküler

ağırlıklarında PPF kullanılarak polimerin bozunma zamanı ve mekaniksel özellikleri değiştirilebilir (Peter et al, 2000). PPF'nin diğer birçok biyobozunur sentetik polimerlere karşı en büyük üstünlüğü, defekt alanına direkt olarak uygulanmaya ve *in situ* çapraz bağlanmaya uygun enjekte edilebilir bir sistem olmasıdır. PPF tek başına osteokondüktif etki göstermezken çapraz bağlı PPF biyouyumlu ve osteokondüktiftir. Bu sebeple  $\beta$ -trikalsiyum fosfat ( $\beta$ -TCP), osteojenik peptidler ya da proteinler gibi osteokondüktif bileşenlerle birlikte kullanılır (Hedberg et al., 2005; Peter et al., 1998).

Eriyik halde işlenebilir özellikte olan polihidroksialkanatlar (PHA) alifatik polyesterlerdir ve mikroorganizmalar tarafından üretilirler. Geçtiğimiz yıllarda doku mühendisliği çalışmaları için poli(3-hidroksibutirat) (PHB), 3-hidroksibutirat ve 3-hidroksivalerat'ın kopolimerleri (PHBV), poli(3-hidroksibutirat) (P4HB) polimerlerinin uygun özellikte oldukları kanıtlanmıştır.

### **Poli( $\epsilon$ -kaprolakton)**

Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL), alifatik poliester grubu biyobozunur sentetik bir polimerdir. PCL'in erime sıcaklığı,  $T_m$ , kristalin yapısına bağlı olarak, 59-64 °C aralığında, Camsı geçiş sıcaklığı,  $T_g$ , -60 °C civarında (Sinha et al., 2004) ve bozunma sıcaklığı 350°C'dir (Engelberg ve Kohn, 1991). PCL ile ilgili tamamlanan çalışmalardan, özellikle sert ve yumuşak doku için oldukça biyouyumlu olduğu ve doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi üretim malzemesi olarak kullanıldığı bilinmektedir. Düşük camsı geçiş sıcaklığına sahip olduğu için oda sıcaklığında her zaman kauçuğumsu haldedir. Toksik özellikleri çok düşüktür ve birçok terapötik ilaç yüksek geçirgenlik sergiler. PLA ve PGA ile benzer biyouyumluluk özelliği göstermekte ancak çok daha yavaş bozunmaktadır (Lowry et al., 1997). Yüksek ilaç geçirgenliği ve yavaş bozunma davranışı, doku mühendisliğinde kullanım alanını kısıtlaya da uzun süreli ilaç salım sistemlerinde taşıyıcı olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Genel olarak biyoseramik ve benzeri malzemelerle birleştirilmekte, bu sayede mekanik özellikleri artırılmakta ve bozunma hızı istenilen şekilde ayarlanmaktadır. Alifatik bir poliester olan PCL, kemik doku mühendisliği çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılan ve araştırılan sentetik bir polimerdir. Ayrıca,  $\epsilon$ -kaprolakton çok sayıda farklı monomerle (etilen oksit, stiren, metil metakrilat, vinil asetat vb.) kopolimerleştirilebilmektedir. Bunun

yanı sıra, PCL birçok farklı polimerle uyumlu karışım oluşturma eğilimindedir. Bu özellikleri sayesinde PCL, doku mühendisliği çalışmalarında hem tek başına, hem de diğer polimerlerle birlikte kullanılmaktadır (Guarino et al., 2008). PCL, tetrahidrofuran (THF), kloroform, toluen, diklorometan ve benzen gibi birçok çözücü içinde çözünebilmekte, dimetilformamid, etil asetat aseton ve asetonitril gibi çözücüler içinde oldukça düşük çözünürlüğe sahip olan bu polimer alkol, petrol eteri ve dietil eter içinde çözünmemektedir (Sinha et al., 2004). Biyobozunur bir polimer olan PCL'in bu özelliği ilk defa 1973'te keşfedilmiştir (Gross ve Kalra, 2002). Fizyolojik koşullar altında (insan vücudu gibi) yapısındaki ester bağlarının hidrolizi ile bozulan PCL, hidrofobik yapısına ve yüksek kristalinitesine bağlı olarak, PGA ve diğer polimerlere göre daha yavaş bozunmaya uğradığı, dolayısıyla fiziksel özelliklerini daha uzun süre koruyabildiği için özellikle implantların yapımında ve en az 6 aylık, uzun süreli ilaç salım sistemlerinde sıkça tercih edilmektedir (Kweon et al., 2003; Agrawal ve Ray, 2001). PCL'in yığın bozunması 2 fazda incelenebilmektedir: (1) zincir kopmasına bağlı olarak Mn'da 5000'e varan azalma, (2) ağırlık kaybının başlaması. PCL'in su içeren ortamlardaki bozunması otokatalitiktir, çünkü bozunma sırasında serbest kalan karboksilik asit uç grupları, hidrolizi katalizleyerek yeni ester gruplarının yıkımını sağlamaktadır. Bozunmada ilk basamakta ağırlık kaybı gözlemlenmemekte, ikinci basamakta ise yığın polimerik yapıdan difüzyon ile uzaklaşabilecek kadar küçük zincirler kopmaya başlamaktadır (Pitt et al., 1981). Bozunma polimerin amorf bölgelerinden gerçekleştiği için, artan kristalinite ile bozunma hızı ters orantılıdır (Sinha et al., 2004). PCL'in vücut içindeki bozunması sonrasında açığa çıkan bozunma ürünleri ise trikarboksilik asit çevrimi veya renal sekresyon ile metabolize edilmektedir (Kweon et al., 2003).

Kapsamlı bir şekilde yürütülmüş olan in vitro ve in vivo çalışmalar sonucunda, PCL birçok medikal ve ilaç salım cihazı için FDA tarafından onaylanmıştır. PCL, yumuşak ve sert doku uyumluluğundan dolayı dikiş ipliği, yapışma bariyeri, ilaç salım cihazı, kemik ve deri yaması olarak kullanılmaktadır.

#### **2.4.1.2. Doğal biyopolimerler**

Doğal biyobozunur polimerler doğal malzeme bazlı polimerler olup; polisakkaritler (nişasta, alginat, kitin/kitosan, hiyaluronik asit ve türevleri) veya proteinler (soya,

kollojen, fibrin jeller ve ipek) ve destekleyici olarak kullanılan lignoselülozik doğal fiberler gibi biyofiberler olmak üzere sıralanabilir Lee et al., 2005).

Kollajen fibröz bir proteindir ve doğal hücre dışı matrisin temel bileşenlerinden biridir. Memelilerde en çok bulunan proteindir ve deri, kemik, tendon, kıkırdak, kan damarı ve kalp kapakçıklarının temel yapı elementidir (Kose et al., 2005; Lee et al., 2000; Taylor et al., 2006). Moleküler ve kimyasal yapıları birbirlerinden farklı 25 tip kollajen tanımlanmıştır. Bunların arasında tip I kollajen, in vitro osteoblastik farklılaşma ve in vivo osteogenezis için uygun bir çevre oluşturmaktadır. Doğal bir polimer olarak, tip I kollajen, özellikle deri gibi yumuşak dokuların tedavisi ve benzeri doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmıştır (Köse et al., 2005). Sentetik polimerlerle karşılaştırıldığında; kollajen, hücre yapışmasına olanak sağlayacak çok daha saf bir yüzeye ve yararlı biyolojik özelliklere sahiptir. Bu sebepten dolayı, kollajenin kendisi ve/veya bir kompozitin bileşeni olarak doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Kikuchi et al., 2004; Ma et al., 2004; Rodrigues et al., 2003; Rothamel et al., 2005). Ancak, biyomedikal cihazlara uygulandığında gösterdiği antijenik ve immünojenik reaksiyon (Lynn et al., 2004), düşük işlenebilirlik, potansiyel patojen buluşturması, mekanik özelliklerinin zayıflığı ve biyobozunma kontrolünün zorluğu gibi nedenlerden dolayı kollajenin kullanımı ile ilgili soru işaretleri bulunmaktadır (Ma et al., 2004). Kollajenin çapraz bağlanması ve diğer biyomateryallerle hazırlanan hibrit yapılarla bu sorunların üstesinden gelinmeye çalışılmaktadır. Ma ve arkadaşları, kollajen molekülleri arasında bir köprü vazifesi görecek, suda çözünen çapraz bağlayıcı ajanlar olan karbodiimid, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimide (EDAC) ve N-hidroksisuccinimid (NHS) amino asit (glutamik asit ve lizin) varlığında kullanmışlardır. In vitro yapılan çalışmada, kollajenin biyobozunma derecesinin lizin eklendiğinde belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Diğer biyopolimer ve biyoseramiklerle hazırlanan kollajen bazlı kompozitler, hibrit biyomalzemeler ve kollajene göre özellikle mekanik güç ve hücre tutunması bakımından avantaj sağlamaktadırlar (Chang ve Tanaka 2002; Chen et al., 2001; Kikuchi et al., 2004; Rodrigues et al., 2003; Sukhodub et al., 2004).

Kitinin deasetilasyonu ile elde edilen, glukosamin ve N-asetilglukosamin içeren kitosan diğer önemli doğal biyopolimerdir (Chung et al., 2002; Shen et al., 2000;

Zhao et al., 2002). HA/kitosan jelatin doku iskeleleri üretilmiş ve *in vitro* çalışmalar hücre dışı matrislerin sentezlenebileceğini ve kemik gibi yapılara şekillendirilebildiği gösterilmiştir (Zhao et al., 2002).

Doku mühendisliği için kullanılan diğer bir doğal malzeme ise nişastadır. Nişasta, kemik implantından, doku iskelelerinin üretimine ve ilaç salım sistemlerine kadar geniş bir biyomedikal uygulama alanına sahiptir (Lam et al., 2002; Levy et al., 2004). Nişasta, pratikte farklı uygulamalarda farklı özelliklere sahip doku iskelesi olarak kullanabilmek için selüloz asetat (Levy et al., 2004; Salgado et al., 2002), hidroksiapatit (Marques ve Reis, 2005), poli(etilen-vinil-alkol) ve poli(laktik asit) (Neves et al., 2005) gibi diğer biyomalzemeler ile birleştirilmektedir.

#### **2.4.1.3. Biyoaktif seramikler**

Biyopolimerlerden başka biyoaktif seramikler de doku mühendisliğinde kullanılmaktadır. Tri-kalsiyum fosfat (TCP) ve hidroksiapatit (HA,  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ ) ve bunların kombinasyonları doku iskelesi üretiminde oldukça sık kullanılan biyoseramiklerdir. Bu iki biyoseramik sert doku ile mükemmel bir uyumluluğa, yüksek osteokondüktif özelliğe ve biyoaktiviteye sahiptirler. Antijenik ya da sitotoksik özellik taşımamakta ve kemik implantı ya da doku iskelesi olarak gözenekli yapılara proses edilebilmektedirler (Kikuchi et al., 2004; Liu, 1997; Miko ve Temenoff, 2000; Sukhodub et al., 2004; Vail et al., 1999). Ancak kırılman yapılarından ve kontrollü olarak yüksek gözenekli hale getirilmek istendiğinde işleme zorlukları ile karşılaşıldığından dolayı kullanım alanları kısıtlanmaktadır (Liu, 1997; Meenan et al., 2000). Bu dezavantajların üstesinden gelmek, biyouyumluluklarını ve hücre yapışmasını arttırmak için kollajen ile birlikte kullanılmaktadır (Clarke et al., 1993; Rodrigues et al., 2003). Kikuchi ve arkadaşları (2004), biyomimetik çöktürme yöntemi ile kemik benzeri HA/kollajen kompozitler üretmişlerdir. Kemik dokusu reaksiyonu ve kemik formasyonu otojenik bir implanta benzer mükemmel bir osteoklastik resorpsiyon göstermiştir. Sözü geçen bu *in vitro* çalışmada osteoblastlar kullanılmış, hücrelerin HA partiküllerinin yüzeyine ve kollajen fiberlere tutunup yayıldığı ispatlanmıştır.

Biyoaktif seramikler sınıfına giren biyoaktif camların ve seramiklerin genel özelliği yüzeyinin dokular ile bağ oluşumunu sağlayan, biyoaktif “hidroksikarbonatapatite” (HCA) tabakasından oluşmasıdır. Biyoaktif implant üzerinde oluşan, HCA fazı kimyasal ve yapısal olarak kemikteki mineral faza eşdeğerdir.

Biyoaktif camların ve seramiklerin doku mühendisliği için en önemli özellikleri enzimatik faaliyetleri ve üç boyutlu vasküler yapı oluşumunu desteklemeleri (Day et al., 2004), dokunun kendine has özellikte farklılaşmasına yardımcı olması ve kemik dokudaki mezenkimal hücrelerin kendine has farklılaşmasına olanak sağlamasıdır (Schepers et al., 1991). Ayrıca, biyoaktif camda çözülen ürünler, gen ekspresyonunu denetim altına alarak kemiklerin gelişimini ve geliştirici faktörlerin üretimini kontrol eder.

Kompozit doku iskelelerinde ise doku iskelesi özelliklerinin iyileştirilmesi için iki veya daha fazla malzeme birleştirilerek dokunun fizyolojik ve mekanik ihtiyacı sağlanabilir. Polimerik yapının sağladığı avantajların yanı sıra, biyoaktif seramik fazın hacimsel fraksiyonu kontrol edilerek, üretilen doku iskelesinin mekanik dayanımı istenilen boyutta ayarlanabilir. Malzeme biyoaktivliği kompozit doku iskelesi performansında etkili bir parametredir. Biyoaktivite derecesi, hacimsel fraksiyon, birim hacim başına düşen yüzey alanı ve içerikteki malzemenin yapısal düzeni, şekli, boyutu ile düzenlenebilir. Biyolojik emilime sahip polimerlere biyoaktif inorganik malzemelerin ilavesi, polimerin bozunma davranışı değiştirebilir. Biyoaktif camların da içinde bulunduğu kompozit doku iskelelerinin yüzey ve yığın özellikleri hidrofobik polimer matrisin su absorpsiyonunun ve hidrofiliğinin artırılmasına sebep olurken, böylelikle doku iskelesinin bozunma kinetiğini de değiştirilebilir (Maquet et al., 2004).

#### **2.4.2. Kemik Doku Mühendisliği Doku İskeleleri**

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak olan doku iskelelerinin sahip olması gereken özelliklerin en başında doku iskelesinin üretiminde kullanılan malzemenin biyouyumluluk özelliği gelmektedir. Vücuda implante edilen doku iskelesinin vücutta enfeksiyona neden olmaması, bağışıklık sistemini uyarıcı etkide bulunmaması ve sitotoksik etki göstermemesi açısından şarttır (Rezwan et al., 2006). Biyouyumluluk, doku iskelelerinin hücre infiltrasyonunu ve

vaskülarizasyonunu sağlaması, böylece doku ile bir bütünlük oluşturabilmesi açısından da büyük önem taşımaktadır. Doku iskelelerinin hidrofilik özellikleri ve yüzey yük yoğunlukları da özellikle hücre yapışmasını ve yayılmasını etkileyen özelliklerdir (Burg et al., 2000). Bazı doku iskelelerinin üretiminde kullanılabilen başlatıcı, stabilizör, çapraz bağlayıcı ve çözücü gibi kimyasalların kalıntılarının, doku iskelelerinin biyouyumluluk özelliklerini değiştirebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Doku iskelelerinin sahip olması gereken bir diğer özellik ise birbirleriyle bağlantılı, kontrol edilebilir gözenekliliktir. Gözeneklilik, hücrelerin tutunması, çoğalması, iç bölgelere kadar yayılmaları, besinlerin aktarımı ve atıkların uzaklaştırılması ayrıca damarlanmanın gerçekleşmesi için çok önemli bir parametredir. Kemik dokusunun yenilenmesi için doku iskelelerinin en az %90 gözeneklilik ve 100 ila 400 µm arası gözenek boyutlarına sahip olmaları gerekmektedir (Boyan et al., 1996).

Doku iskelesi malzemeleri, vücut içinde bozunmaya ve resorpsiyona uğrarken aynı zamanda dokudaki hücrelerin doku iskelesine yapışıp, yayılmasını ayrıca sayıca olduğu kadar nitelikçe de iyileşmesini sağlayacak şekilde seçilmelidir. İdeal bozunma hızı, yeni doku oluşum hızıyla paralel gidecek ve aynı zamanda yeni doku oluşana kadar doku iskelesinin yeterli mekanik bütünlüğünü korumasına yetecek biçimde ayarlanmalıdır. Böylece hücre üremesi ve hücre dışı matris sentezi ile doku yenilenmesi gerçekleşirken, doku iskelesi hem gerekli fiziksel desteği sağlayacak hem de bozularak yeni oluşan dokuya gerekli olan boşluğu oluşturacaktır. Kemik rejenerasyonunun amaçlandığı çalışmalarda kullanılan doku iskelelerinin fiziksel özelliklerini en az 6 ay korumaları gerekmektedir (4 ay hücre kültürü, 2 ay vücut içi). Sonrasında ise doku iskelesinin, defekt bölgesinde fizyolojik pH değerini düşürmeyecek, vücutta toksik etki göstermeyecek ve metabolik yollarla vücuttan uzaklaştırılabilecek toksik olmayan bozunma ürünleri oluşturarak, 12-18 ay arasında bozunması beklenmektedir (Hutmacher, 2000).

Özellikle kemik gibi yük taşıyan dokuların tedavisinde kullanılan doku iskelelerinin sahip olması gereken en önemli özelliklerden biri diğeri de mekanik dayanımdır. (Rezwan et al., 2006; Choong et al., 2004). Mekanik dayanım için doku iskelesi üretimi için kullanılan malzemenin hem güçlü moleküler bağlara hem de

bozunmaya izin verecek kimyasal ve fiziksel yapıya sahip olması gerekmektedir (Hutmacher, 2000).

İdeal bir doku iskelesinde aranılan bir başka özellik ise yüzey/hacim oranının yüksek olmasıdır. Yüksek yüzey alanı/hacim oranı daha çok hücrenin doku iskelesine tutunmasına olanak sağlayacağı için yararlıdır. Gözenek çapı ve iç yüzey alanı doğru orantılı olduğundan, uygulamanın yerine göre yüzey alanı ve mekanik özellikler arasında bir uzlaşma noktası bulunur.

Tüm bu özelliklere ek olarak, doku iskelelerinin sterilize edilebilir olması, endüstriyel üretim için ölçek büyütme için izin veren bir şekilde ve istenilen geometride üretilmesi, doku mühendisliği iskeleleri için büyük önem taşımaktadır.

#### **2.4.2.1. Doku iskeleleri üretim yöntemleri**

Biyomalzemelerden yüksek gözeneklilikte üç boyutlu doku iskelesi elde etmek için birçok teknik ve yöntem bilinmektedir (Sepulveda et al., 2001; Lee et al., 2005). Yaygın olarak kullanılan teknikler, termal etkiyle faz ayırımı, çözücü döküm ve partikül özütlemesi, faz dönüşümü ve partikül özütlemesi, fiber çekme/bağlama, eriterek kalıplama, gazla köpüklendirme/yüksek basınç muamelesi, membran laminasyonu, hidrokarbon kalıplama, dondurarak kurutma, emülsiyondan dondurarak kurutma, çözelti döküm ve bu tekniklerin kombinasyonlarıdır. (Hutmacher, 2001; Nishimura, 2003; Liu ve Ma, 2004, Rezwan et al., 2006). Bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajlarından aşağıda kısaca bahsedilmiştir.

Doku iskelesi üretimindeki en büyük sorun, istenen makro-yapısal (dış geometri, bileşim, mekanik dayanım, yoğunluk, gözeneklilik), mikro-yapısal (gözenek boyu, gözenekler arası bağlantılar, bozunma davranışı) ve nano-yapısal (yüzey topografisi, yüzeyin fiziksel-kimyasal yapısı) özelliklerin kesin bir şekilde korunmasıdır. İdeal olarak, fabrikasyon tekniğinin aynı zamanda farklı temel malzemelerin kullanımına izin vermesi gerekir. Farklı malzemelerden oluşan karmaşık doku iskelelerinin tasarımı da üretimde diğer basamakları zorunlu kılar. Çeşitli mühendislik parametreleriyle doku iskelesi üretiminin sonucu belirlenebilir (Aydın, 2008).

### **Termal etkiyle faz ayırımı**

Gözenekliliği yüksek (~97%), üç boyutlu polimerik doku iskelesinin üretimi için kullanılan yöntemlerden biri “termal etkiyle faz ayırımı” (thermally induced phase separation; TIPS) yöntemidir. Bu yöntemde biyobozunur polimer uygun bir çözücü çözülür, ardından kompoziti oluşturan inorganik maddeler ile karıştırılır ve kalıplanır. Ardından sıcaklık çözücünün donma sıcaklığı altına indirilir, kristallendirilen çözücü “freze-drying” yöntemiyle yapı içerisinde uzaklaştırılır. Bu yöntemle elde edilen doku iskeleleri; sinir, kas, tendon, bağ doku, bağırsak, kemik ve diş doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır. Elde edilen doku iskelesi anizotropik kanalsı yapıda olup yüksek orvea gözeneklidir. TIPS yöntemiyle üretilen köpüklerin mikro-gözenekliliği, gözenek yapısı, mekaniksel özellikleri, biyoaktivite ve biyobozunma oranları, çeşitli polimer konsantrasyonları, hacimsel fraksiyon, sıcaklık ve kullanılan polimer-çözücü ile kontrol edilebilir (Rezwan et al., 2006). Maquet ve arkadaşları (2004), TIPS metodu ile bimodal, anizotropik gözenek yapısında, yüksek gözeneklilikte PDLLA/Biyocam® kompozit doku iskeleleri geliştirmişler ve bu doku iskelesini de kemik doku mühendisliğinde kullanmışlardır. Bu yöntemin başlıca dezavantajı tekrarlanabilirliğinin az olması, toksik çözücüler kullanılması ve üç boyutlu üretimin zor olmasıdır.

### **Çözücü döküm ve parçacık özütleme**

Uygulanan başka bir yöntem ise “çözücü döküm ve parçacık özütleme” (solvent casting ve particle leaching) yöntemidir. Mikos tarafından 1994'te ilk kez açıklanan bu yöntem, polimerin organik çözücüde çözünmesi, seramik parçacıklarla karıştırılması, çözeltinin üç boyutlu bir kalıba dökülmesini ve son olarak çözücünün buharlaştırılması ve ardından parçacıkların özütlenmesi aşamalarını içerir. Çözücü döküm ve partikül özütleme tekniği özellikle poli(L-laktik asit) (PLLA) doku iskelelerinin üretiminde kullanılmış olsa da, diğer polimerler için de uygulanmıştır (Gomes, 2002). Bu üretim yönteminde, ekstra ekipmana ihtiyaç duyulmadığından avantajlı olarak görülse de sadece belirli formlarda üretim yapılması (düz yaprak veya tüp), polimerden toksik çözücünün tamamen uzaklaştırılamaması, çözücü kullanarak polimerde birleşmiş olan protein veya diğer moleküllerin bozunması gibi dezavantajları da vardır. Polimer-seramik yapılar, çözücü agregasyon yöntemi ile de üretilir. Polimer mikroküreler öncelikle geleneksel su yağ/su emülsiyonunda

şekillendirirler. Daha sonra çözücü-agrege polimer-çözücü doku iskeleleri, çözücü, tuz ya da şeker partikülleri, seramik granüller ve önceden sertleştirilmiş mikrokürelerle karıştırılarak yapılandırılırlar (Boccaccini et al., 2007).

### **Serbest katı formlama**

Serbest katı formlama (solid freeform fabrication, SFF) üretim yöntemi ise bilgisayar destekli tasarım (CAD), bilgisayarlı tomografi (CT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi bilgisayar verilerinden direkt olarak özel olarak üretime olanak sağlayan gelişmekte olan bir teknolojidir (Das et al., 2003). 20 yıldan bu yana 20'den fazla SFF sistemi geliştirilmiş ve ticaretleştirilmiştir. Bu yöntemle tamamen birbiriyle bağlantılı gözenekli ağ yapılı, tekrarlanabilirliği yüksek doku iskelesi üretilebilir (Taboas, 2003). SFF tekniği kontrollü mikro ve makro gözenekli doku iskelelerinin geliştirilmesi için konvansiyonel köpük doku iskelesi üretim prosedürleriyle (faz ayırma, emülsiyon-çözücü difüzyonu) birleştirilebilir. Bu tür biyomimetik yapılar, multi-doku ve yapısal doku ara yüzü için değerlendirilebilir. Literatüre göre bu yöntemle üretilmiş herhangi bir bozunur polimer/biyoaktif cam kompoziti bulunmamaktadır. Bu yöntem yalnızca biyoaktif faz olarak kalsiyum fosfat içeren kompozitler için uygulanmaktadır (Xiong et al., 2002). Xiong ve arkadaşları (2002), SFF üretim yöntemi bazlı düşük sıcaklık depozisyonu ile gözenekliliği %90'na kadar çıkan ve mekanik özellikleri insan kanselöz kemiğine yakın olan PLLA/TCP kompozitleri elde etmişlerdir. SFF yöntemi, gözenek boyutu ve şekli, dallanma, bağlantı, geometri ve oryantasyon gibi birçok hassas mimariye sahip doku iskelelerinin üretiminde ve özellikle doku mühendisliği gibi biyomedikal uygulamalarda yaygınlaşması öngörülmektedir (Fang et al., 2005; Hutmacher, 2001; Hutmacher et al., 2004; Khalil et al., 2005; Lam et al., 2002; Sun ve Lal, 2002; Wilson et al., 2004).

### **Mikroküre sinterleme**

Mikroküre sinterleme ise bilinen diğer bir yöntemdir. Bu yöntemde öncelikle seramik ve polimer kompozit mikroküreleri emülsiyon/çözücü buharlaştırma tekniği ile sentezlenmektedir (Ambrosio et al., 2001; Khan et al., 2004). Lu ve arkadaşları (2003) tarafından kompozit mikrokürelerin sinterlenmesi ile üç boyutlu biyobozunur polimer ve biyoaktif cam kompozitleri üretilmiştir. Daha yakın geçmişte ise Yao ve

arkadaşları (2005), PLGA/biyoaktif cam kürelerini emülsifikasyonla sentezlemişler ve üç boyutlu gözenekli yapı elde etmek için kalıplar içerisinde ısıtmışlardır. Daha sonra ürettikleri malzemelerin biyoaktivitesini ve stromal ilik hücrelerinin osteogenezisi için uygunluğu göstermişlerdir.

### **Fiber bağlama**

Fiber ağ yapılar oluşturmada, örme, dokuma ve fiber bağlama gibi yollarla doku iskeleleri hazırlamak amacıyla biyobozunur fiberler kullanılır (Cooper et al., 2005/2000; Freed et al., 2006). Birkaç polimerin aynı anda eğilmesiyle fonksiyonel fiberler elde etmek mümkündür. PGA ve PLA fiberler bu yöntemle üretilen en yaygın fiberlerdendir (Ouyang et al., 2003). Tek başlarına kullanılabilirler gibi, biyouyumluluğu arttırabilmek gibi amaçlarla kollajen türü biyomalzemelerle birlikte de kullanılabilirler. Örme ve dokuma tekniği hayli basit olup, toksik olmayan kimyasallar içermektedir. Ancak bu teknikte, düşük sertlik ve gözenek boyutu ile şeklinin kontrolündeki zorluk gibi sınırlamalar söz konusudur. Fiber bağlamada iki fiber malzeme “ısı ile eriterek birleştirme” veya “gömme” ile birbirine bağlanır ve daha sonra malzemelerden biri seçici bir çözücüde çözülerek fiber iskelesi elde edilir. Bu teknikle doku mühendisliğine uygun, birbiriyle bağlantılı, yüksek gözeneklilikte doku iskeleleri elde etmek mümkün olmasına rağmen, kullanılan çözücünün tamamıyla uzaklaştırılamaması durumunda hücrelere karşı toksisite ortaya çıkabilmektedir ki bu da hücrelerin in vivo ortamda yeni doku oluşturamaması anlamına gelmektedir (Miko ve Temenoff, 2000).

### **Faz ayırma**

Faz ayırma tekniği, polimer-su emülsiyonları gibi termodinamik olarak kararsız özellikte olan ve serbest enerjisini düşürmek için faz ayırımına uğrayan çok bileşenli homojen bir sisteme dayanmaktadır (Whang et al., 1995). Doku iskelesi üretimi açısından, sıcaklık etkisiyle faz ayrımı sonucunda polimerce zengin ve polimerce zayıf fazlar elde edilir. Lliyofilizasyon veya çözücü ekstraksiyonu ile çözücü uzaklaştırıldıktan sonra çözücünün yerinde gözenekler kalmakta dolayısıyla gözenekli yapı elde edilmektedir (Chen et al., 2001; Zhang ve Ma, 1999). Faz ayrılma koşulları değiştirilerek oluşan doku iskelesinin özellikleri de kontrol edilebilir. Ma ve Zhang (2001) modifiye edilmiş bir faz ayırma yöntemi

kullanarak yönlendirilmiş mikrotübüller içeren, yüksek gözenekliliğe sahip bir doku iskelesi hazırlanmıştır. Bu teknik fibröz yapıda doku iskelelerinin hazırlanmasında da kullanılmıştır (Ma ve Zhang, 1999). Sözü geçen teknikte gözeneklerin oluşturulabilmesi için organik çözücüler kullanıldığından, hücreler için toksisiteye neden olabilecek çözücünün uzaklaştırılması çok büyük önem taşımaktadır. Doku iskelesi üretiminde yüksek basınç CO<sub>2</sub> kullanımı ile toksik çözücü gereksinimi ortadan kalkmaktadır (Mooney et al., 1996). Ancak bu şekilde elde edilen doku iskeleleri doku mühendisliğine uygunluk göstermeyen gözeneksiz yüzeylerin elde edilmesine neden olmaktadır.

Yukarıda bahsedildiği gibi, uygulanacak doku iskelesi üretim tekniği birincil olarak kullanılan malzemeye göre belirlenir. Doğal olarak bulunan, organik olmayan malzemeler örneğin sentetik organik malzemeler için kullanılan tekniklerden farklı şekilde ve doğal olarak bulunan organik olmayan malzemeler de sentetik organik malzemeler için kullanılanların dışında farklı tekniklerle üretilir. Organik olmayan malzemelerin üretimi genelde seramik teknolojisinde kullanılan tekniklerle yapılırken, sentetik ve doğal polimer malzemelerinin işlenmesi için çok çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Geleneksel polimer işleme teknikleri, yığın ya da gözenekli yapıya sahip doku iskelelerinin oluşturulmasında kullanılan süreçler olarak tanımlanabilir.

Doku mühendisliği için kullanılan doku iskelelerinin üretim tekniklerinden bir tanesi de elektro-eğirme tekniğidir. Tez kapsamında kullanılan doku iskelelerinin üretimi bu teknik kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle elektro-eğirme tekniği aşağıda daha ayrıntılı olarak incelenmiştir.

## **2.5. Elektro-eğirme Yöntemi**

### **2.5.1. Tarihi**

Sentetik fiberleri oluşturmak için kullanılan elektrostatik kuvvetlere dayalı işlemler yüz yılı aşkın zamandır bilinmektedir. Elektro-eğirme olarak tanımlanan bu işlemde, yüksek gerilim kaynağı ile belirli bir polaritedeki yükü polimer çözeltilisine ya da eriyiğine aktararak zıt polaritedeki toplayıcıya doğru ivmelenmesi sağlanır. Zıt yüklere sahip sıvı ve toplayıcı arasındaki elektrostatik çekim ve sıvıdaki benzer yüklere ait elektrostatik itme çözeltilinin yönelim kenarında güçlü hale gelerek

yuvarlaklaşan bir menisküs eğisinden koni şekline (Taylor konisi) dönüşür. Sonuç olarak sıvının yüzey gerilimini yenerek elektrik alan boyunca ilerleyen fiber jet, yol aldığı atmosferde çözücüsünün buharlaşmasıyla katı polimer fiber yapısı halinde toplayıcı üzerinde oluşur. Bu işlem kullanılarak üretilen fiber yapılar çap olarak genellikle birkaç mikrondan nanometre ölçeğine kadar sıralanmaktadır. Bu biyolojik boyut ölçeklerinde kolaylıkla malzeme üretiminin sağlanması, elektro-eğirme yöntemi üzerine doku mühendisliği ve ilaç salım uygulamaları için farklı yeni ilgi alanları oluşturdu.

Örgüsüz fibröz yapıları oluşturmak için nispeten daha kolay ve çok yönlü uygulamalara açık olduğu kanıtlanmış elektro-eğirme yöntemi için kullanılan işlemsel parametreler oluşturulan fiber yapıların özelliklerini önemli bir ölçüde etkilemektedir. Başlangıçta, bu parametrelerin çokluğundan kaynaklanan teknik zorluklar bu yöntemin düşük çaplı polimer fiberleri oluşturmak için uygulanabilir bir teknik olmaktan uzak olduğunu açığa çıkarmıştır. Formhals 1934'te patentini aldığı yöntem ve cihaz ile elektriksel yük kullanarak sentetik fiberleri eğirmeyi başarmış ve elektro-eğirme işlemi düşük çaplı fiberleri oluşturmak için tam anlamıyla geçerli bir işlem yöntem haline gelmiştir. Bu cihaz Formhals tarafından fiberleri gergin yapıda toplayabilen ve hizalanmış fiber yapısı biriktirebilen taşınabilir bir iplik toplayıcı olarak kullanılmıştır. Formhals, bu cihazı kullanılarak çözücüsü aseton/alkol çözeltisi olan selüloz asetat fiberlerini başarılı bir şekilde oluşturmuştur.

Formhals'ın bu buluşu öncül elektro-eğirme yöntemleri içinde belirgin bir ilerleme oluştursa da hala bazı dezavantajlar içermekteydi. Toplayıcının yüklenmiş polimer çözeltisine yakınlığına bağlı olarak fiber jetin toplayıcıya ulaştığında çözücünün tam olarak buharlaşmamış olması gevşek bir örgü yapısının oluşmasına neden olmaktaydı. Tamamlanmamış çözücü buharlaşmasının başka bir sonucu da fiberlerin birbirlerine ve toplayıcıya yapışmaya eğilimli olmasıyla meydana gelen çıkartılarak taşınma problemidir. Bu nedenle, Formhals tarafından patentlenen ikinci detaylı yöntemde eğirme ve toplama tarafları arasında daha büyük bir uzaklık kullanılmıştır ve böylece daha önce karşılaşılan birçok problem bastırılmıştır. İkinci patentinde Formhals, çoklu başlık kullanarak aynı polimer çözeltisinden eş zamanlı fiberler eğirme yöntemiyle fiber jetlerin toplayıcıya doğru iletimini tanımlamıştır.

Formhals 1940 yılında patentlediği yeni yönteminde polimer çözeltisinin doğrudan taşınabilir bir yapı üzerinde elektro-eğirme yöntemi ile kompozit yapıdaki fiberler oluşturduğunu tanımlamıştır.

Elektro-eğirme yönteminin anlaşılmasının ardından Formhals daha sonraki çalışmalarında yöntemin geliştirilmesi üzerine odaklanmıştır. Bu gelişmelerden yaklaşık 30 yıl sonra, 1969 yılında Taylor kapiler bir sistem sonundaki bir polimer damlacığının elektrik alan uygulandığındaki davranışı üzerine çalışmasını yayınlamıştır. Çalışmalarında yüzey geriliminin elektrostatik kuvvetlerle dengelenmesi durumunda asılı damlacığın konik (Taylor konisi) bir şekil aldığını gözlemlemiştir. Bunun yanında, fiber jetin oluşan konik yapının uç kısmından çıktığını bulan Taylor, işlem sırasında kullanılan kapiler sistemdeki çaptan daha düşük çaplarda fiber yapılar oluşumunu da böylece açıklamıştır. Taylor bunu izleyen çalışmalarında koninin ucundayken koni eksenine 49.3 derecelik bir açının (ya da 98.6 derecelik bir konik açı) yüzey gerilimiyle elektrostatik kuvvetler arasında bir denge oluşturması için gerekli olduğuna bir çok viskoz akışkan üzerinde gözlemleyerek ulaşmıştır.

Taylor'un bu yayınlanan çalışmalarından sonra ilgi yavaş yavaş elektro-eğirmenin temel özelliklerinden daha detaylı bir biçimde birbirinden ayrı ilişkilendirilen işlem parametrelerine ve oluşan fiberlerin yapısal özelliklerine yönelmiştir. Baumgarten 1971 yılında, belli bir çözeltiyi ve işlem parametrelerini (çözelti viskozitesi, akış hızı, uygulanan voltaj, vb.) çeşitlendirmenin oluşan fiber yapılarının özellikleri üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışmalarında poliakrilonitril/dimetilformamid (PAN/DMF) çözeltisi kullanarak metal bir kapiler sistemden çıkartım gerçekleştirmiştir. Yüksek hızlı kamera ile yüklenmiş asılı damlacıktan tek bir fiber yapısı oluşumu gözlemlenmiştir. Bu sistem kullanılarak fiber çapının çözelti viskozitesine doğrudan bağlı olduğu açıklanmış, yüksek viskozitelerde daha büyük çaplı fiber oluşumu gözlemlenmiştir. Bunun yanında, fiber çapına artan elektrik alana karşılık doğrusal olarak bir düşme gözlemlenmemiştir. Başlarda artan elektrik alan uygulamasına karşılık fiber çapında düşme gözlemlenmişse de belirli bir minimum değere ulaşılmasının ardından uygulanan elektrik alanın artmasına rağmen fiber çapında artış gözlemlenmektedir. Baumgarten, çözelti ve işlem parametrelerinin çeşitlendirilmesiyle elektro-eğirme ile elde edilen fiber çaplarının 500nm ile 1100nm

arasında olduğunu gözlemlemiştir. Baumgarten'in bu öncül çalışmalarının yaklaşık 25 yıl sonrasında polimer eriyiklerin elektro-eğirme yöntemiyle oluşan fiberlere ait yeni ortalamalarla değişime uğratılmış yapısal özelliklerinden takviye edilmiş bir çalışma izlenmiştir. Larrondo ve Mveley elektro-eğirme yöntemiyle polietilen ve polipropilen eriyiklerinden başarıyla fiber yapılar elde etmiştir. Bu çalışmaların sonucunda eriyiklerden elde edilen fiber çaplarının çözültiden elde edilen fiber çaplarından daha büyük olduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanında fiber çapının eriyik sıcaklığına ters yönde bağlı olduğuna ulaşılmıştır.

Aynı dönemlerde doku mühendisliği alanında elektro-eğirme yöntemi ile oluşturulacak potansiyel uygulamalar üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Annis ve Bornat 1978 yılında vasküler protez olarak elektro-eğirme yöntemiyle oluşturulmuş bir matris üzerine çalışmalarını yayınlamıştır. Fisher ve Annis 1985 yılında elektro-eğirme yöntemiyle oluşturulmuş arter protezinin uzun vadede in vivo performansını gözlemek amaçlı çalışmada bulunmuştur. Sonuç olarak, elektro-eğirme yöntemiyle oluşturulan öncül fibröz yapı çalışmalarının doku mühendisliği ve ilaç salım alanlarındaki yerini alması seneleri bulmuş, yaygın bir ilgi alanına hitap eden bir polimer işleme yöntemi olarak uygulama sahasına ulaşmıştır.

### **2.5.2. Genel Proses Parametleri**

Basit bir elektro-eğirme sistemi genellikle üç ana kısımdan oluşmaktadır: bir yüksek voltaj güç sağlayıcı, bir iplik üretimi için başlık (örneğin bir pipet ucu) ve topraklanmış toplama plakası (genellikle metal bir yüzey, tabela ya da döndürülebilir bir mil yapı). İşlem için polimer çözeltisine yükleme yapıldığında dışsal bir elektrik alan etkisi altında başlığa doğru ilerler, yüzey gerilimi ile elektrik alanın dengelendiği noktaya ulaşıldığında asılı kalan bir konik damla şekli oluşturur. Uygulanan elektrik alan yüzey gerilimini yendiğinde zayıf bir jet damlacığının yüzeyinden kurtularak toplama plakasına doğru ilerler.

Toplama plakasına doğru oluşan fiber jet ilerledikçe çözücüsünün buharlaştığı gözlemlenir. Oluşan ürün yüksek bir yüzey alan-hacim oranına ve mikron ölçekli gözeneklere sahip örgüsüz fibröz iskele yapısıdır. Fiber kalınlığı ve morfolojiyi kontrol eden parametreler; çözelti özellikleri (viskozite, elastisite, iletkenlik ve yüzey gerilimi), elektrik alan kuvveti, toplayıcı ile başlık arası uzaklık, sıcaklık ve

nemliliktir. Başlık verimliliği düşük çaplı fiberlerin oluşumunda oldukça düşüktür. Son zamanlarda yapılan çalışmalar multi-jet ve püskürtme destekli elektro-eğirme yöntemleri ile endüstriyel amaca yönelik üretim imkanı üzerine yoğunlaşmaktadır. Örneğin, nanofibröz iskeleler doku mühendisliği immobilize edilmiş enzim ve katalizörler, yara örtü malzemeleri, yapay kan damarları gibi alanlara hizmet etmektedir. Ayrıca ameliyat sonrası oluşan yapışma önleyici bariyer ve kontrollü ilaç (gen) salım aracı olarak da kullanılmaktadır. Belirlenen hedefe yönelik başarılı bir uygulama gerçekleştirmesi için nanofibröz iskeleler ihtiyaca uygun fiziksel ve biyolojik özellikleri sağlamalıdır. Örneğin, doku mühendisliğinde, elektro-eğirme ile oluşturulmuş uygun mekanik özelliklere sahip iskeleler fiziksel olarak hücre dışı matrislerdeki nanofibröz yapıya benzemelidir. Ayrıca hücre tutunmasını, yapışmasını ve çoğalmasını da desteklemelidir. Yara örtü uygulamaları için nanofibröz iskeleler, doku yenilemesini sağlayacak bir malzeme olmak dışında biyoaktif etmenler sağlamalı ve iyileşme sırasında kontrollü salımı gerçekleştirilecek ilaç (örneğin antibiyotik) içeren bir yapıda olmalıdır. Bu fonksiyonel özelliklere sahip bir nanofibröz iskele disiplinler arası bir yaklaşımla fizik, kimya, biyoloji ve mühendislik alanlarının birleşimiyle oluşturulmaktadır.

Biyomedikal uygulamalarda elektro-eğirme yöntemiyle elde edilen nanofibröz iskelelerin hidrofilitate, mekanik modül ve dayanım, biyobozunurluk, biyouyumluluk ve özgül hücre etkileşimleri gibi fiziksel ve biyolojik özellikleri malzemenin kimyasal bileşimlerinde belirlenmektedir.

Kopolimerizasyon ve polimer blend yöntemleri polimer fiziği bazında ele alındığında farklı polimerleri yeni malzemelerin özelliklerinden yararlanarak verimliliği için birlikte kullanması için uygulanmıştır. Böylece belirli bileşenlerin kombinasyonları seçilerek ve bileşen oranları ayarlanarak elektro-eğirme yöntemi sonucu oluşan iskele yapısına istenilen yeni özellikler eklenebilmektedir. Birçok kopolimer ve polimer karışımı, örneğin poli(laktik-koglikolit), poli(etilen-ko-vinil alkol), elastin içerikli kollajen karışımları (49), poli(etilen oksit) içeren kitosan karışımları (PEO ve ya PEG moleküler ağırlıkları küçükse, örneğin <5000 Da), elektro-eğirme yöntemi ile biyomedikal kullanım amaçlı nanofibröz iskele üretiminde kullanılmaktadır, ancak bunlar kendi aralarında başarı

sıralaması içerisinde yer almaktadırlar.

Malzeme bileşimi avantajlarından yararlanmanın yanı sıra, fiber çapı, morfoloji, ve iskele gözenekliliği ayarlanarak üretim işlemi kontrol edilebilir ve bu oluşan iskele özelliklerini ve işlevlerini belirlemede önemli bir rol oynar. Örnek olarak, çift fazlı elektro-eğirme işlemi, ilaç katılımı ya da kontrollü salım amaçlı fiber içeriğine biyopolimer ekleme uygulamaları için yeni bir geçiş yolu açmaktadır. Elektro-eğirme işlemi sonucunda iskelenin fiziksel ve kimyasal değişimlere uğratılması, belirli amaçlara yönelik değişik özellikteki çalışmaların yapılmasına imkan vermektedir. Örneğin, elektro-eğirme ile üretilmiş polietilen tereftalatik (PET) iskele yüzeyine jelatin nakli gerçekleştirmek biyouyumluluğu yükseltebilmekte, ayrıca iskeleyi hücre tutunması ve çoğalması için daha uygun hale getirebilmektedir

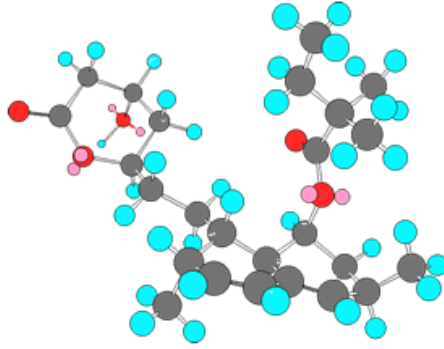
Biyomedikal uygulamalar için elektro-eğirme alanında yapılan son çalışmalarda kullanılan malzemeler, uygulanan teknoloji, iskeleler üzerinde işlem sonrası düzenlemeler üzerinde durulmaktadır: (1) kopolimer ve polimer karışım yapılarını da içeren polimer malzemesi dizaynı (2) yeni inovatif elektro-eğirme teknikleri ve (3) elektro-eğirme sonrası düzenlemeler. Bu üç alan geliştirilen fiziksel ve biyolojik özellikleriyle yeni işlevlere sahip iskeleler oluşturacak şekilde bir arada kullanılmaktadır.

## **2.6. Statinler**

3 hidroksi-3-metilgluteril-koenzim A (HMG-CoA) redüktazı inhibitörü olan statinler HMG-CoA'nın mevalonata dönüşümünü katalizler. Bu, kolesterol biyosentezindeki erken ve hız sınırlayıcı aşama olarak tanımlanır. Statinler, yüksek kan kolesterol seviyesi bulunan hastalarda ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan, güvenilirlikleri kanıtlanmış, en etkili ajanlardır. Geniş çaplı klinik çalışmalar statinlerin total serum kolesterol seviyesini %15-40, LDL (Düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterol seviyesini %20-60, trigliserit seviyesini %10-30 oranında azalttığını ve HDL (Yüksek yoğunluklu lipoprotein) seviyesini %5-15 oranında arttırdığını göstermiştir. Statinlerin koroner arter hastalığı bulunan veya bulunmayan kişilerde kardiyovasküler ölüm oranını azalttığına dair birçok çalışma bulunmaktadır. Statinler, atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, serivastatin, rosuvastatin ve simvastatini kapsamaktadır (Aykan, 2007).

### 2.6.1. Simvastatin

Statin grubunun en çok tanınan üyesinden birisidir 14 ve *Nocardia autrophica*'dan elde edilen doğal kaynaklı bir maddedir. Simvastatin 2,2-dimetil-,1,2,3,7,8,8a-heksahidro-3,7-dimetil-8-(2-(tetrahidro-4-hidroksi-6-okso-2*H*-piran-2-il)-etil)-1-naftalenil kimyasal formülüne sahip bir bütanoik asittir. Simvastatinin ampirik formülü  $C_{25}H_{38}O_5$  ve moleküler ağırlığı 418.57, erime noktası ise 135-138 °C'dir. Şekil 2.8'de simvastatinin moleküler yapısı gösterilmiştir. Nem tutmayan kristal toz halindeki yapı, suda çözünebilir değilken, kloroform, metanol ve etanolde çözünebilmektedir.



Şekil 2.8. Simvastatinin moleküler yapısı

Klinik olarak oral yoldan 5, 10, 20, 40 ve 80 mg/gün olarak tablet şeklinde uygulanır. Simvastatin %60-80 oranında emilime uğrar. Uygulanan dozun %5'i sistemik dolaşıma geçer. Simvastatinin atılımı %13 oranında idrara, %60 oranında feçese olur. Yarılanma ömrü 3 saattir. Simvastatinin emilimi besinlerden etkilenmez, besinlerden bağımsız olarak kullanılabilir. Kolesterol esas olarak geceleri sentezlendiğinden akşam ilaç uygulamasının sabah uygulamasından daha etkili olduğu bulunmuştur. Simvastatin karaciğerden ilk geçişte elimine olduğundan en büyük etkisi bu organ üzerindedir. Karaciğer yetersizliği ilacın birikimine neden olabilir. Preparat içindeki herhangi bir bileşene aşırı duyarlılık durumunda, aktif karaciğer hastalığında, karaciğer fonksiyon testlerinin açıklanamamış ısrarcı yüksekliğinde, gebelikte ve laktasyonda ilaç kontendikedir. Pedyatrik kullanım ile ilgili güvenilirlik ortaya konmadığından çocuklarda kullanımı önerilmemektedir.

Tüm hastalarda tedaviye başlamadan önce ve başladıktan sonra periyodik olarak karaciğer fonksiyon testlerinin yapılması önerilmektedir. Serum transaminaz seviyesi normalin üç katına çıkıyorsa ve bu seviyesini koruyorsa ilaç kesilmelidir. Yüksek miktarda alkol tüketen ve karaciğer hastalığı bulunan kişilerde dikkatle kullanılmalıdır.

## 2.7. Mezenkimal Kök Hücreler

Sunulan tez kapsamında doku iskeleleri ile birlikte kullanıldıklarından dolayı mezenkimal kök hücrelere ilişkin bilgilerin bu bölümde kısaca özetlenmesine gerek duyulmuştur. Mezenkimal kök hücreler başta kemik iliği olmak üzere, kemik dokusu, kas dokusu, yağ dokusu, karaciğer, kordon kanı gibi vücutta pek çok dokuda bulunurlar. Özellikle kemik iliği stromasının multipotansiyel öncül hücreler içerdiği bilinmektedir. Burada yer alan mezenkimal kök hücreler, uygun mikroçevrede osteosit, kondrosit, adiposit veya miyosit gibi farklı hücrelere ve kemik dokusu, kas dokusu ve kıkırdak dokusu gibi dokulara dönüşebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Mezenkimal kök hücrelerin bu dönüşüm ve farklılaşma potansiyelinin, doku kayıplarından kaynaklanan hastalıkların tedavisi için yeni bir alternatif olduğu düşünülmektedir. Kemik ve kıkırdak defektleri, kalp krizi, Parkinson hastalığı ve yanıklardan kaynaklanan doku kayıplarının tedavisinde mezenkimal kök hücre uygulamalarının sonuçları umut vericidir.

Mezenkimal kök hücrelerin bilinen potansiyel avantajları şunlardır: uygun doku kültüründe hızlı çoğalabildikleri için üretim kolaylığı sağlamaktadırlar, kemik iliğinin elde edilmesi göreceli olarak daha kolaydır, hücre yoğunluğu yaşla birlikte azalmakla birlikte, yaşlı bireylerde özellikle periosttan elde edilen hücreler yüksek metabolik etkinlik göstermektedirler, hem kemiğe hem de kıkırdağa dönüşebildikleri için osteokondral kayıpların onarımı için kullanılacak kompozit greftlerin yerine kullanılabilirler. Yapılan *in vivo* çalışmalarda bu hücrelerin defekt bölgesinde farklılaşabilmeleri için dışarıdan yönlendirmeye gereksinim duydukları gözlenmiştir. Mezenkimal kök hücreler ayrıca hasarlı dokularda o doku hücrelerine dönüşebilme yetenekleri yanında var olan rezerv hücrelerin fonksiyonlarını da artırabilmektedir. Hasarlı dokularda sınırlı sayıda canlı kalmış hücrelerin fonksiyonlarını düzenleyebilir, bu hücrelerin ömrünü uzatabilir, yeni damar oluşumuna imkan sağlayarak kan akımını artırır ve rejenerasyonu katkıda

bulunabilir, o bölgede inflamasyonu baskılayarak skar dokusu oluşumunu engelleyebilirler.

Mezenkimal kök hücreler yalnız doku kayıpları için kullanılmamakta, ayrıca kemik iliği nakilleri ve gen tedavisi alanlarında da değerlendirilmektedirler. Mezenkimal kök hücrelerinin kordon kanından saflaştırılması, hücre kültür ortamlarında çoğaltılması ve istenilen yönde farklılaştırılması için uygun tekniklerin geliştirilmesi günümüzde yapılan diğer çalışmalar arasındadır. Büyük bir tedavi potansiyeline sahip mezenkimal kök hücrelerin gen tedavilerinde başarıyla kullanılabilmesi halinde pek çok metabolik hastalığın tedavisine çözüm bulunacağına dair yaygın bir inanış vardır.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez kapsamında, ilk olarak kalay oktoat (Sigma, ABD) katalizörlüğünde düşük ve yüksek molekül ağırlıklarında poli( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) (Aldrich, Almanya) sentezlenmiştir. Sentezlenen PCL'lerden, çözücü olarak kloroform ve dimetilformamid (DMF) karışımı kullanılarak polimerik blendler hazırlanmış, söz konusu blendler elektro-eğirme yöntemi ile proses edilerek örgüsüz nanofiber yapıda mikro gözenekli membranlar elde edilmiştir.

Elde edilen membranların, molekül ağırlıkları GPC (Jel Geçirgenlik Kromatografisi), kimyasal ve yapısal analizleri FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi) ve  $^1\text{H-NMR}$  (Proton Nükleer Manyetik Rezonans), termal davranışları ise DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre) ile incelenmiş, yüzey morfolojileri ise SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu) kullanılarak gösterilmiştir. Membranların *in vitro* bozunma deneyleri, Ringer çözeltisi içinde vücut sıcaklığı olan  $37^\circ\text{C}$ 'da sürekli çalkalamalı sistemde molekül ağırlığı azalması izlenerek gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bir diğer çıktısı olarak, membranlara kemik oluşum hızını arttırması öngörülen simvastatin yüklenmiştir.

Elektro-eğirme ile hazırlanan membranlar dairesel olarak ("spiral winding") katlanarak üç boyutlu makro ve mikro kanallara sahip doku iskeleleri hazırlanmıştır. Tez kapsamında sunulan "kraniyum kemik defekti" modeline uygun olması için, doku iskelelerinin çapı 8 mm ve yüksekliği 1,5 mm olarak belirlenmiştir.

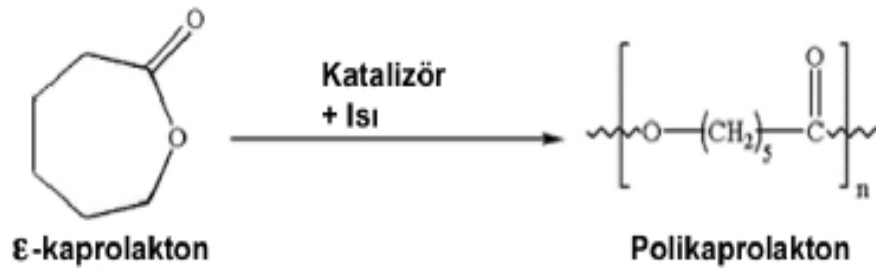
Hazırlanan doku iskeleleri ve simvastatin yüklü formları, durgun kültür koşullarında (petri kaplarında) hücre kültür ortamında test edilmiştir. Bu çalışmalarda fibroblast hücreler kullanılmış, doku iskelelerinde hücre tutunması ve çoğalması incelenmiştir.

Deneysel çalışmaların son aşamasında ise hazırlanan doku iskeleleri, simvastatin yüklü formları ve mezenkimal kök hücreleri ile birleştirilmiş formları denek hayvanlarında "kritik büyüklükteki kraniyum defektlerin" onarımına etkileri araştırılmıştır. Deney havyanı olarak sıçanlar seçilmiş, kraniyal bölgelerinde 8 mm çapındaki kritik büyüklükte defektler açılmış, doku iskeleleri implant olarak bu defektlere yerleştirilmiştir. Kemik iyileşmesi 6 ay süre ile mikroskopik ve histolojik

gözlemler ile izlenmiş, doku iskelelerinin simvastatin ve kök hücre içeren formları ile birlikte doku iyileşmesine etkileri değerlendirilmiştir.

### 3.1. Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) Sentezi

Polimer sentezi amacıyla  $\epsilon$ -kaprolakton ( $\epsilon$ -CL) (Aldrich, Almanya) monomeri, katalizör olarak kalay oktoat (Sigma, ABD) kullanılmıştır. ( $\epsilon$ -CL) monomeri kullanılmadan önce 24 saat boyunca kurutulmuştur. Yüksek (85 kDa) ve düşük (10 kDa) olmak üzere iki farklı molekül ağırlığında polimer sentezlenmiştir. Her iki molekül ağırlığı içinde  $\epsilon$ -kaprolakton polimerizasyonu, bir cam reaktörde (balonda) vakum altında azot atmosferinde 120°C sıcaklıkta ve 24 saat sürede etüv içerisinde gerçekleştirilmiştir. Düşük molekül ağırlığına sahip polimer için monomer/katalizör oranı: 1700/3 (mol/mol), yüksek molekül ağırlığına sahip polimer için monomer/katalizör oranı: 1700/1 olarak seçilmiştir. Polimerizasyon sonrası reaktör etüvden çıkarılarak oda sıcaklığında soğutulmuş, reaksiyona girmeyen monomerlerin uzaklaştırılması için sentezlenen polimerler kloroformda çözülüp, soğuk metanolde çöktürülmüştür. Elde edilen polimer vakum altında etüvde kurutulmuştur. Şekil 3.1'de  $\epsilon$ -kaprolakton polimerizasyon reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 3.1. Isı ve katalizör varlığında poli( $\epsilon$ -kaprolakton) polimerizasyon reaksiyonu

### 3.2. Elektro-eğirme Yöntemi

#### 3.2.1. Membran Hazırlanması

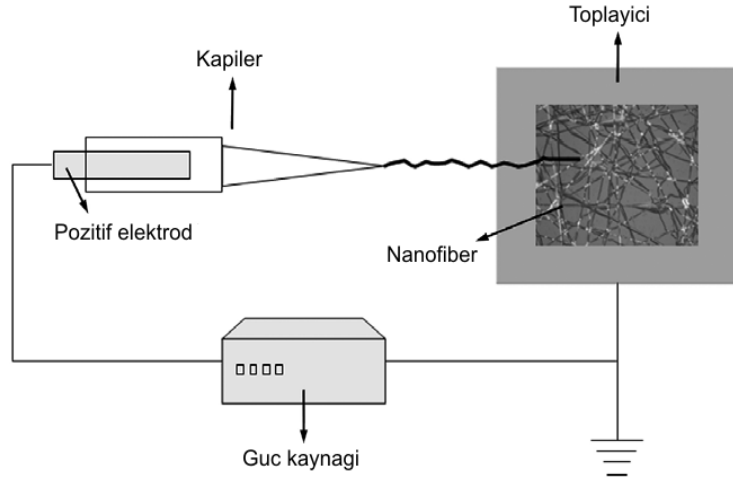
Kullanılan elektro-eğirme sistemi Şekil 3.2'de verilmiştir. Bu sistem Hacettepe Üniversitesi'nde bulunmaktadır ve deneyler bu sistemde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Elektro-eğirme deney düzeneği

Sistemde üç temel birimden oluşmaktadır. İlk birim, doğru akımla  $500 \mu\text{A}$  ve maksimum 50 kV gerilim elde edilen yüksek güç kaynağıdır. İkinci birim, polimer çözeltisinin bulunduğu ince bir tüptür. Tüpün ucu düzgün püskürmeyi sağlamak üzere dar olarak seçilmiştir. Tüpün içine sistemdeki elektrotlardan biri takılmıştır. Bu elektroda güç kaynağından yüksek gerilim uygulanır. Son birim ise toplayıcıdır. Sözü geçen birim metalden yapılmış, üzeri alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Toplayıcı birimi tüpün içine yerleştirilen elektrotun zıttı yüklü elektrot görevini üstlenir ve topraklanmıştır.

Gerilimin istenen ölçüde sisteme uygulanmasıyla polimer çözeltisi tüpün ucundan buhar jeti şeklinde zıt yüklü elektroda yani toplayıcıya doğru püskürür. Çözücünün yol boyunca buharlaşmasıyla katılan polimer toplayıcıya nanofiber şeklinde ulaşır ve membran oluşturacak şekilde birikir. Fiberler toplayıcı yüzeyinde birikirken birbirlerine dokundukları noktada yapışır ve bir film şeklinde örgüsüz fibröz bir yapı oluşturur. Elektro-eğirme yöntemi kullanılarak membran üretimini açıklayan şema Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Elektro-eğirme ile örgüsüz nanofiber yapıda membran eldesi

Tez kapsamındaki çalışmalarda kullanılmak üzere ortalama 1 mm kalınlığında membran üretimi için elektro-eğirme koşulları önceden yapılan çalışmalar esas alınarak belirlenmiştir. Elektro-eğirme çözeltisi, ağırlıkça % 80 düşük, %20 yüksek molekül ağırlığında ağırlığında 40 g/100 ml PCL içerecek şekilde kloroform ve dimetilformamid karışımında, DMF oranı hacimce %50 olacak şekilde hazırlanmıştır. Pipet ucu-toplayıcı arası uzaklık 15 cm, uygulanacak gerilim 15kV ve süre 45 dakika olarak seçilmiştir.

### 3.2.2. Membran Karakterizasyonu

#### 3.2.2.1. Kimyasal ve ısı karakterizasyon

Elektro-eğirme yöntemi ile üretilen membranların kimyasal yapısının belirlenmesi için "Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi" (FTIR, Shimadzu, DR 8101, Japonya) kullanılmış, FTIR spektrumları cihazın ATR ataçmanı kullanılarak oda sıcaklığında kaydedilmiştir. Membranlar çözülüp KBr ile karıştırıldıktan sonra her bir örnek için 40 tarama yapılmıştır.

Membranların kimyasal yapısının belirlenmesine yönelik diğer çalışmada "Nükleer Manyetik Rezonans" (NMR, Varian, Unity Inova) cihazı kullanılarak <sup>1</sup>H-NMR spektrumları kaydedilmiştir. Örnekler kloroformda çözülmüş (5 mg membran/1 ml kloroform) ve ölçümler 18°C'de sabit sıcaklıkta 500 MHz.'de yapılmıştır.

Membranların ısı analizleri için "Diferansiyel Taramalı Kalorimetre" (DSC), (NETZCH DSC 204, Almanya) kullanılmıştır. Bu amaçla 8-10 mg örnek, alüminyum kapsüle yerleştirilerek preslenmiştir. Örneklerin DSC termogramları 10°C/dk ısıtma hızında ve -80°C ile +130°C sıcaklık aralığında, 100 ml/dk akış hızıyla beslenen azot atmosferinde kaydedilmiştir.

Membranların molekül ağırlıkları ve heterojenlik indeksleri "Jel Geçirgenlik Kromatografisi" (GPC), (Shimadzu, Japonya) ile belirlenmiştir. Ölçümlerde çözücü ve taşıyıcı faz olarak kloroform (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Sistem sıcaklığı 25°C ve akış hızı 1 mL/dk olarak seçilmiştir. Buradan ağırlıkça ve sayıca ortalama molekül ağırlıkları ( $M_w$  ve  $M_n$ ) ve bunların oranıyla belirtilen molekül ağırlığı dağılımını gösteren heterojenlik indeksi HI ( $M_w/M_n$ ) değerleri bulunmuştur.

### **3.2.2.2. Mekanik karakterizasyon**

Hazırlanan filmlerin mekanik testlerinin yapılması amacıyla bir universal test cihazı (LLOYD Instruments, LRX Internal Extensometer, İngiltere) kullanılmıştır. Elektro-eğirme ile hazırlanan örgüsüz materyallerden 0.5x5 cm boyutunda dikdörtgen örnekler hazırlanmıştır. Testler oda sıcaklığında, 500 N kuvvetle ve 5 mm/dk sabit çekme hızıyla gerçekleştirilmiştir. Test boyunca çekme gerilimlerine karşı % uzama değerleri kaydedilmiştir. Kopma gerilimi (MPa), kopma uzaması (%) ve elastik modülü (MPa) değerleri bulunmuştur.

### **3.2.2.3. *in vitro* bozunma davranışı**

Membranların, *in vitro* bozunma davranışı Ringer çözeltisi içinde vücut sıcaklığı olan 37°C ve fizyolojik pH olan pH=7,4'de sabit çalkalama hızında sürekli çalkalamalı banyoda 3 ay boyunca incelenmiştir. Ringer çözeltisinin bileşimi şu şekildedir: 1 L distile su içerisinde 6 g NaCl, 0,4 g KCl, 2,6 g laktik asit, 0,27g CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O ve 1,1g NaOH. Bozunma çalışması 3 ay olarak planlanmış ve deney süresince 15 gün ara her bir membrandan örnekler alınmıştır. Alınan örneklerin GPC ile molekül ağırlıklarındaki ve heterojenlik indekslerindeki (HI) değişimler bulunmuş, elde edilen verilerin ortalaması alınmıştır.

### 3.3. Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Bölüm 3.2.1'de açıklanan elektro-eğirme yöntemi ile hazırlanan membranlar herhangi bir cihaz kullanılmadan çapları 8 mm olacak şekilde dairesel olarak katlanmış ve doku yapıştırıcısı (G.R.F., MICROVAL, Fransa) ile stabil hale getirilmiştir. 8 mm çapında stabil hale getirilen membranlardan, kraniyal defekt içerisine tam olarak yerleştirilebilmeleri için 1,5 mm kalınlığında mikro gözeneklere ve makro kanallara sahip üç boyutlu doku iskeleleri hazırlanmıştır. Hazırlanan doku iskeleleri, deney hayvanlarına implante edilmeden önce uygun torbalar içerisinde 37 °C sıcaklıkta 24 saat süresince etilen oksit ile steril edilmiştir. Daha sonra malzemeler, etilen oksitin uzaklaşması için 24 saat boyunca vakumlu etüvde bekletilmiştir.

### 3.4. Simvastatin Yükleme

Simvastatin için, içerisinde selüloz, hidroksipropil selüloz, hidroksipropil metil selüloz, demir oksit, laktoz, magnezyum stearat, talk ve titanyum dioksit ile 10 mg aktif madde içeren ticari bir ürün olan Zocor<sup>®</sup> (Merck Sharp&Dohme, ABD) kullanılmıştır. 100 mg simvastatin içeren tabletler 2.5 ml mutlak etanol ve 3.75 ml 0.1 M NaOH çözeltisi içerisinde 50°C sıcaklıkta 2 saatte çözünmüştür. Karışım oda sıcaklığına soğutulduktan sonra pH'ı 7.2 olacak şekilde ayarlanmış ve son hacim 25 ml olacak şekilde destile edilmiş su eklenmiştir.

Simvastatin iki protokol uygulanarak yüklenmiştir. İlk protokolda, Simvastatin içeren ilaç çözeltisi, elektro-eğirme öncesi hazırlanan polimer karışımı içerisine eklenmiş, homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştırılmıştır. Simvastatin içeren polimer çözeltisi daha sonra elektro-eğirme ile proses edilmiş ve membranlar hazırlanmıştır. Simvastatin molekülleri bu yöntemle nanofiberler arasına hapsedilmiş ve kontrollü, uzun süreli ve yavaş bir salım sistemi hazırlanmıştır. Aktif ajan yüklü membranlardan hazırlanan doku iskelelerinin her biri 20 µg simvastatin içermektedir.

İkinci protokol ise, yığın salıma ("burst release") uygun bir ilaç sistemi için simvastatin elektro-eğirme ile üretilen membranlardan hazırlanan doku iskeleleri üzerine damlatılmıştır. Doku iskeleleri mikro gözeneklere ve makro kanallara sahip

olduğundan tüm ilaç yapı tarafından kolayca emilmiştir. Yine her bir doku iskelesi üzerine 20 µg simvastatin (80 mg/kg) damlatılmıştır.

### **3.5. *in vitro* Hücre Kültür Çalışması**

*in vitro* hücre kültür çalışmasında, boş doku iskelesi grubu ve simvastatin yüklü doku iskelesi grupları hücre tutunması ve çoğalması bakımından incelenmiş, kontrol kiti ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Deneylerde trypan mavisini test kiti kullanılmıştır. Önceden UV ile steril edilen doku iskelelerine aşılana L929 fare fibroblast hücreleri ( $1 \times 10^4$ /doku iskelesi) DMEM-F12, 10% FBS ve 0.5% penisilin/streptomisin antibiyotik çözeltisi içeren petri kaplarına ekilmiş ve 37°C sıcaklıkta 5% CO<sub>2</sub> ortamında 7 gün boyunca inkübe edilmişlerdir.

### **3.6. Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Farklılaştırılması**

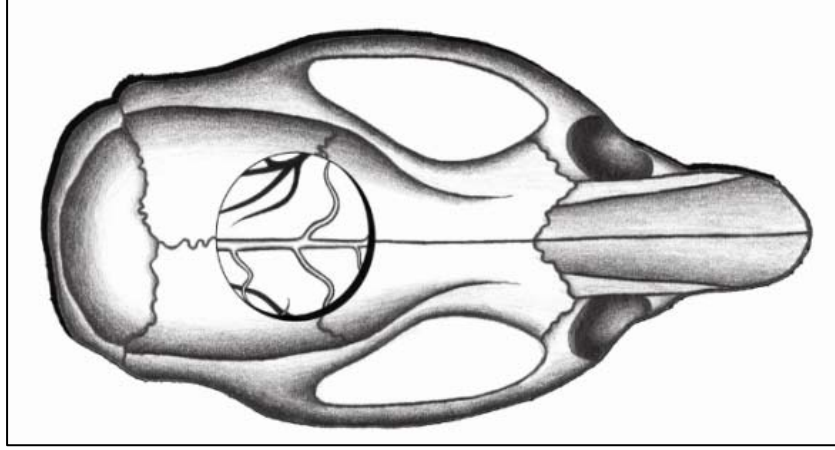
Kök hücresi izolasyonu için ilk olarak genel anestezi altındaki erkek sıçanların femur ve tibiası çıkartılmıştır. Femur ve tibia, %3 penisilin/streptomisin (Sigma, Almanya) bulunan DMEM-LG (Sigma, Almanya) içerisinde hücre kültür laboratuvarına getirilmiştir. Laminer akış kabini içerisinde femur ve tibia taşıma ortamı ile yıkanmıştır. Bu işlem 1500 rpm devirde 5 dakika boyunca 2 kez tekrarlanmıştır. Kültür ortamı 75 cm<sup>2</sup>'lik Petri kaplarıdır. Petri kaplarına,  $3 \times 10^5$  hücre/cm<sup>2</sup> yoğunlukta hücre kullanılmıştır. Hücreler, % 20 FBS (Fetal Sığır Serum) (Sigma, Almanya), %1 penisilin/streptomisin ve 2 mM glutamin (Sigma, Almanya) bulunan DMEM-LG içerisinde % 5 CO<sub>2</sub> ihtiva eden inkübatörde 37 °C sıcaklıkta kültür edilmiştir. 48 saat sonra, kültür kabına yapışmayan hücreler ortamdaki uzaklaştırılmış ve taze kültür ortamı ilave edilmiştir. Kültür ortamları 3-4 günlük arayla değiştirilmiştir. % 70-80 konflüent olan kültür kabındaki hücreler, % 0,25 Tripsin/EDTA (Sigma, Almanya) kullanılarak kaldırılmıştır. Trypan mavisini ile canlılık ve hücre sayısı hesaplanmıştır. Kültürlere pasaj 4'e kadar devam edilmiştir. Hücre sayımı yapılan hücreler % 10 DMSO (Fluka, Almanya) içeren kültür ortamı içerisinde  $1,5 \times 10^6$  hücre/ml yoğunluğunda dondurulmuş ve sıvı nitrojende saklanmıştır. Hücre pelleti üzerine  $1 \times 10^6/50$  µl olacak şekilde PBS konulmuştur. Hücreler insülin enjektörü içerisinde denek hayvanlara enjeksiyon için hazır hale getirilmiştir.

### 3.7. Hayvan Çalışmaları ve Cerrahi Protokol

Kemik defektinde gerçekleşen kemik iyileşmesi mevcut defektin büyüklüğüne bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Deneysel çalışmaların standardizasyonu ve birbirleri ile karşılaştırılmalarına olanak sağlamak amacıyla, literatürde farklı hayvan modelleri için ayrı ayrı belirlenmiş, kendiliğinden iyileşme şansı olmayan kemik defektleri kritik büyüklükte kemik defekti olarak tanımlanmaktadır. Literatürde sıçanlar için kritik büyüklükte kraniyal kemik defektleri 8 mm çapında, dairesel, tam kat kemik defekti olarak belirtilmiştir (Schmitz ve Hollinger, 1986).

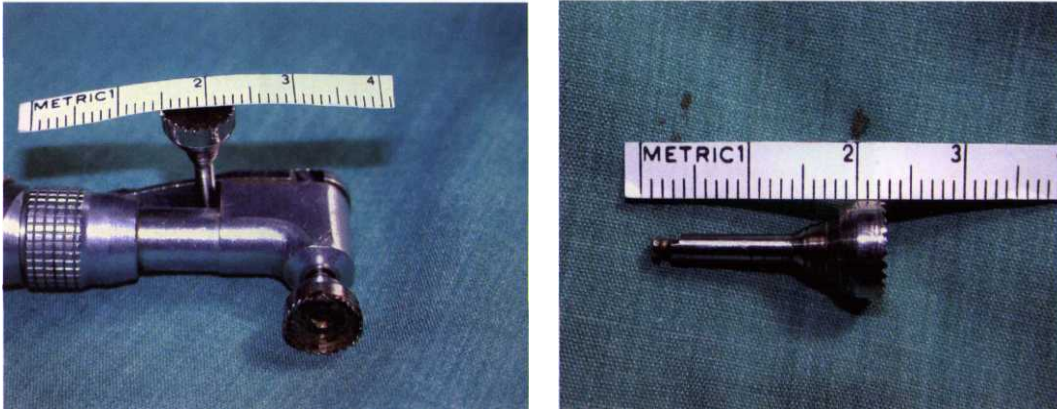
Hayvan çalışmaları iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada elektro-eğirme tekniği ile dairesel olarak katlanarak hazırlanmış doku iskeleleri, simvastatin yüklü doku iskeleleri ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışma için ağırlıkları 250 ila 300 gram arasında değişen 92 adet erkek Wistar Albino sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar 3 gruba ayrılmış (30x3), birinci grupta yalnız doku iskelesi (Grup B, doku iskelesi grubu), ikinci grupta elektro-eğirme ile simvastatin yüklenen doku iskeleleri (Grup C, kontrollü salım grubu), üçüncü gruba elektro-eğirme sonrası simvastatin damlatılan doku iskeleleri (Grup D, ani salım grubu) implante edilmiştir. Tüm bu gruplar, kritik büyüklükte açılan ve içerisine herhangi bir doku iskelesi implante edilmeyen kontrol grubu (Grup A) ile ayrıca karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu için 2 adet sıçan kullanılmıştır. İkinci aşama hayvan çalışmasında ise, 60 adet dişi Sprague Dawley sıçanı kullanılmıştır. Sıçanlar iki gruba ayrılmış (30x2), birinci gruba yalnızca mezenkimal kök hücre, ikinci gruba ise mezenkimal kök hücre içeren doku iskelesi (1x106/doku iskelesi) implante edilmiştir. Bu gruplar kendi aralarında ve ilk aşama hayvan deneylerinde kullanılan boş doku iskelesi grubu ile histolojik olarak değerlendirilmişlerdir.

Kemik defektleri, sıçan kalvariyal kemiklerinde frontal ve parietal kemikleri içine alacak şekilde, 8mm çapında oluşturulmuştur. Şekil 3.4'te şematik olarak kritik büyüklükte açılan kraniyal kemik defekti gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Kritik büyüklükte açılan kraniyal kemik defektinin şematik gösterimi

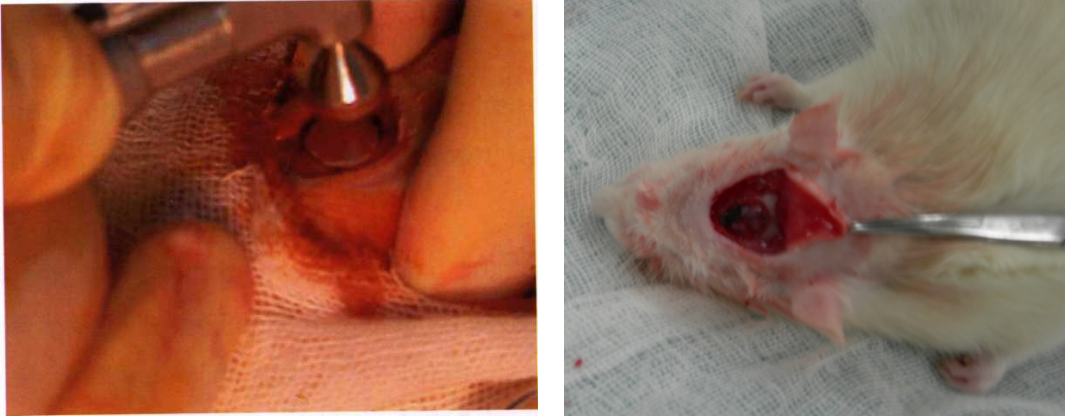
Kraniyal kemik defektlerinin standart çapta açılabilmesi için dıştan dışa çapı 8 mm olan döner testere özel olarak yaptırılmıştır. Sözü geçen testerenin bıçak kalınlığı 0.5 mm olup içi boş silindir şeklindedir ve proksimal kesimi açılı tura uygulanabilecek şekilde tasarlanmıştır. Bu kesici uç açılı tur ve spiral yardımı ile elektrikli asma motora takılarak kullanılmıştır. Bu uç ile kraniyal kemik kesildiğinde daire şekilli bikortikal kraniyal kemikler çıkarılmakta ve kraniyumda 8 mm çapında defekt oluşturulmaktadır. Kullanılan döner testere ve kesici ucu şekil 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Defekt oluşturmak için kullanılan döner testere ve ucu

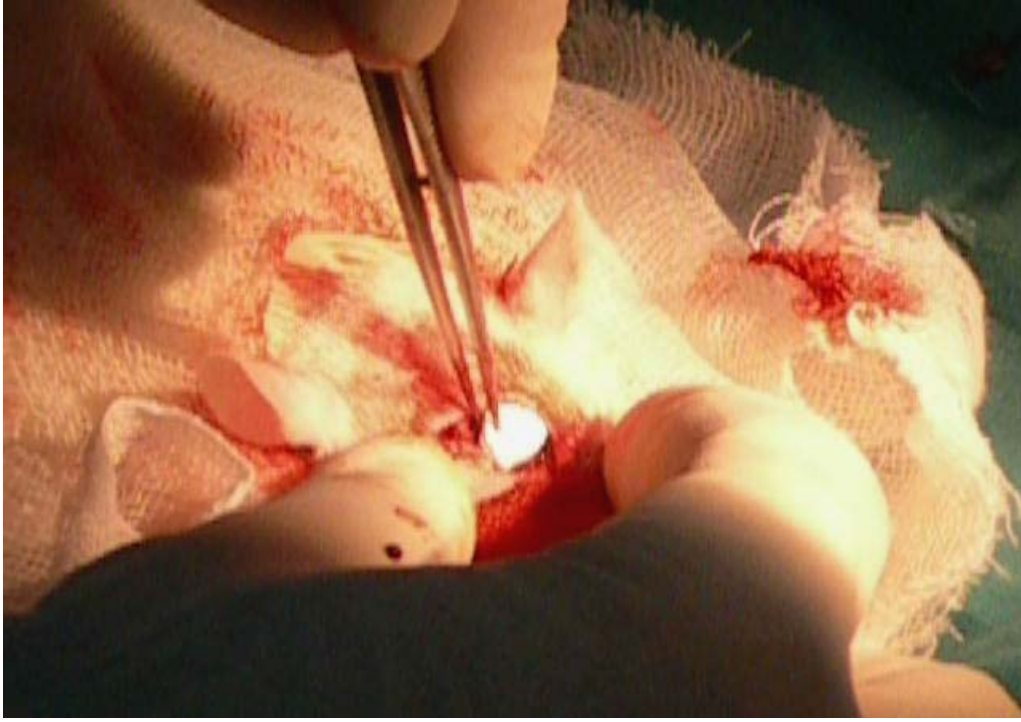
Bu çalışmadaki cerrahi işlemler, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları laboratuvarlarında gerçekleştirilmiş, çalışma için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 20/02/2007 tarih ve 2007/007 numaralı etik kurul onayı alınmıştır. Anestezi için, sıçanlara ketamin HCl (Parke Davis, 50

mg/ml, Tayvan) ve Rompun (% 2) (Bayer, Almanya) karışımı intraperitoneal olarak enjeksiyon yapılmıştır. İmplantasyon bölgesi tıraş edilmiş ve Batikon solüsyonu (% 10) (Droksan, Türkiye) ile dezenfekte edilmiş, tüm hayvanların ağırlıkları kaydedilmiştir. Tüm deneklerde sağ fronto-temporo-okcipital uzanımlı cilt insizyonu ile cilt ve cilt altı dokular geçilmiş, cilt flebi kaldırılmıştır. Temporal kas liflerinin başladığı hat boyunca kemik üzerinde periost kesilip hazırlanmıştır. Koronal suture ile sagittal suture'nün kesişim yeri merkez olacak şekilde kraniyum 8 mm çapında dairesel olarak kesilmiştir. Kesilen kısım dura üzerinden elevatör yardımıyla kaldırılmış, sagittal sinüs kanamaları okside edilerek hazırlanmış selüloz (Surgicel, Ethicon) konulup kompresyon uygulanarak kontrol altına alınmıştır. Şekil 3.6'da kraniyumun döner testere yardımıyla kesilmesi ve oluşturulan defekt gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Kraniyumda döner testere kullanılarak defektin oluşturulması

Tüm gruplarda kraniyal defektin üzeri periyost ve deri flebi kapatılmış, cilt insizyonu için 5-0 ipek dikiş kullanılmıştır. Çalışmalarda her bir grup için birinci, üçüncü ve altıncı aylarda hayatta kalan hayvanlar eter anestezi ile sakrifiye edilmiş ve kraniyal numuneler microCT ve histoloji çalışmaları için alınmıştır. Şekil 3.7, hazırlanan doku iskelelerinin defekt bölgesine yerleştirilmesini, Şekil 3.8 ise defekt oluşturulduktan sonra doku iskelesi üzerine mezenkimal kök hücrelerin enjekte edilmesi gösterilmektedir. Cerrahi işlem sonrasında sıçanlar uygun şekilde kafeslere yerleştirilmiş ve operasyon öncesinde olduğu gibi tüm deney boyunca 12 saat karanlık 12 saat aydınlık bir çevrim altında sabit sıcaklıkta tutulan odalarda bulunan kafeslerinde gözetim altında tutulmuşlardır.



Şekil 3.7. Doku iskelelerinin oluşturulan kraniyal defekte yerleştirilmesi



Şekil 3.8. Kök hücrelerin defekt alanına ve/veya doku iskelesi içerisine enjeksiyonu

### 3.9. MicroCT Analizleri

İlk grup hayvan çalışmasında, hayvanlar uygun cerrahi yöntemle sakrifiye edildikten sonra kemik örnekleri çıkarılmış ve fosfat tamponu içinde hazırlanmış, oda ısısındaki % 10'luk nötral formalin çözeltisine (pH 7.0) alınmıştır. Analizler, yeni kemik oluşumunun göstergesi olarak defekt alanı boyunca mineralize olmuş kemik matrisini belirlemek için x-ray mikro-bilgisayarlı tomografi ( $\mu$ -CT, Scanco Medical GmbH, İsviçre) cihazı kullanılarak 30 mikron çözünürlükte gerçekleştirilmiştir. Sözü geçen analiz ile defekt alanı ve onu çevreleyen kemiği kapsayan toplam kemik hacmi, defekt alanı içermeyen ve sadece çevreleyen eski kemiklere ait sonuç veren ikinci bir analiz uygulanmadan önce hesaplandı. Eski kemiği çevrelemesi için tüm örnek hacminden ayrılan hacim, defekt alanı boyunca gerçekleşen mineralizasyon sonuçlarını göstermektedir. Böylece, belli bir threshold kullanılarak belirlenmiş alan dışında kalanları dahil etmeden (örneğin; hava, polimer, PBS) standartlaştırma sağlanmaktadır. Yoğun mineralize matris yapı ve daha az yoğun osteoid benzeri yapının iyi bir gösterimi için, threshold 350 olarak seçilmiştir. Bu optimum threshold, görsel piksel uyumu ve histogram analizinin kombinasyonuna göre belirlenmiştir.

İkinci grup hayvan çalışması için gerçekleştirilen  $\mu$ -CT analizleri, kemik oluşumunun göstergesi olarak defekt alanı boyunca mineralize olmuş kemik matrisini belirlemek için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Anabilim Dalı'nda yerleşik x-ray mikro-bilgisayarlı tomografi ( $\mu$ -CT, Skyscan1174, Belçika) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan ön denemelerden elde edilen sonuçlara göre optimum tarama parametreleri bütün örnekler için; 40 kV ve 800  $\mu$ A gücündeki x-ışınları kaynağı ile 1 derecelik dönüş açısı ile 360 derece olarak belirlenmiştir. Taranan tüm değerler her bir tarama açısı kullanılarak iki taramanın ortalamasını alacak şekilde cihazla birlikte verilen "NRecon" adlı yazılımla iki boyutlu veriler şekline dönüştürülmüş, daha sonra bu veriler "CTAn" adlı programla 3 boyutlu görüntüler haline getirilmiştir. Hesaplamaların yapılması için defekt içerisindeki yeni kemik miktarı için optimum treshold olarak 25-250 seçilmiştir.

### 3.9. Histolojik Değerlendirme

$\mu$ -CT çalışmalarında kullanılan örnekler daha sonra 5 ile 10 gün arasında De Castro çözeltisinde (kloral hidrat, nitrik asit, distile su) dekalsifiye edilmiştir. Fosfat tamponuna aktarılan örnekler dereceli alkollerden geçirilerek rutin yöntemle parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan kızaklı mikrotomda (Leica, Almanya) 5  $\mu$ m kalınlığında seri kesitler alınmıştır. Kesitler, Hematoksilen eozin ve Masson trikrom (Sigma, Almanya) yöntemleriyle boyandıktan sonra defekt onarımı, yeni kemik oluşumu ve biyomalzemeye doku yanıtı açısından Leica DMR model (Avusturya) ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir. Görüntüler Leica DC500 dijital kamera ile bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Kantitatif analiz kemik greftine ait seri kesitlerde bilgisayar destekli Leica Qwin Plus görüntü analiz sistemi kullanılarak literatürdeki yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Kantitatif olarak Masson trikrom ile boyalı kesitlerde defekt bölgesindeki yeşil boyalı yeni oluşmuş kemik alanı hesaplanmıştır. Bu amaçla seri kesilen her bloktan elde edilen her 20 kesitten rastgele 2 kesit kantitatif olarak incelenerek gözlemlerin ortalaması esas alınmıştır. Defekt iyileşmesi ve doku iskelelerine doku yanıtı semi kantitatif bir skorlama sistemi kullanılarak ayrıntılı olarak puanlanmıştır. Skorlama sistemi Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Histolojik analiz için kullanılan semi kantitatif skorlama yöntemi

Kategori 1	Parametreler	Skorlar			
		3	2	1	0
Kemik defekt onarımı	Defektte yeni kemik oluşumu	Defektte tam kemik oluşumu	Orta kemik oluşumu (> %50)	Az kemik oluşumu (< %50)	Yeni kemik yok
	Greft resorpsiyonu	Tam resorpsiyon	Orta resorpsiyon (> %50)	Az resorpsiyon (< %50)	Resorpsiyon yok
	İlik değişimleri	Yetişkin tip yağlı ilik	> %50 yeni dokuyla yer değiştirmiş	< %50 yeni dokuyla yer değiştirmiş	Fibröz doku ya da kırmızı
	Korteks, yeniden yapılanma	Tamamen yeniden yapılanan korteks	Orta yeniden yapılanma (> %50)	Az yeniden yapılanma (< %50)	Yeniden yapılanma yok

Kategori 2	Parametreler	4	3	2	1	0
Doku cevabı	Fibröz bağ dokusu oluşumu	Yoğun kolojenöz bağ dokusunun implant çevresinde çok fazla birikmesi	Normal doku yapısında kesinti ve orta derecede yoğun fibröz bağ dokusu varlığı	Orta büyüklükte bağ dokusu varlığı	Kırılgan mil şeklinde hücrelerin ya da hafif fibroplazi varlığı	Normal kontrol dokusundan farklılık yok, implant bölgesinde bağ dokusu yok
	Enflamatuvar hücresel infiltrasyon	Bölgede veya etrafında implant ya da nekroz dokuya ciddi infiltrat cevabı	Çok sayıda lenfosit, makrofaj ve yabancı cisim dev hücreleri, aynı zamanda makul miktarda eozinofiller ve nötrofillerin varlığı	Birkaç yabancı cisim dev hücreleri ve küçük bir nötrofil odağı ile birlikte çeşitli lenfositler ve makrofajların varlığı	Yabancı cisim dev hücreleri, eozinofil ya da nötrofiller olmaksızın az sayıda lenfosit veya makrofaj varlığı	Normal kontrol dokusuyla aynı, implant bölgesinde makrofaj, yabancı cisim hücreleri, lenfositler, eozinofiller ya da nötrofiller yok

### 3.10. İstatistiksel Yöntemler

İstatistiksel değerlendirme Hacettepe Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda "SPSS for Windows" adlı istatistik programı kullanılarak yapıldı. Hesaplamalarda bağımsız değişkenler zaman ve gruplar kabul edilirken, bağımlı değişkenler histoloji ve microCT verileri olarak alınmıştır. Gruplardaki histoloji ve microCT bulgularının dağılımı, normal dağılıma uygunluk gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testiyle değerlendirilmiştir. Çalışmanın normal dağılım gösterdiği belirlendiği için yeni kemik miktarı parametrik varyans analizi testleriyle (tek yönlü ANOVA ve Tukey testi) analiz edilmiştir. Normal dağılım göstermeyen doku yanıtı ve kemik iyileşmesi parametrik olmayan testlerle analiz edilmiştir. Bunun için gruplar arasındaki farklılık Kruskal Wallis; farklılık önemli bulunduğu ikili karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmesi kullanılarak Mann Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir. Düzeltmeye göre Mann Whitney U testi ile iki grup arasında fark olduğunu 0.05 düzeyinde söyleyebilmek için p değerinin 0.017'den küçük olması gerekmektedir. Tanımsal istatistikler (ortalama, minimum, maksimum, standart sapma) çizelge haline getirilmiştir. Histoloji verileri parametrik varyans analizi testleriyle (tek yönlü ANOVA ve Tukey testi) analiz edilmiştir.

#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda elde edilen sonuçlar yer almaktadır. Çalışmalarda ilk olarak, yüksek ve düşük molekül ağırlıklı Poli( $\epsilon$ -kapralakton) sentezlenmiş, sentezlenen polimerlerden blendler hazırlanmış ve bu blendlerden elektro-eğirme yöntemi ile örgüsüz nanofiber yapıda membranlar üretilmiştir. Membranların kimyasal ve ısı özellikleri çeşitli tekniklerle incelenmiş, molekül ağırlıkları ve *in vitro* bozunma deneylerinde molekül ağırlıklarındaki değişim hesaplanmıştır. Elektro-eğirilmiş mikro gözenekli membranlardan daha sonra dairesel olarak katlama yöntemi ile makro kanallara sahip 8 mm çapında ve 1,5 mm yüksekliğinde üç boyutlu biyobozunur doku iskeleleri hazırlanmıştır. Hazırlanan membranlara ve bu membranlardan üretilen doku iskelelerine simvastatin yüklenmiş, iki farklı salım rejimine sahip (kontrollü salım ve ani salım) biyomalzemeler elde edilmiştir. Sözü geçen doku iskeleleri ve bunların simvastatin yüklü formları, hücre tutunması ve çoğalması açısından değerlendirilmek üzere *in vitro* hücre kültür çalışmasında incelenmiştir.

Çalışmanın son bölümünde, iki aşamalı hayvan çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Birinci aşama hayvan çalışmasında, doku iskeleleri ve bunların simvastatin yüklenmiş formları, denek hayvanı olarak seçilen sıçanların kraniyal bölgelerinde oluşturulan kritik büyüklükteki kemik defektlerinin tedavisine etkilerinin gösterilmesine yönelik olarak 6 ay süre ile denenmiştir. Gerçekleştirilen ikinci aşama hayvan çalışmasında yine aynı hayvan modeli kullanılmış, oluşturulan kritik büyüklükteki kraniyal defektlere, doku iskeleleri ve bunların mezenkimal kök hücre içeren formları ayrı ayrı yerleştirilmişlerdir. Hayvan çalışmalarında iki adet kontrol grubu belirlenmiştir. İlk kontrol grubu, açılan kritik büyüklükteki defekte herhangi bir doku iskelesi ya da kök hücre yerleştirilmeden insizyon yapılarak kapatılan ve dokunun kendi kendini yenileme performansının incelenmesine yönelik defekt bölgesi boş bırakılan gruptur. Diğer kontrol grubunda ise, defekt bölgesine insizyon sonrası mezenkimal kök hücreleri tek başlarına enjekte edilmiştir. Çalışmada her gruptan 1, 3 ve 6. aylarda hayvanlar sakrifiye edilmiş, alınan örnekler fikse edilip,  $\mu$ CT analizleri yapılmış ve istatistik programları yardımıyla histolojik olarak değerlendirilmiştir.

#### 4.1. Elektro-eğrilmiş Membranların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Polimer çözeltilerinden elektro-eğirme ile nanofiber üretiminde; çözeltilerin iletkenliği, viskozitesi, dielektrik sabiti ve yüzey gerilimi, yapının kimyasal ve fiziksel özelliklerini doğrudan etkileyen en temel parametrelerdir. Bu parametreler göz önünde bulundurularak optimum elektro-eğirme koşullarının belirlenmesi için, sunulan bu çalışmada öncelikle sentezlenen yüksek (85 kDa) ve düşük (15 kDa) molekül ağırlıklı PCL'lerden ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Polimer-çözücü ilişkisi, istenilen özelliklerde sahip yapılar üretmek için önemli bir parametredir. Yüzey morfolojisi, yüzey enerjisi ve su temas açısı gibi hücre-polimer etkileşimine katkıda bulunan birçok özelliğin, kullanılan çözücüye göre değiştiği bilinmektedir (Tang et al., 2004). Bu bilgiye dayanarak gerçekleştirilen ön çalışmalarda önce sentezlenen polimerler için uygun çözücüler araştırılmış, PCL için en uygun çözücü olarak kloroform belirlenmiştir. Ancak tek başına kloroform kullanılarak düzgün fiber oluşumu sağlanamamıştır. Bunun için çözelti karışımına elektrik alanın kontrolünü sağladığı çözeltilerin viskozitesini düşürdüğü, dielektrik sabitini arttırdığı literatürde gösterilmiş olan dimetilformamid (DMF) ilavesine karar verilmiştir (Bölgen et al., 2005). Viskozitenin artmasının polimer çözeltilerinin bulunduğu kapiler tüpte sıklıkla tıkanmalara yol açtığı ve sürekli bir jet oluşumunu engellediği gözlenmiştir. Polimer çözeltilerinin viskozitesinin düşük olmasının ise kapiler tüpten çıkan çözücünün toplayıcıya ulaşana kadar buharlaşmamasına ve toplayıcı yüzeyinde fiberler yerine damlacıkların oluşmasına yol açtığı görülmüştür. Elektro-eğirme yönteminin başlıca sorunlardan biri olan boncuk oluşumunun düşük viskozitelerde arttığı gözlenmiştir. Viskozite yükseltilerek boncuk oluşumu tamamen ortadan kaldırılabilir. Çözelti özellikleri yanında sisteme uygulanan gerilim ve kapiler tüp ile toplayıcı arasındaki uzaklığın da fiber çapını etkilediği görülmüştür (Fong et al., 1999, Bölgen, 2005).

Grubumuzca gerçekleştirilen önceki bir çalışmada, elektro-eğirme yöntemi ile biyobozunur PCL membranları hazırlanmış, *in vitro* ve *in vivo* olarak karakterize edilmiş ve bu membranların antibiyotik yüklü formları tavşanlarda karın boşluğuna yapışmayı önleyici biyomalzeme olarak denenmiştir (Bölgen et al., 2007). Hazırlanan elektro-eğrilmiş PCL membranlar hayvanlara implante edildiğinde, çok yüksek gözenekliliğe sahip nanofiber yapılarından dolayı bozunma ajanlarının

kolaylıkla yapının içine gireceği ve bozunma hızını önemli derecede arttıracığı öngörülmüştür. Ancak bozunma beklenenden daha düşük olmuştur. Özetlenen çalışmada olduğu gibi doku mühendisliği ile ilgili literatürdeki benzer çalışmalarda doku iskelelerinin bozunma davranışlarının beklenenden farklı olması karşılaşılan en temel problemlerden bir tanesi olarak belirlenmiştir.

Bozunma probleminin çözümüne yönelik olarak, sentezlenen düşük ve yüksek ağırlıklı polimerler farklı oranlarda karıştırılarak blendler hazırlanmış ve elektro-eğirme ile ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Yapılan ön denemelerden, doku iskelesi üretimine uygun mekanik dayanıma sahip membran üretimi için mümkün olan en yüksek oranda düşük molekül ağırlıklı PCL içeren blendin, ağırlıkça %80 düşük ve %20 yüksek molekül ağırlıklı PCL içeren blend olduğu belirlenmiştir. Düşük molekül ağırlıklı PCL'in bozunma süresini kısaltacağı, yüksek molekül ağırlıklı PCL'in mekanik dayanımı arttıracığı ve proses edilebilirliği kolaylaştıracağı öngörülmüştür.

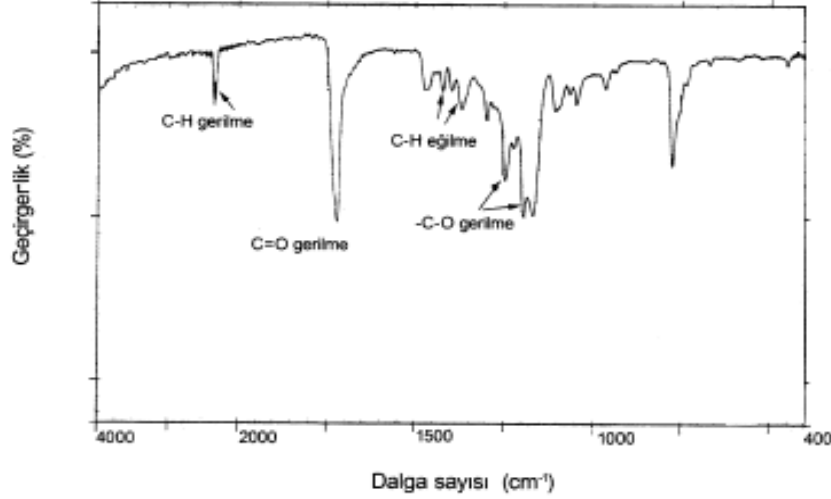
Diğer taraftan, ön çalışmaların alınan sonuçlara göre, 1 mm kalınlığında örgüsüz nanofiber yapıda membran üretimi için optimum elektro-eğirme koşulları şu şekilde belirlenmiştir; polimer derişimi: ağırlıkça %40 (40 g/100 ml PCL); pipet ucu-toplayıcı arası uzaklık: 15 cm; uygulanacak gerilim: 15kV ve süre: 45 dakika. Şekil 4.1'de hazırlanan membranların görüntüleri sunulmuştur.



Şekil 4.1. Elektro-eğirme yöntemi ile hazırlanmış PCL membranlar

#### 4.1.1. FTIR Analizleri

Tez kapsamında elektro-eğirme yöntemi ile üretilen membran alınan örneklerin FTIR spektrumu çekilmiş ve Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Membranlara ait FTIR spekturumu

Çizelge 4.1'de PCL spektrumunda yer alan karakteristik pikler sunulmuştur. 2865-2359  $\text{cm}^{-1}$  arasında CH gerilimi gösterilmiştir.  $\text{-C=O}$  ester karbonil grubundaki gerilim nedeniyle 1733-1725  $\text{cm}^{-1}$  arasında geniş bir pik gözlenmiştir.  $\text{-CH}_3$  grubundaki büküm nedeniyle ise 1383-1360  $\text{cm}^{-1}$  civarında pik gözlenmiştir. Polimer zincirindeki asimetrik  $\text{-C-O-C-}$  gerilimi ve  $\text{-C-O-}$  gerilimi sebebiyle ise 1245-1211  $\text{cm}^{-1}$  ve 1193-1182  $\text{cm}^{-1}$  civarında pikler belirlenmiştir.

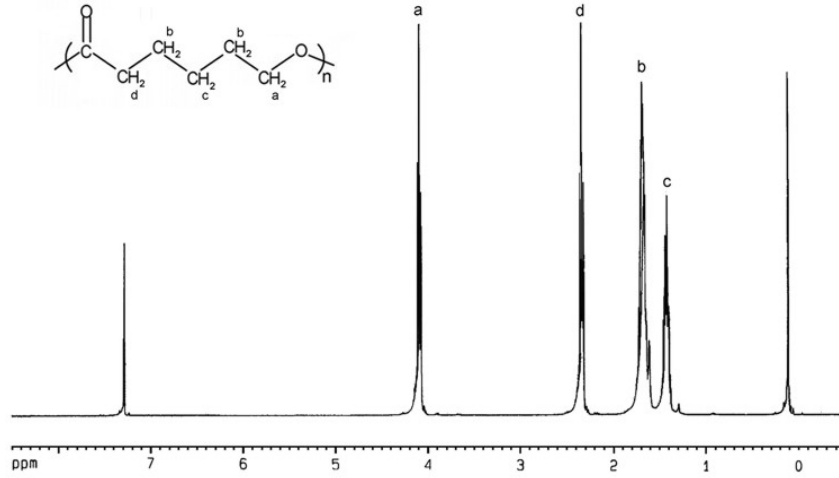
Çizelge 4.1. PCL için FTIR spektrumundaki karakteristik pikler.

Dalga sayısı ( $\text{cm}^{-1}$ )	Karakteristik pik
2865-2359	CH gerilimi
1733-1725	C=O gerilimi
1456-1454	$\text{CH}_2$ grup bükülümü
1383 -1360	$\text{CH}_3$ grup bükülümü
1245-1211	Asimetrik $\text{-C-O-C-}$ gerilimi
1193-1182	C -O gerilimi

İlgili karakteristik pikler literatürde yer alan spektrumlardaki piklerle uyumludur (Han ve ark, 2009). Elektro-eğirme yöntemiyle üretilen membranlar için elde edilen spektrumlarda, literatürde PCL için rapor edilmiş pikler arasında çok az da olsa kaymalar gözlenmiştir. Bu kaymaların örneklerin hazırlanması ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Bölgen et al., 2005).

#### 4.1.2. NMR Analizleri

Tez kapsamında elektro-eğirme yöntemi ile hazırlanan membranların  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu çekilmiş ve örnek spektrum Şekil 4.3'de sunulmuştur. Kaprolakton monomerinde farklı pozisyonlarda yer alan H atomlarına ait karakteristik pikler, 4-4.2 (a), 1.4-1.7 (b), 1.2-1.4 (c) ve 2.2-2.4 (d) ppm'de gösterilmiş, ilgili literatürle yayınlanan değerlerle benzerlik göstermektedir (Quian et al., 2000). Ayrıca, elektro-eğirme işleminin polimer yapılarında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görülmektedir.

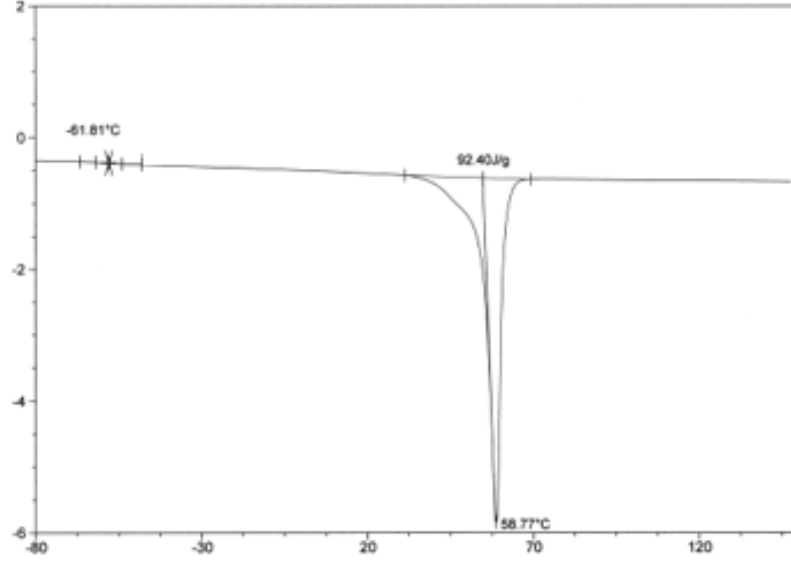


Şekil 4.3. Membranlara ait  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu

#### 4.1.3. DSC Termogramı

Membranların ısıl geçişleri temsil eden camcı geçiş sıcaklığını ( $T_g$ ) ve erime sıcaklığını ( $T_m$ ) sayısal olarak göstermek için DSC termogramları çekilmiş ve elde edilen tipik termogram Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Elektro-eğirme yöntemi ile üretilen membranların camcı geçiş sıcaklığı ( $T_g$ )  $-61,81\text{ }^\circ\text{C}$  ve erime sıcaklığı ( $T_m$ )  $-58,77\text{ }^\circ\text{C}$  olarak bulunmuştur. Literatürle karşılaştırıldığında, elektro-eğirme sonrası camcı geçiş sıcaklığı aynı kalırken, erime sıcaklığının biraz azaldığı

gözlenmiştir. Bu durum elektro-eğirme prosesi sonucu PCL kristalizasyonunun azalması olarak açıklanabilir (Bölgen et al., 2005).



Şekil 4.4. Membranlara ait DSC termogramları

#### 4.1.4. GPC Analizleri

Sentezlenen düşük ve yüksek molekül ağırlığına sahip PCL homopolimerlerinin ve bunların elektro-eğirme sonrası membran formlarının sayıca ve ağırlıkça molekül ağırlıkları ( $M_w$  ve  $M_n$ ) ve molekül ağırlığı dağılımları (heterojenlik indeksleri, HI:  $M_w/M_n$ ) GPC ile kaydedilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.2'de sunulmuştur.

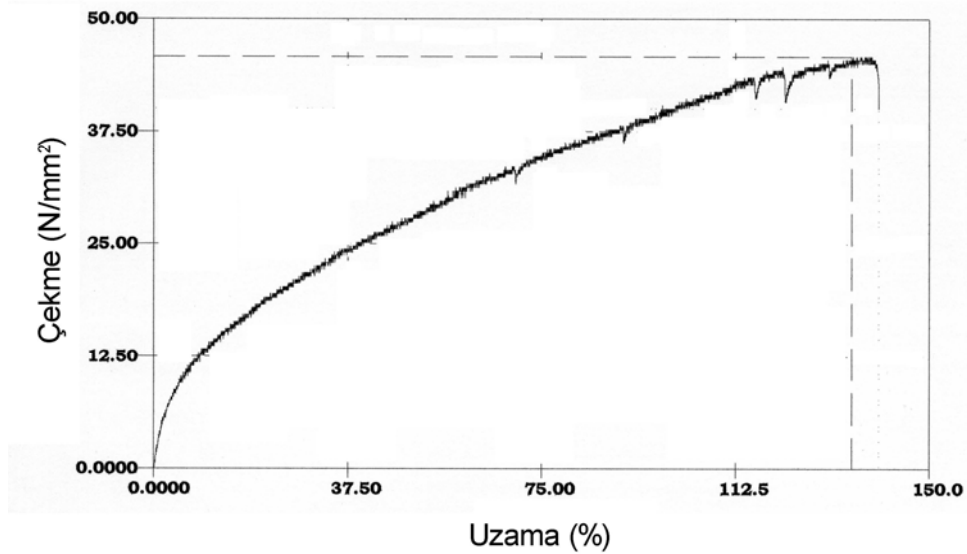
Çizelge 4.2. PCL molekül ağırlığı verileri

PCL	$M_w$	$M_n$	HI
<i>Sentezlenen</i>			
Düşük Molekül Ağırlıklı	14321	6715	2,13
Yüksek Molekül Ağırlıklı	84387	51172	1,64
<i>Elektro-eğrilmiş Membran</i>			
Düşük Molekül Ağırlıklı	14056	6238	2,11
Yüksek Molekül Ağırlıklı	83983	50873	1,63

Çizelgeden açıkça görüldüğü gibi elektro-eğirme işlemi polimerlerin molekül ağırlığı değişimine neden olmadığı ve bu sonuçların ilgili literatür ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

#### 4.1.5. Mekanik Testler

Membranlar önceki bölümlerde belirtildiği gibi belli büyüklükte dikdörtgen olarak kesilmiş ve universal test cihazında çekme-uzama testi uygulanmıştır. Testten elde edilen tipik bir grafik Şekil 4.5’de verilmiştir. Grafikte, y-ekseninde gerilim değerleri, x-ekseninde ise yüzde uzama değerleri bulunmaktadır. Grafikteki eğrinin başlangıç anından çizilen teğetin eğiminden elastik modülü (“Young” modülü) (MPa) hesaplanmıştır. Eğrinin sonlandığı noktanın y-ekseni kestiği yerden kopma gerilimi (MPa) ve x-eksenini kestiği yerden kopmada uzama (%) değerleri bulunmuştur (Bölgem et al., 2005).

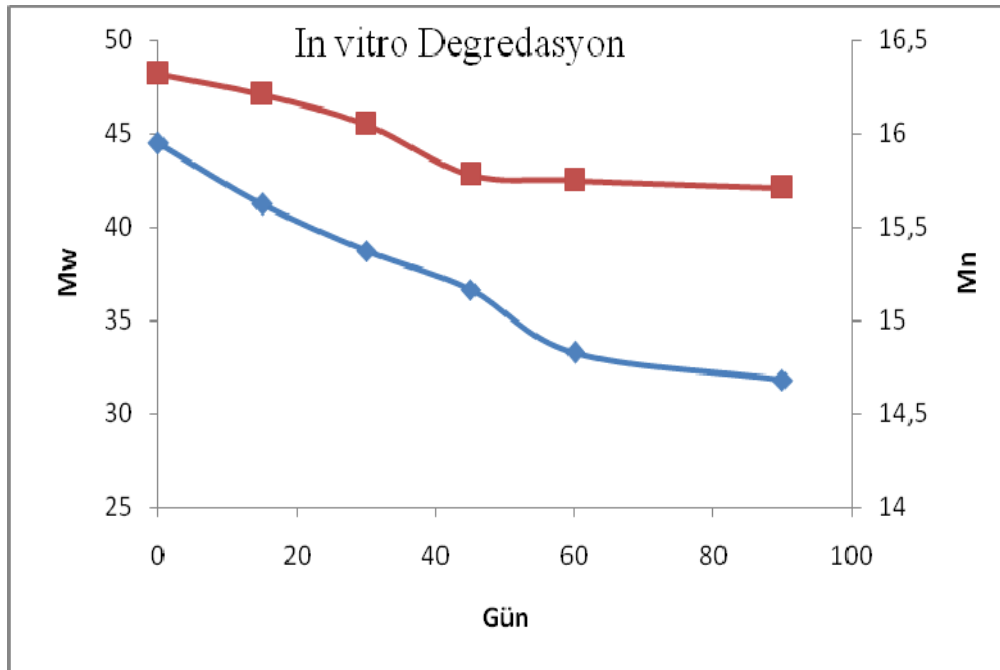


Şekil 4.5. PCL'e ait çekme-uzama grafiği

Polimer konsantrasyonunun artmasıyla oluşan nanofiberlerin ortalama çapları artmaktadır. Nanofiberlerin çaplarının artmasına paralel olarak bu fiberlerden oluşan membranın da mekanik dayanımı artmaktadır. Ağırlıkça %40'lık polimer çözeltisinden elektro-eğirme prosesi sonucu elde edilen ortalama 0.597  $\mu\text{m}$  çapa sahip fiberlerden oluşan membranın kopma gerilimi 47,13 MPa, elastik modülü 4,1 MPa ve kopma uzaması ise %142 olarak bulunmuştur.

#### 4.1.6. *in vitro* Bozunma Davranışı

Hazırlanan membranlar, sabit çalkalama hızında sürekli çalışan banyoda Ringer çözeltisi içerisinde 37 °C sıcaklıkta ve 7.4 pH değerinde 3 ay boyunca *in vitro* olarak bozunmaya bırakılmıştır. Şekiller 4.6'da membranların ağırlıkça ve sayıca molekül ağırlığı değişimlerini gösterir grafik sunulmuştur. İlgili grafikten görüldüğü gibi, membranların hem ağırlıkça ( $M_w$ ) ve hem de sayıca ( $M_n$ ) ortalama molekül ağırlıklarında düzgün bir azalma olmuştur. İlk ay sonunda polimerin molekül ağırlıkları  $M_n= 16,32$  kDa ve  $M_w=44,47$  kDa değerlerinden, 3. ayın sonunda  $M_n= 15,71$  kDa ve  $M_w= 31,83$  kDa değerlerine gerilemiştir. İlk ay için heterojenlik indeksi (HI) 2,67 iken, 3. ay sonunda 2,01'a inmiştir. Çizelge 4.3'de ise elektro-eğirme yöntemi ile hazırlanmış membranın molekül ağırlıkları ve heterojenlik indeksinin *in vitro* bozunma davranışlarının zamanla değişimi gösterilmiştir.



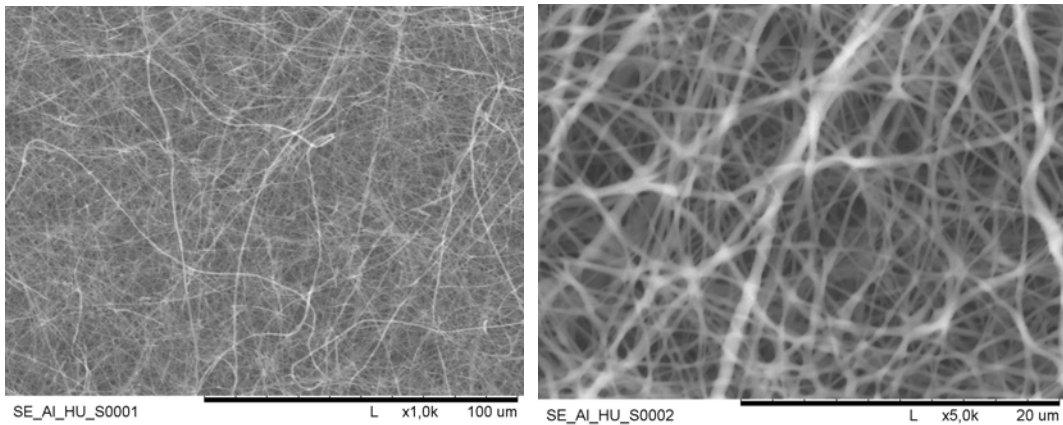
Şekil 4.6. Membranların 3 aylık *in vitro* bozunma davranışı

Çizelge 4.3. Membranın molekül ağırlıkları ve heterojenlik indeksinin *in vitro* bozunma davranışlarının zamanla değişimi

Süre (Gün)	Ağırlıkça ortalama (Mw)	Sayıca ortalama (Mn)	Heterojenlik indeksi (HI)
0	44,47	16,32	2,72
15	41,21	16,21	2,47
30	38,74	16,05	2,41
45	36,67	15,78	2,32
60	33,28	15,75	2,22
90	31,83	15,71	2,01

#### 4.1.7. SEM Analizi

Elektro-eğirme yöntemi ile hazırlanmış örgüsüz nanofiber yapıda membranların SEM analizi ile ortalama fiber çapı ve ortalama gözeneklilik boyutu dağılımı "Image J" (ABD) programı ile belirlenmiş ve çizelge 4.4'de standart sapmaları ile birlikte sunulmuştur. Şekil 4.7'da ise üretilen membranların 1000 ve 5000 büyütmede SEM fotoğrafları verilmiştir.



Şekil 4.7. Membranların 1000 ve 5000 büyütmede SEM görüntüleri

Çizelge 4.4. Membranların ortalama fiber ve ortalama gözenek boyutu dağılımı

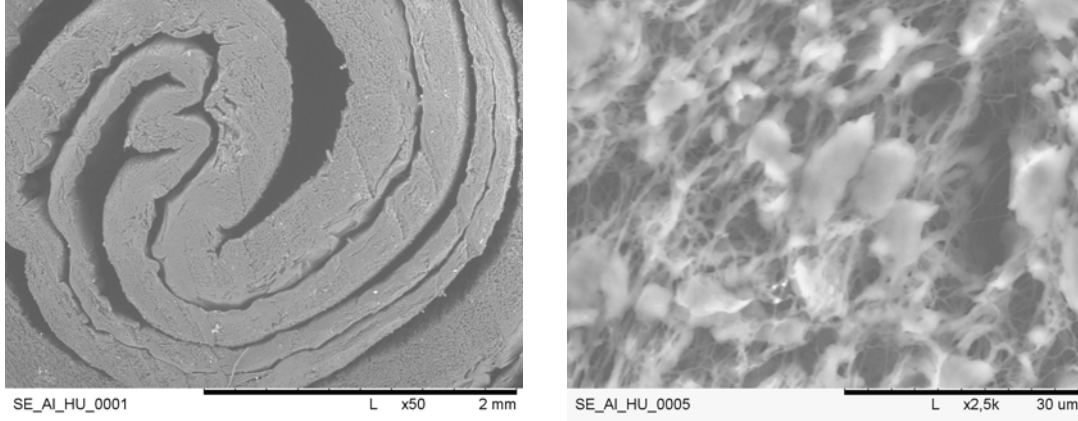
Ortalama fiber çapı (nm)	Ortalama gözenek boyutu (nm)
517±198	1076±494

#### 4.2. Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Simvastatin Yüklenmesi

Kemik doku mühendisliğinde kullanılacak doku iskelesinin genel olarak biyobozunur olması ve uygulama alanındaki dokunun mekanik özelliklerine benzer özellikler taşıması gerekmektedir (Hutmacher, 2000). Doku iskelesi yapay bir hücre dışı matris (ECM) olarak tanımlanabilir. Geniş çaplı bir doku hasarında, hasarlı bölgeye yalnızca hücrelerin yerleştirilerek hasarın giderilmesi mümkün değildir. Bu nedenle yapay bir ECM oluşturarak hücreler ve biyosinyal molekülleri ile birlikte bu bölgeye yerleştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle üç boyutlu doku iskelelerinin diğer bir önemli gereksinimi ise hücre yapışması, üremesi, farklılaşması ve göçüne olanak sağlayacak yüksek gözenekliliğe ve gözenekler arası bağlantılara sahip olmasıdır (Ranucci, 2000; Cowan, 2005; Borenstein, 2007; Moroni, 2008). Gözenekli yapı aynı zamanda besin maddelerinin ve bozunma ajanlarının yapıların merkezine kadar ulaşmasına, gazların ve atıkların ise uzaklaştırılmasına olanak sağlar. Doku iskelesi-hücre etkileşimini istenilen düzeyde tutmak için polimerik malzemenin yüzey ve yığın özellikleri modifiye edilmeye çalışılmaktadır (Zhang ve Ma, 1999; Shi ve Ratner, 2000). Gözenekli üç boyutlu doku iskelelerinde ise yüzey sadece iskelenin dış bölgesi değil, üç boyutlu iç kısmını da içermektedir. Doku mühendisliği uygulamaları için biyolojik olarak aktif moleküller içeren üç boyutlu doku iskeleleri geliştirilmiştir (Whang et al., 2000; Lee et al., 2002).

İdeal özelliklere sahip üç boyutlu biyobozunur doku iskelesi elde etmek için çalışmanın bu bölümünde yüksek molekül ağırlığında ve düşük molekül ağırlığında PCL blendlerden elektro-eğirme yöntemi ile hazırlanan membranlar, basit fakat orijinal bir yaklaşımla dairesel olarak elle katlanmış, daha sonra 8 mm çapında ve 1,5 mm kalınlığında kesilerek doku iskeleleri hazırlanmıştır. Hazırlanan doku iskelesine ait SEM görüntüleri şekil 4.8'te sunulmuştur. Şekilden de görüldüğü gibi,

doku iskelesi mikro ve nano yapısının yanında makro kanallara sahiptir. Bu kanalların, 200 ila 400 mikron büyüklüğündeki kemik hücrelerinin doğal ECM'sinin taklit etmesi, zaman ilerledikçe doku iskelesinin bozunmasıyla hücrelerin içeriye doğru ilerleyerek yeni kemik dokusunu oluşturması hedeflenmiştir.



Şekil 4.8. Mikro gözeneklere ve makro kanallara sahip doku iskelesinin 50 ve 2500 büyütmede SEM görüntüleri

Kemik oluşumu ve kırık iyileşmesi birçok büyüme faktörü ve hormon birlikte rol aldığı biyo-aktif moleküller tarafından kontrol edilen karmaşık bir süreçtir. Kemik hücrelerinin hücre-yüzey bağlanma reseptörleri, osteoblastların fenotipi ve hücre üreme ve farklılaşması biyosinyaller tarafından belirlenmektedir. Örnek olarak kemikte kırık oluştuğunda, yerel üretilen sitokin ve büyüme faktörleri, osteoprogenitör hücrelerin hasarlı bölgeye göç etmesini ve osteoblastlara farklılaşmasını sağlayıp, hücre üremesini ve ECM üretimini kontrol etmektedir (Lee ve Shin, 2007). Transforme edici büyüme faktörü (TGF- $\beta$ ), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi büyüme faktörleri osteoblast farklılaşmasını düzenleyen faktörleridir. Kalsitonin, parathormon, aktif Vitamin D metabolitleri, leptin ve heparan sülfat ise kemik oluşumunu düzenleyen endokrin faktörlerdir. Bunlara ek olarak kemik morfogenetik proteinler (BMP) gibi sitokinler ve deksametazon gibi glukokortikoidler de kemik oluşumunda ve gelişimde çeşitli roller üstlenmektedir (Gerçek Beşkardeş, 2008).

Son yıllarda araştırılan alternatif tedavilerden bir tanesi, sistemik hastalıkları tedavi etmek için kullanılan bazı ilaç gruplarının *in vivo* olarak kemik defekt alanına uygulanmasıdır (Thylin et al., 2002). Sözü geçen ilaç gruplarından bir tanesi,

yüksek kolesterolü düşürmek amacıyla kullanılan hidroksimetilglutaril-koenzim A redüktaz inhibitörleri statinlerdir. Statinlerin kolesterol düşürme özelliklerinin yanı sıra özellikle antiinflamatuvar etki, anjiogenezisi artırma ve kemik oluşumunu uyarma gibi etkileri olduğu belirtilmiştir (Horiuchi ve Maeda, 2006). Ayrıca statinlerin kemik greft materyallerine göre düşük maliyetli olmaları, yan etkilerinin düşük olması ve üretim kolaylıkları gibi avantajları bulunmaktadır (Stancu ve Sima, 2001). Statin grubu ilaçların kemik dokusu ve rejenerasyonu üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalara (Thylin et al., 2002; Özeç et al., 2007) rağmen, elde edilen bulgular çelişkilidir. Literatür incelendiğinde genelde statinlerin kemik defektlerinin tedavisindeki rolü, uygulama dozu ve taşıyıcı olarak kullanılan doku iskeleleri gibi pek çok parametreye ait tartışmaların devam ettiği, bu parametrelerle ilgili net bir sonuca varılamadığı tespit edilmiştir. Yine literatür bilgileri dahilinde farklı dozlardaki simvastatinin kemik defektleri üzerindeki etkisini hücresele düzeyde inceleyen herhangi bir çalışmanın bulunmadığı belirlenmiştir. Konu ile ilgili *in situ* kemik doku mühendisliğinde çok az ve çelişkili uygulamaların olmasından yola çıkılarak, elektro-eğirme yöntemi ile hazırlanmış membranlardan üretilen doku iskelelerine, lipofilik bir statin olan simvastatinin hidrofilik statinlere göre kemik dokusuna afinitesinin daha fazla olması, yağda çözünmediği için hücrelere daha kolay girebilmesi (Ismail, 2006) ve yapılan çalışmaların (Mundy, 1999; Thylin et al., 2002; Özeç et al., 2007) sonuçlarına göre kemik yenilenmesi üzerine olumlu etkilerinin diğer statin grubu üyelerine oranla daha yüksek bulunması sebebiyle simvastatin yüklenmesine ve hazırlanan simvastatin yüklü doku iskelelerinin osteoindüktif özelliklerinin araştırılmasına karar verilmiştir.

Simvastatin, membranlara ve doku iskelelerine yüklenmeden önce aktif hale getirilmiş, daha sonra iki farklı yolla yükleme işlemi proses edilmiştir. Simvastatin içeren çözelti, elektro-eğirme öncesi hazırlanan polimer karışımı içerisine eklenmiş, homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştırılmıştır. Simvastatin içeren homojen karışımdan elektro-eğirme yöntemi ile membranlar hazırlanmıştır. Simvastatin molekülleri bu yöntemle nanofiberler arasına hapsedilmiş ve kontrollü, uzun süreli ve yavaş salıma olanak sağlayacak bir sistem hazırlanmıştır. İkinci yöntemde ise, yığın salıma uygun bir sistem için simvastatin elektro-eğirme ile üretilen membranlardan hazırlanan 3 boyutlu doku iskeleleri üzerine damlatılmıştır.

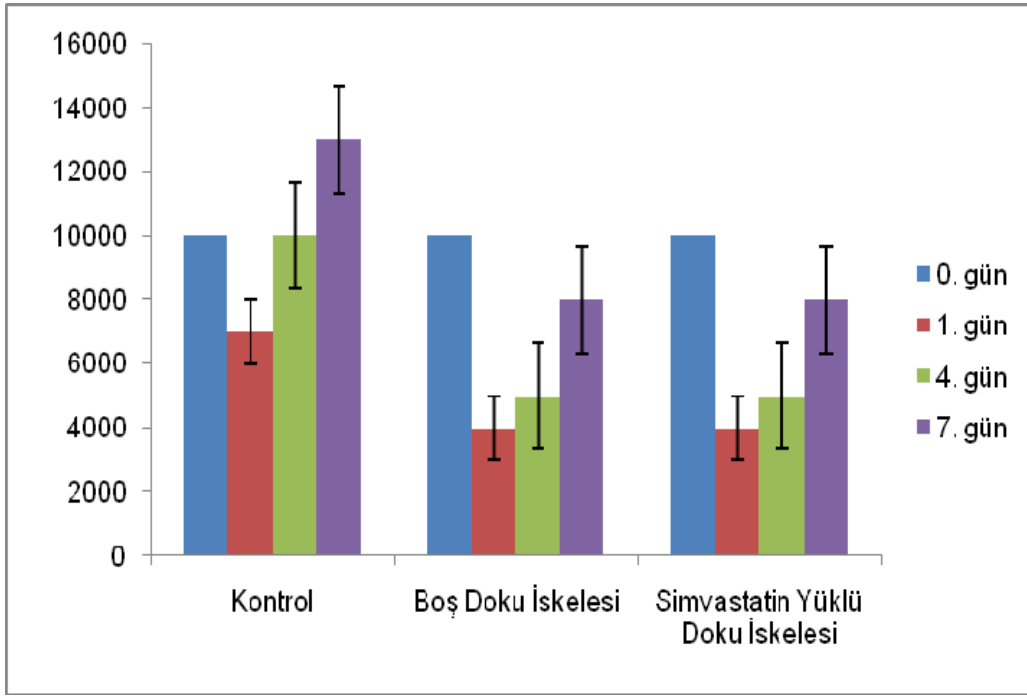
Doku iskeleleri mikro gözeneklere ve makro kanallara sahip olduğundan simvastatin yapı tarafından emilmiştir.

Thylin ve arkadaşları (2002) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, 2.2 mg simvastatinin kemik kalınlığını uyaracak optimum doz olduğunu, ancak o dozlar *in vivo* olarak uygulandığında inflamasyona neden olduğu, dozu düşürmenin klinik inflamasyonu azaltacağını rapor etmişlerdir. Bu bulgulardan yola çıkarak toksik etki göstermeyecek bir doz belirlenmiş ve simvastatin her bir doku iskelesinde 20 µg (80 mg/kg) olacak şekilde yüklenmiştir.

#### **4.3. Doku İskelelerinin ve Simvastatin İçeren Formlarının *in vitro* Hücre Kültür Çalışmaları**

Boş doku iskelesi grubu ve simvastatin yüklü doku iskelesi grupları hücre *in vitro* hücre kültür ortamında hücre tutunması ve çoğalması bakımından analiz edilmiş, birbirleriyle ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. L929 fare fibroblast hücreleri ( $1 \times 10^4$ /doku iskelesi) steril doku iskelelerine aşılansmış, aşılansan doku iskeleleri DMEM-F12, 10% FBS ve 0.5% penisilin/streptomisin antibiyotik çözültisi içeren petri kaplarında 37°C sıcaklıkta 5% CO<sub>2</sub> ortamında 7 gün boyunca inkübe edilmişlerdir. Deneyleerde trypan mavisii test kiti kullanılmıştır.

Doku iskeleleri üzerinde zaman içerisinde gerçekleşen hücre sayılarındaki değişim karşılaştırmalı olarak grafiğe geçirilmiş ve şekil 4.9'da sunulmuştur. Sonuçlara göre hücrelerde herhangi bir ters etki gözlenmemiş ve tüm gruplardaki hücreler birbirlerine yakın çoğalma profilleri göstermişlerdir. Yetersiz boş alan ve/veya besinden kaynaklanan yavaş çoğalma hızından dolayı kontrol grubundaki hücre çoğalmasının, doku iskelesi gruplarındaki hücre çoğalmasından yüksek olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin, deney süresinde kontrol grubunda bulunan tüm alana yayıldığı, ancak doku iskelelerinde bu süre içerisinde 3 boyutlu yapılarının içlerine doğru yayılmanın gerçekleşmediği düşünülmüştür. İlerleyen zaman zarfında kontrol grubunda hücre ölümlerinin başlaması, ancak doku iskelelerinin üç boyutlu yapılarından dolayı hücre büyümesinin devam etmesi öngörülmüştür.



Şekil 4.9. *in vitro* hücre kültür çalışması sonuçları

#### 4.4. Elektro-eğrilmiş PCL Esaslı Membranlardan Hazırlanan Doku İskelelerinin Ve Bunların Simvastatin Yüklü Formlarının Sıçanlar için Kritik Büyüklükte Kranial Kemik Defekt Modelinde *in vivo* İncelenmesi

Kranial Bölge, santral sinir sistemini kuşatan membranöz kemikten oluşmuş dirençli bir yapıdır. Santral sinir sisteminin kemik ile kuşatılması ve korunması hayati öneme sahiptir. Bu bölgedeki kemik bütünlüğün bozulması, travmatik ya da cerrahi defektlerin oluşması durumunda kemik çatının bozulmasına bağlı olarak fonksiyonel ve/veya estetik kayıplar ortaya çıkmakta, bu durum da defektli bölgenin onarımı zorunlu hale getirmektedir.

Kanser, travma, tümör, genetik bozukluklar ve kazalar sonucunda meydana gelen geniş çaplı kemik defektlerinin tedavisi için farklı tiplerde kemik greftleri, büyüme faktörleri ve bunların değişik kombinasyonlarını içeren birçok farklı uygulama denenmiş, çalışmaların sonuçları incelendiğinde kullanılan birçok malzeme ile standart flep operasyonlarından daha üstün sonuçlar elde edilmesine rağmen meydana gelen doku kayıplarının tamamen geri kazanımlarını sağlayabilecek ideal bir malzeme ya da tedavi yöntemi bulunamamıştır. Günümüzde kranial

bölge cerrahisi klinik uygulamalarında, kraniyumun external tabulasından, kaburga kemiği veya kırırdağından, iliyak crest ve tibia-fibula elde edilen kemik greftleri kullanılmaktadır. Defekt büyüdükçe gereksinim duyulan greft de büyümekte ancak bununla ters orantılı olarak greftin alıcı yatakta yaşama şansı azalmaktadır. Bu durumlarda vaskülarize kemik greftlerinin kullanılması zorunlu olmaktadır. Bu da cerrahi tedavi aşamasında mikro cerrahi işleminin zorluklarını gündeme getirmektedir. Bu güçlükler ilk kez Rus araştırmacı Ilizarov tarafından tanımlanan distraksiyon osteogenezinin kraniyafasial bölgede kullanabileceği düşüncesine götürmüştür. Bu teknikte distraktörler kullanarak kemik ve yumuşak doku yetersizlikleri ya da defektleri onarılabilmektedir.

Bu yetersizlikler ve klinikte karşılaşılan bu zorluklar, araştırmacıları yeni tedavi yöntemleri ve bu yöntemlerde kullanılacak biyomalzemeleri bulmaya yönlendirmiştir. Geliştirilen alternatif tedavi stratejilerinden bir tanesi, canlılığın ihtiyacı olan kemiğin özellikle defektli bölgede kendisi tarafından oluşturulması prensibine dayanan ve teze olan konu kemik doku mühendisliğidir. Bu yaklaşım, kemik dokusunun aktivasyon-resorpsiyon döngüsü üzerinden, değişik büyüme faktörlerinin, biyosinyal moleküllerinin ve üç boyutlu biyobozunur doku iskelelerinin yardımıyla kendi kendini modelleme ve rejenerasyonu mümkün kılmaktadır.

Polimer teknolojisindeki gelişmeye paralel olarak ilaç salım sistemlerinde biyoyumlu doğal ve sentetik polimerler yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Bu polimerler, içerilerine yerleştirilen ilaçları kontrollü salma ve istenilen etkiyi elde etmek için düşük miktarda ilaca gerek duyulması gibi avantajlara sahiptir. Biyobozunur matrisler içinde taşınan ilaçlar uzun zaman periyodunda uygulandıkları bölgede istenen konsantrasyonda bulunabilir ve farmakolojik etkilerini sürekli olarak gösterebilirler. Tylin ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları çalışmada simvastatinin polimer ailesinin bir üyesi olan metil selüloz jel ile kontrollü salımı kemik oluşumunu önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir.

Literatürde osteojenik, osteoindüktif veya osteokondüktif olmaya aday biyomalzemelerin klinik denemelerinden önce doku rejenerasyonu ile ilgili tedavi potansiyellerinin değerlendirilmesi amacıyla denek hayvanları kullanılmaktadır. Bilimsel çalışmalarda en yaygın kullanılan denek hayvanları ise, kemirgenler (fare, sıçan, tavşan), köpekler, domuzlar ve primat modelleridir. Bu nedenle sunulan bu

tez çalışmasında, düşük maliyetli ve kolay temin edilebilir olmalarından ve bakım kolaylığı sağlamalarından dolayı, deney hayvanları etik kurulunun izni doğrultusunda deney hayvanı olarak kemirgen familyasından sıçanların değişik türleri (Wistar Albino, Sprague Dawley) kullanılmıştır. Ayrıca, gerçekleştirilen tüm hayvan çalışmalarında kullanılan denek hayvanlarının aynı cins ve erişkin olmasına dikkat edilerek yaş, cinsiyet ve ağırlık farklılığının kemik oluşumu üzerine gösterebileceği değişiklikler elimine edilmeye çalışılmıştır.

Kritik boyutta defekt, bir hayvana herhangi bir osteojenik, osteokondüktif veya osteoindüktif bir biyomalzeme implante edilmeden yaşam boyu spontan olarak kemik yapımı ile iyileşme gösteremeyen en küçük boyutlu kemik defekti olarak tanımlanmaktadır. Bu tip defektler kemik dolumundan çok, fibröz bağ dokusuyla dolumu ile iyileşme eğilimi gösterir (Bosch et al., 1998; Moon et al., 2005; Proyor et al., 2006). Bununla beraber çalışmalarda süre kısıtlı olduğundan hayvan deneylerinde kritik boyuttaki defektler çalışma süresince iyileşme göstermeyecek boyuttaki defektlere işaret eder. O nedenle iyileşmenin gözlemlenmek istendiği bir defekt tipi kendi kendine iyileşmesine imkan verecek boyuttan fazla olmalıdır (Anbinder et al., 2006; Develioğlu, 2003).

Bu bilgilere dayanarak sunulan tez kapsamında sıçanlar için literatürde belirlenmiş kritik büyüklükte kraniyal kemik defekt modeli seçilmiştir. Seçilen hayvan modeline uygun olarak, Wistar Albino sıçanlarının kraniyal bölgesinde 8 mm çapında kritik büyüklükte kemik defektleri oluşturulmuştur. Açılan bu defektlere, PCL blendlerinden (%80 düşük - %20 yüksek molekül ağırlıklı) elektro-eğrilmiş membranlardan hazırlanan doku iskeleleri (Grup B, doku iskelesi grubu), bunların elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenen formları (Grup C, kontrollü salım grubu) ve doku iskelesi oluşturulduktan simvastatin damlatılan formları (Grup D, ani salım grubu), defekt iyileşmesi ve doku cevabı performansları bakımından birbirleriyle ve yalnızca kritik büyüklükte defekt olarak bırakılan grupla (Grup A, kontrol grubu) karşılaştırılmak üzere implante edilmiştir. Çalışmalarda ağırlıkları 250 ila 300 gram arasında değişen sıçanlar kullanılmıştır. Çalışma 6 ay sürmüş ve 1, 3 ve 6. aylarda doku iskeleleri defekt bölgesinden çevre dokuyla birlikte çıkartılmış, fikse edilmiştir. Örnekler daha sonra  $\mu$ CT ve histoloji çalışmalarında değerlendirilmiştir.

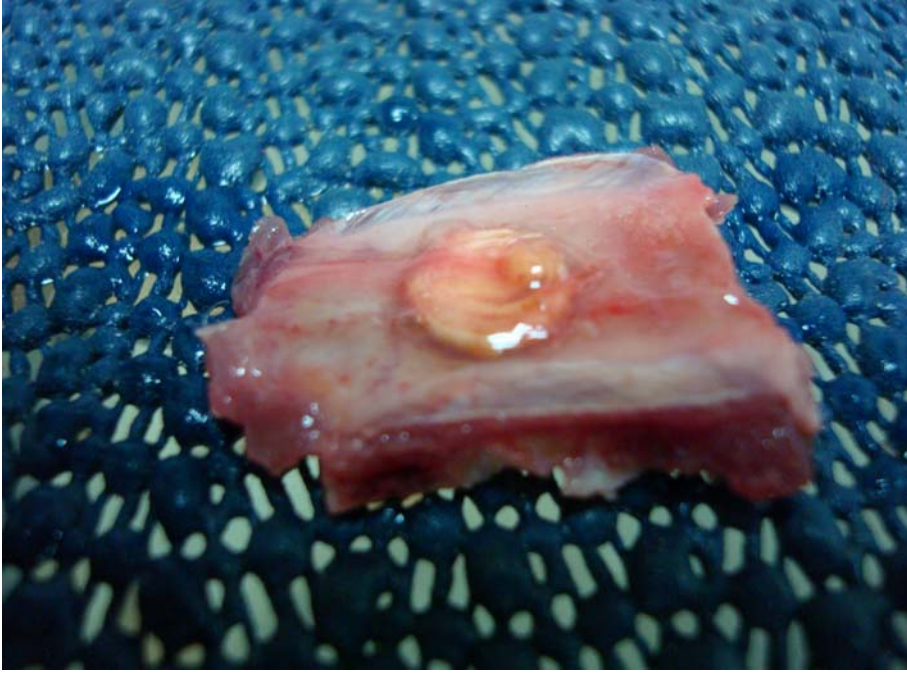
#### 4.4.1. Hayvan Çalışmaları

İlk aşama hayvan çalışması için kullanılan 92 sıçan 4 gruba ayrılmıştır. İlk grup, doku iskelesi yerleştirilmeyen ve defekt bölgesi boş bırakılan *Kontrol Grubu* (Grup A) olarak belirlenmiştir. Bu grup için 2 adet hayvan seçilmiştir. Bu grubun oluşturulma amacı, kritik büyüklükte açılan defekt bölgesindeki dokunun kendini ne derece yenilediğinin gösterilmesidir. İkinci grup ise, içerisine herhangi bir aktif ajan yüklenmemiş doku iskelelerinin boş olarak implante edildiği *Yapı İskelesi Grubu* (Grup B) olarak adlandırılmıştır. Elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenen membranlardan hazırlanan doku iskeleleri ise üçüncü grubu (*Kontrollü salım grubu*, Grup C), elektro-eğirme sonrası simvastatin damlatılan grup ise dördüncü grubu (*Ani salım grubu*, Grup D) oluşturmuştur. Tüm gruplar için hayvan sayısı 30 olarak belirlenmiştir. Ancak zaman içerisinde çeşitli nedenlerden dolayı hayvan kayıpları yaşanmıştır. Çalışmanın 1, 3 ve 6. aylarında tüm gruplarda hayatta kalan hayvanlar eter anestezisi ile sakrifiye edilmiştir. Defekt bölgesi açılmış ve çevre doku ile birlikte alınan numuneler formol çözeltisi içerisine konulmuştur. Her bir numune alındıkları anda görsel olarak incelenmiş ve o zaman noktasında, o gruba ait ana özellikler not edilmiştir.

Çizelge 4.5'te her grup için 1, 3 ve 6. aylar sonunda alınan numunelerinin ortak özellikleri verilmiştir. Bu çizelgedeki veriler, hayvanların uyutulmasından sonra yapılan gözlemler şeklinde not edilmiş ve mevcut ağırlıklarının ortalaması verilmiştir. Boş doku iskelesi grubunun 6. aydaki görüntüsü Şekil 4.10'da sunulmuştur. Şekil 4.11'de ise fikse edilmek üzere hayvandan çıkartılan örneğin görüntüsü verilmiştir. Tüm doku iskelesi gruplarında denek hayvanları sakrifiye edildikten sonra doku iskelesinin ve defekt bölgesinin genel görünümü şekil 4.10'da sunulduğu gibidir. Altıncı ayın sonunda bile implantların yapısal bütünlüğünü koruduğu ve üzerilerinin zarla kaplanmış olduğu gözlenmiştir. Bu durum *in vivo* bozunma davranışının beklenenden düşük olduğuna dair bir ipucu olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.10. Doku iskelesi grubunda defekt bölgesinin 6. ay sonundaki görünümü



Şekil 4.11. Fikse edilmek üzere 6. ay sonunda alınmış numune

Çizelge 4.5. Denek hayvanlarında 1, 3 ve 6. aylar sonunda yapılan gözlem sonuçları

Numune	Ağırlık (g)	Gözlem Sonuçları
Kontrol grubu (30-90-180 gün)	287	Defektte kapanma yok, herhangi bir komplikasyon gözlenmedi
Doku iskelesi grubu (30 gün)	239	Doku iskelesi bütünlüğünü koruyor, beyin doku iskelesine yapışık
Doku iskelesi grubu (90 gün)	263	Doku iskelesi bütünlüğünü koruyor, beyin doku iskelesine yapışık
Doku iskelesi grubu (180 gün)	279	Doku iskelesi bütünlüğünü koruyor, kurutlu hayvanlar mevcut
Kontrollü salım grubu (30 gün)	274	Doku iskelesi bütünlüğünü koruyor, periostu intakt, kemik direnci yüksek
Kontrollü salım grubu (90 gün)	244	Doku iskelesi bütünlüğünü koruyor, Kemik direnci yüksek, yarı yarıya hayvanda sculp derisi kurutlu
Kontrollü salım grubu (180 gün)	239	Doku iskelesi bütünlüğünü koruyor, Kemik direnci yüksek, yarı yarıya hayvanda sculp derisi kurutlu
Ani salım grubu (30 gün)	275	Doku iskelesi bütünlüğünü koruyor, sagittal sinüs intakt
Ani salım grubu (90 gün)	266	Doku iskelesi bütünlüğünü koruyor, komplikasyon gözlenmedi
Ani salım grubu (180 gün)	231	Doku iskelesi bütünlüğünü koruyor, komplikasyon gözlenmedi

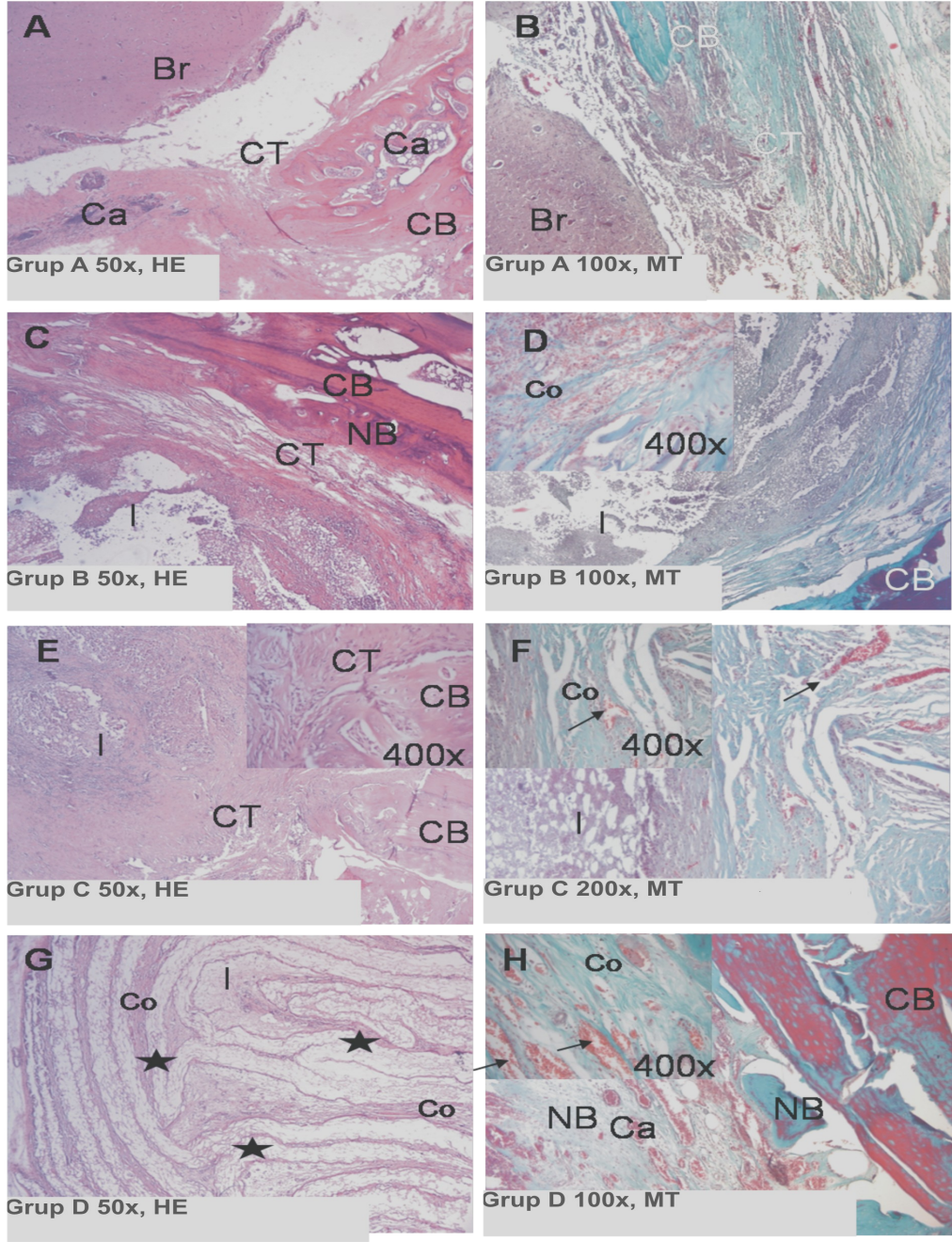
#### 4.4.2. Histoloji Çalışmaları

Kemik defektleri ile ilgili çalışmalarda iyileşmenin hücresel seviyede tespiti açısından en geçerli ve en uygun değerlendirme şeklinin histoloji ve histomorfometrik yöntemlerin kullanılması olduğu bilinmektedir. Literatürde simvastatinin etkilerinin daha çok histolojik sonuçları çalışılmıştır (Wong ve Rabie, 2003; Özeç et al., 2007). Bu nedenle sunulan tez kapsamında simvastatinin kemik defektlerinin iyileşmesi üzerindeki etkisini histolojik olarak incelenmiştir.

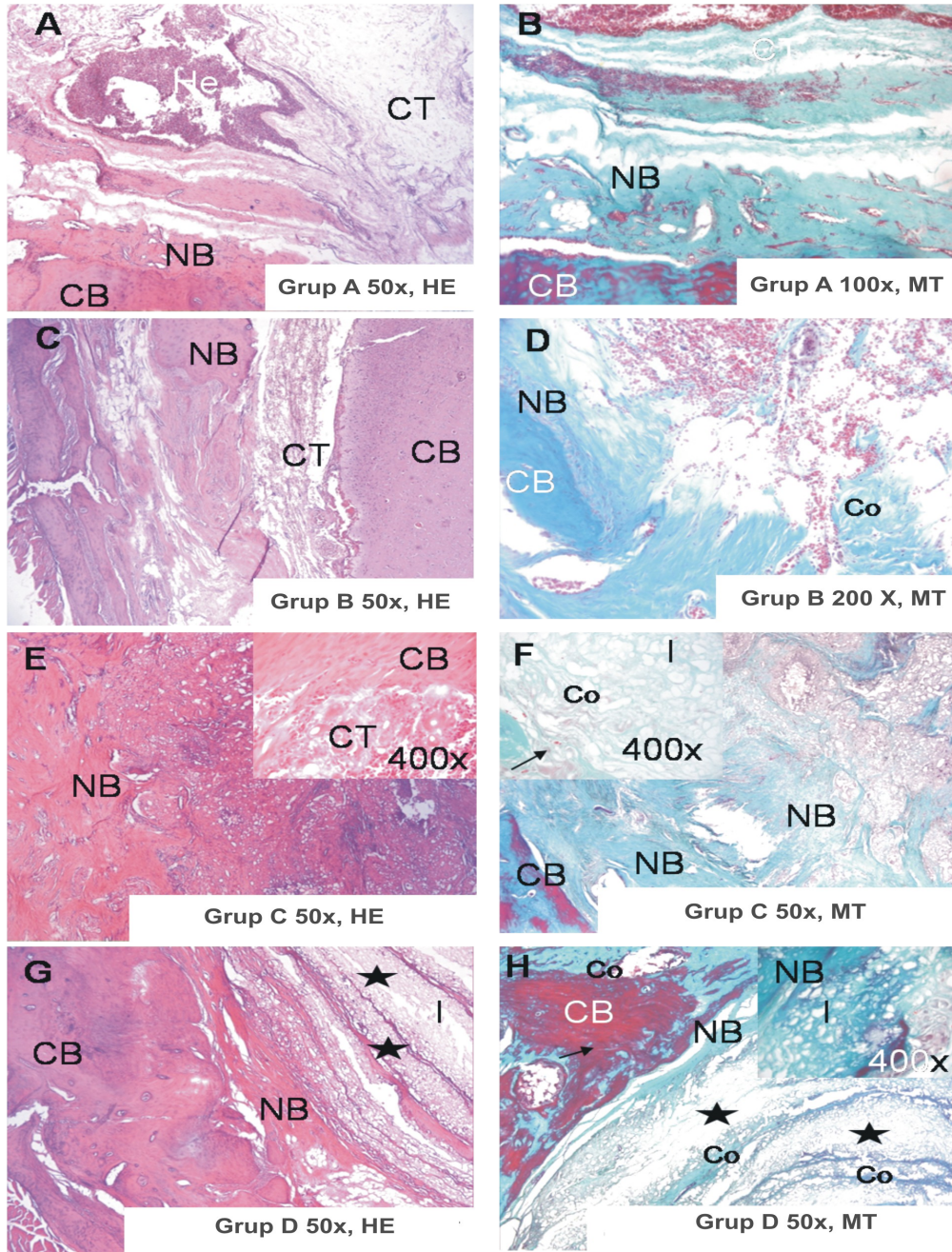
1, 3 ve 6. aylarda tüm gruplara ait histoloji kesitleri Şekiller 4.12-4.14'de sunulmuştur. İlgili şeklin açıklamaları ve şekillerde kullanılan kısaltmalar her bir şeklin altında verilmiştir. Tüm histolojik değerlendirmeler yapılan istatistik testlerin sonuçlarına göre yapılmıştır.

De Castro çözeltilisinde (kloral hidrat, nitrik asit, distile su) 5 ila 10 gün arasında değişen sürede dekalsifiye örnekler, daha sonra fosfat tamponuna aktarılmış ve dereceli alkollerden geçirilerek teknikte bilinen yöntemle parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan kızaklı mikrotomda (Leica, Almanya) 5 µm kalınlığında seri kesitler alınmıştır.

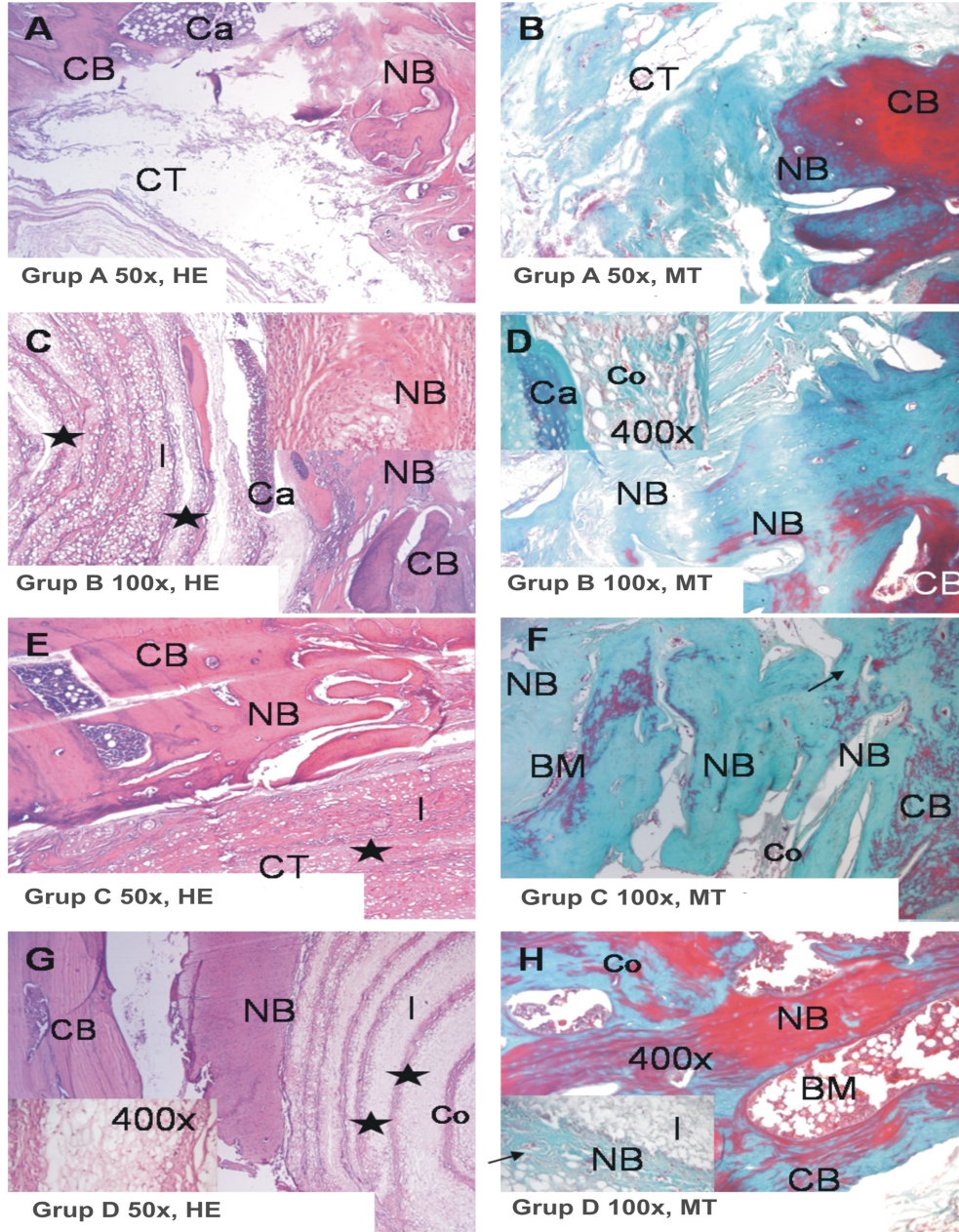
Hematoksilen eozin ve Masson trikrom (Sigma, Almanya) ile kesitlerin boyanmasının ardından defekt onarımı, yeni kemik oluşumu ve doku iskelesinde doku yanıtı açısından incelenmiş, dijital kamera elde edilen görüntüler ile bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Masson trikrom ile boyalı kesitlerde defekt bölgesinde oluşan yeni kemik (yeşil renk) alanı hesaplanmıştır. Bu amaçla seri kesilen her bloktan elde edilen her 20 kesitten rastgele 2 kesit kantitatif olarak incelenerek gözlemlerin ortalaması esas alınmıştır. Defekt iyileşmesi ve doku iskelelerine doku yanıtları semi kantitatif bir skorlama sistemi ile Çizelge 3.1'de sunulan verilerle hesaplanmıştır.



Şekil 4.12. 1. ay sonuçları: Kontrol kavitesi boyunca beyin (Br) bölgesi gözlenmiştir. Kemikleşme kontrol grubunda (A, B) başlangıç seviyesindedir. Doku iskelesi yerleştirilmiş gruplarda defekt onarım prosesi çok daha ileri seviyededir (C-H). Kollajen fiberler (pembe: HE; yeşil: MT) ve kan damarları (oklar), doku iskelesinin makro kanalları (yıldız) boyunca yerleşmişler, biyouyumluluğu göz önüne sermişlerdir (C-H). Kullanılan kısaltmalar HE: Hematoksilen Eozin, MT: Masson Trikrom, I: Doku iskelesi, CT: Bağ dokusu, BM: Kemik iliği, CB: Kompakt kemik, NB: Yeni kemik, Co: Kollajen fibriller, Br: Beyin.



Şekil 4.13. 3. ay sonuçları: Kontrol grubu, doku iskelesi grupları ile karşılaştırıldığında defekt bölgesini dolduran organize olmamış gevşek bağ dokusu ile çok düşük bir iyileşme seviyesi sergilemiştir (A, B). Elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenmiş grupta yeni kemik oluşumu kortikal köşelerde başlamıştır (E, F). Aktif osteoblastlar tarafından çevrelenen yeni kemik matrisi yeşil ve olgun kemik matrisi ise MT ile kırmızı olarak gösterilmiştir. Bozulan biyomalzeme partikülleri ile sınırlandırılmış makro kanallar, genişlemiş ve oldukça yüksek vasküler fibröz kallus ile dolmuşlardır (G, H). Kollajen fiberler (HE ile pembe, MT ile mavi) ve kan damarlarının doku iskelesi ile yakın ilişkide olduğu gözlenmiştir. Kullanılan kısaltmalar: HE: Hematoksilen Eozin, MT: Masson Trikrom, I: Doku iskelesi, CT: Bağ dokusu, BM: Kemik iliği, CB: Kompakt kemik, NB: Yeni kemik, Co: Kollajen fibriller.



Şekil 4.14. 6. ay sonuçları: Kritik büyüklükteki kemik defekti hiç bir grupta tam olarak kemikleşmemiştir. Kontrol kavitesi düzensiz fibröz doku ile kaplanmış durumda kalmıştır (A, B). Doku iskeleleri gruplarında iyileşme süreci hızlanmıştır. Doku iskeleleri perilerden başlayarak içlere doğru bozunmuş, içerileri fibröz ve kemiksi kallus ile dolu makro kanallı küçük bölümlere ayrılmıştır (C, D). Elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenen grupta, kortikal kemiğin şekil değiştirmesi kemik iliğinin yenilenmesine izin vermiştir (E-H). Kullanılan kısaltmalar: HE: Hematoksilen Eozin, MT: Masson Trikrom, I: Doku iskelesi, CT: Bağ dokusu, BM: Kemik iliği, CB: Kompakt kemik, NB: Yeni kemik, Co: Kollajen fibriller.

Histolojik değerlendirmeden elde edilen veriler, altıncı ayın sonunda hiçbir deney grubunda kritik büyüklükteki kemik defektinin tümüyle kapanmadığını göstermiştir (Şekiller 4.12-4.14). Kritik büyüklükteki kraniyal defekt boyunca çeşitli intramembranöz ve bazı bölgelerde endokondral kemikleşmenin aşamaları gözlenmiştir. PCL doku iskelesi, çoğunlukla mononükleer fagositik hücreler, makrofajlar, lenfosit ve fibroblastlarla karakterize edilen hafif derecede bir doku reaksiyonuna neden olan osteokondüktif bir çevre oluşturmuştur. İlk ayda, yabancı cisim dev hücreleri ile birlikte bazı dağınık polimorf nükleer lökositler kaydedilmiş, doku reaksiyonu zamanla ince kollajen bantlar oluşturarak azalmış, polimerik malzemenin bozunduğu bölgelerde fibroblastlarla birlikte damarlanma başlamıştır. Gruplar arasında doku cevabı skorları açısından herhangi bir fark tespit edilmemiştir. Hiç bir zaman aralığında hiç bir örnekte nekroz ya da yabancı cisim reaksiyonu gözlenmemiştir. Doku cevabı, tüm PCL doku iskelesi gruplarında birinci aydan başlayarak altıncı aya kadar önemli derecede azalmıştır ( $p<0.05$ ). Bu sonuç, doku iskelelerinin biyoyumlu olduğunun kanıtı olarak kabul edilmiştir.

Kemik defekti iyileşme skorları, kritik büyüklükte kemik defekti modelinde zamanla artmaktadır. Kemikleşme, kortikal kemiğin uç kısımlarından doku iskelesinin içlerine doğru başlamıştır. Kıkırdak tabakaları, doku iskeleleri grubunda endokondral kemikleşme prosesinin başladığını göstermektedir. Her iki simvastatin yüklü doku iskelesi grubunda kortikal kemik uçlarında, kortikal tabakalara yakın olan makro kanalların duvarlarında ve kıkırdak adacıklarında çok sayıda yeni kemik matrisini sentezleyen aktif osteoblastlar gözlenmiştir. Önceki çalışmalardan sıçanlarda 6 mm çapında kritik büyüklükteki defektin kendi kendine kapanmadığı gösterildiği için kontrol grubundaki örnek sayısı sınırlı tutulmuştur. Ayrıca etik prensipler, anlamlı veri elde edilebilecek en az sayıda hayvan kaybının zorunlu kılmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı kontrol grubu için yalnızca iki adet hayvan kullanılmıştır. Limitli örnek sayısından dolayı kontrol grubundaki kraniyal skorlar ilk üç ay boyunca sabit kalmıştır. Kontrol grubuna ait iyileşme skorları altıncı ayda diğer gruplarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Histolojik kemik defekti iyileşme skorları, simvastatin yüklü doku iskeleleri gruplarında simvastatin içermeyen boş doku iskelesi grubunda yüksek olduğu gösterilmiştir. Elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenen grupta (kontrollü salım grubu, grup C) iyileşme önemli derecede hızlanmıştır. Bu gruba ait

altıncı ay kemik defekti iyileşme skorları, simvastatin içermeyen boş doku iskelesi grubundan ve elektro-eğirme sonrası simvastatin damlatılan gruptan (ani salım grubu, grup D) yüksek olduğu not edilmiştir ( $p<0.05$ ). Sözü geçen grupta osteoklastik aktivite tarafından kontrol edilen kortikal kemik yenilenmesi ve ilik kavitesinin tekrar şekillenmesi diğer gruplardan daha iyi olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre elektro-eğirme sırasında doku iskelelerine yüklenen simvastatinin, özellikle üç aydan altı aya kadar olan süreçte kritik büyüklükteki kemik defekti iyileşmesine önemli bir etkisi olduğu söylenebilir. Başka bir ifadeyle kontrollü olarak salımı sağlanan simvastatin, ani olarak salınmasından daha etkilidir. Ayrıca bu grupta, altıncı aya ait iyileşme skorları yine bu grubun üçüncü ay iyileşme skorlarına göre önemli derecede yüksektir ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.12-4.13).

Dairesel olarak katlanmış mikro gözeneklere ve makro kanallara sahip doku iskelelerinin, bağ dokusu hücrelerinin büyümesine ve yeni kan damarları içeren hücre dışı matris elementlerinin gelişmesine olanak sağladığı gözlenmiştir. Bozunma birinci aydan itibaren periferden başlayarak doku iskelesinin içlerine doğru genişlediği belirlenmiştir. Ancak doku iskelelerinin bozunmadan kalan bölümleri, fibröz bağ dokusunca zengin Kollajen fiberler, fibroblastlar ve kan damarları ile dolmuş bir şekilde kalitenin ortasında kalmışlardır (Şekil 4.12-4.14).

Simvastatin içeren doku iskeleleri ile ilgili sonuçlar, simvastatinin salım davranışlarına bağlı olarak kemik oluşumundaki ARF (aktivasyon, resorpsiyon, formasyon) döngüsüne önemli derecede etki ettiğini göstermiştir. Doku iskelelerine ait makro kanallar osteoklastların ve osteoblastların tutunmasına ve periferden başlayarak merkeze doğru yayılmalarına olanak sağlamıştır. Bu duruma ek olarak, simvastatinin öncül osteoblastlardan ve osteoklastlardan meydana gelen dura mater ve periostu sözü geçen makro kanallara ve nanofiber yapıdaki doku iskelelerine doğru indüklediği belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen en anlamlı sonuç, 3. ve 6. altıncı aylarda makro kanallar boyunca mineralize olmuş kemik dokusunun gelişmesidir. Çizelge 4.6-4.9'da her bir grup için doku yanıtı ve defekt iyileşmesine ait tanımsal istatistikler verilmiştir.

Çizelge 4.6. Kontrol grubu (Grup A) için doku yanıtı ve defekt iyileşmesine ait tanımsal istatistikler (N=2)

Aylar	Değerler	350-Old 350	Doku cevabı	Defekt iyileşmesi
1	Ortalama	,6118	,0000	1,0000
	Standart sapma	,41055	,00000	,00000
	Orta	,6118	,0000	1,0000
	Minimum	,32	,00	1,00
	Maksimum	,90	,00	1,00
3	Ortalama	1,3994	,0000	1,5000
	Standart sapma	,33750	,00000	,70711
	Orta	1,3994	,0000	1,5000
	Minimum	1,16	,00	1,00
	Maksimum	1,64	,00	2,00
6	Ortalama	1,6265	,0000	2,0000
	Standart sapma	,02602	,00000	,00000
	Orta	1,6265	,0000	2,0000
	Minimum	1,61	,00	2,00
	Maksimum	1,64	,00	2,00

Çizelge 4.7. Boş doku iskelesi grubu (Grup B) için doku yanıtı ve defekt iyileşmesine ait tanımsal istatistikler (N=5).

Aylar	Değerler	350-Old 350	Doku cevabı	Defekt iyileşmesi
1	Ortalama	,8701	3,4000	1,4000
	Standart sapma	,10664	,54772	,54772
	Orta	,8338	3,0000	1,0000
	Minimum	,74	3,00	1,00
	Maksimum	1,01	4,00	2,00
3	Ortalama	2,1360	2,6000	2,4000
	Standart sapma	2,37645	,54772	,54772
	Orta	1,2198	3,0000	2,0000
	Minimum	,62	2,00	2,00
	Maksimum	6,33	3,00	3,00
6	Ortalama	1,9118	1,6667	2,6667
	Standart sapma	,65929	,51640	,81650
	Orta	1,7133	2,0000	2,5000
	Minimum	1,36	1,00	2,00
	Maksimum	3,18	2,00	4,00

Çizelge 4.8. Elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenen doku iskelesi grubu (Grup C) için doku yanıtı ve defekt iyileşmesine ait tanımsal istatistikler (N=5).

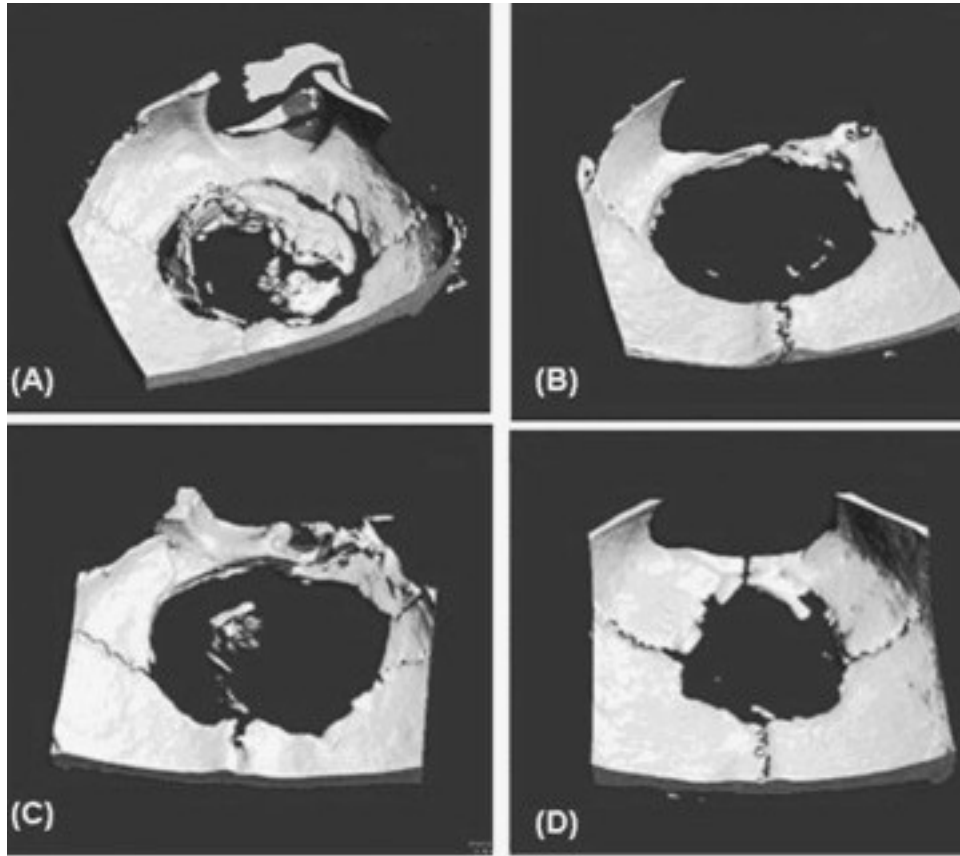
Aylar	Değerler	350-Old 350	Doku cevabı	Defekt İyileşmesi
1	Ortalama	,5329	3,0000	1,4000
	Standart sapma	,32585	,00000	,54772
	Orta	,4959	3,0000	1,0000
	Minimum	,21	3,00	1,00
	Maksimum	1,05	3,00	2,00
3	Ortalama	3,4006	2,4000	3,4000
	Standart sapma	5,03834	,54772	1,14018
	Orta	1,5006	2,0000	3,0000
	Minimum	,34	2,00	2,00
	Maksimum	12,36	3,00	5,00
6	Ortalama	3,2608	1,2000	5,0000
	Standart sapma	,71410	,44721	1,00000
	Orta	3,3601	1,0000	5,0000
	Minimum	2,30	1,00	4,00
	Maksimum	3,95	2,00	6,00

Çizelge 4.9.. Elektro-eğirme sonrasında simvastatin damlatılan doku iskelesi grubu (Grup D) için doku yanıtı ve defekt iyileşmesine ait tanımsal istatistikler (N=5).

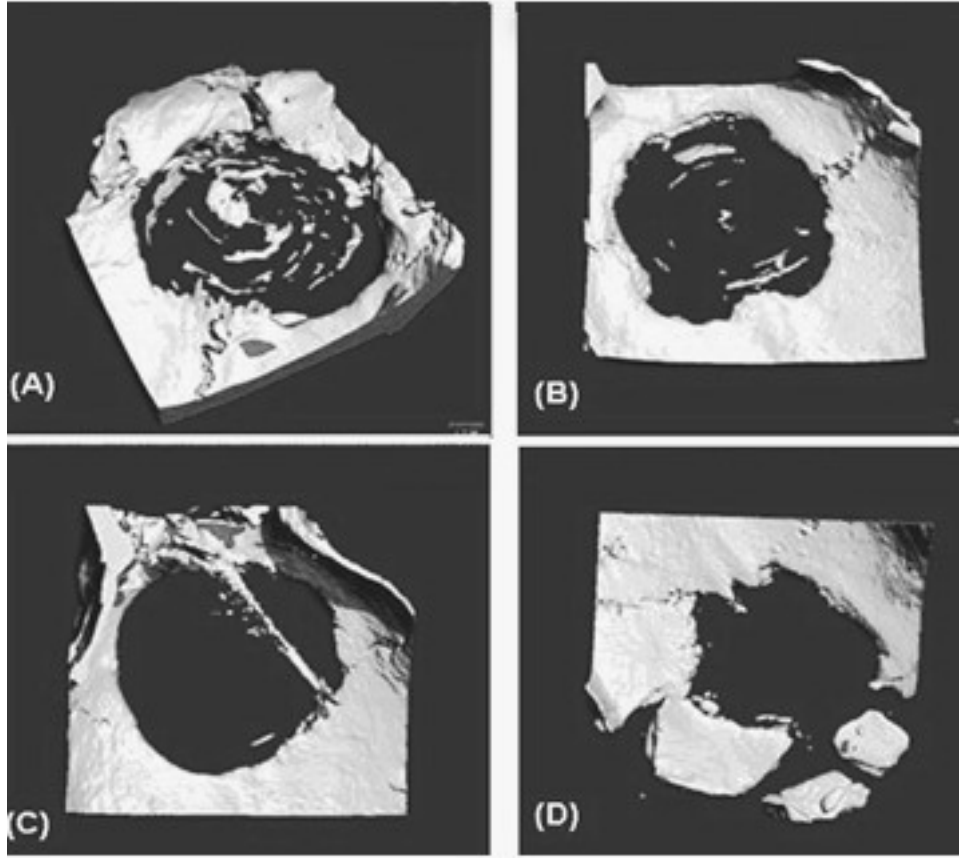
Aylar	Değerler	350-Old 350	Doku cevabı	Defekt iyileşmesi
1	Ortalama	,8513	2,8000	2,0000
	Standart sapma	,30450	,44721	,70711
	Orta	,8777	3,0000	2,0000
	Minimum	,54	2,00	1,00
	Maksimum	1,27	3,00	3,00
3	Ortalama	1,6724	2,4000	3,2000
	Standart sapma	,71418	,54772	,83666
	Orta	1,4948	2,0000	3,0000
	Minimum	,94	2,00	2,00
	Maksimum	2,74	3,00	4,00
6	Ortalama	3,2608	1,2000	5,0000
	Standart sapma	,71410	,44721	1,00000
	Orta	3,3601	1,0000	5,0000
	Minimum	2,30	1,00	4,00
	Maksimum	3,95	2,00	6,00

#### 4.4.3. MicroCT Çalışmaları

Yapılan microCT analizlerinin sonuçlarına göre, elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenen grup (Kontrollü salım grubu, grup C) defekt boyunca mineralizasyon oluşumu bakımından en etkili grup olduğu gözlenmiştir. Bu gruba ait üç aylık sonuçlarda mineralize matrisin önemli ölçüde arttığı gözlenirken diğer gruplarda bu değerlere ulaşılmamıştır. Yine bu gruba ait altıncı ay verileri defekt boyunca mineralize olmuş matrisin hacmi bakımından karşılaştırıldığında, kontrol grubuna ( $p=0.0068$ ), boş doku iskelesi grubuna ( $p=0.01$ ) ve elektro-eğirme sonrası simvastatin damlatılan gruba (ani salım grubu,  $p=0.04$ ) ait verilere göre daha anlamlı bulunmuştur. Gruplar için elde edilen  $\mu$ CT görüntüleri şekil 4.15 ve 4.16'de sunulmuştur.

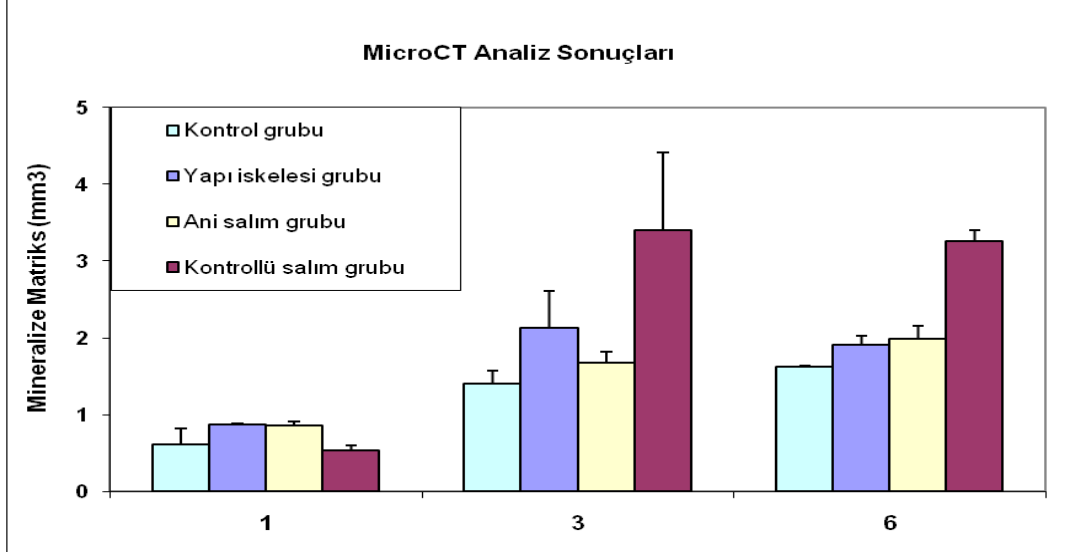


Şekil 4.15. Gruplara ait 3 aylık  $\mu$ -CT görüntüleri: (A) elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenmiş grup; (B) boş doku iskelesi grubu; (C) elektro-eğirme sonrası simvastatin damlatılmış grup; (D) kontrol grubu



Şekil 4.16. Gruplara ait 6 aylık  $\mu$ -CT görüntüleri: (A) elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenmiş grup; (B) boş doku iskelesi grubu; (C) elektro-eğirme sonrası simvastatin damlatılmış grup; (D) kontrol grubu

Boş doku iskelesi grubunun defekt boyunca mineralize matris formu oluşturmak için tek başına yeterli olmadığı belirlenmiştir. Ancak, simvastatin yüklü gruplar mineralize matris hacmi bakımından kontrol grubuna ve boş doku iskelesi grubuna göre daha iyi sonuçlar sergilemişlerdir. Özellikle elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenen gruba ait sonuçların diğer gruplara kıyasla daha anlamlı olmasının nedeni olarak simvastatinin beklendiği gibi uzun zaman aralıklarında ve yavaş salım davranışı olarak kabul edilmiştir. Elektro-eğirme sonrası simvastatin damlatılan grupta, aktif ajanın salımı ani salım karakterine uygun olarak çok hızlı olmuş, bu sebeple defekt boyunca kemikleşme için yeterince önemli katkı sağlamasını engellemiştir. MicroCT sonuçları gruplara göre karşılaştırmalı olarak grafiğe geçirilmiş, şekil 4.17’te sunulmuştur.



Şekil 4.17 Gruplara ait karşılaştırmalı  $\mu$ -CT analiz sonuçları

İlk aşama hayvan çalışmalarında ulaşılan sonuçlar, ilgili literatürde sunulan çalışmalarda bulunan sonuçlara benzerlik göstermektedir. Wong ve Rabie (2003), tavşanların kafatasında oluşturulan 10x5 mm boyutundaki kemik defektine konsantrasyonu 2.5 mg/ml olacak şekilde suda çözünerek elde edilen simvastatin solüsyonundan 0.2 ml alarak kollajen sünger ile uyguladıkları çalışmalarında, 14 gün sonra simvastatin uyguladıkları grupta defekt kenarlarının karşıdan karşıya birleşme eğiliminin yüksek olduğunu gözlerken, kontrol grubunda az bir miktar yeni kemik oluştuğu ve defekt alanının fibröz doku ile dolduğunu rapor etmişlerdir.

Özeç ve arkadaşları (2007), fare mandibulasında 3 mm çapında oluşturdukları defektlere konsantrasyonu 2.5 mg/ml olacak şekilde suda çözünerek elde edilen simvastatin çözeltisinden 0.2 ml alarak jelatin sünger ile uyguladıklarında, 14 gün sonra konak kemik-greft yüzleşmesinde yeni kemik oluştuğu ve oluşan yeni kemiğin defekt ortasına doğru ilerlediği görmüşlerdir. Pasif kontrol grubunun ise fibröz bağ doku ile dolduğunu izlemişlerdir.

Mikro gözeneklere ve makro kanallara sahip doku iskelelerinin, bağ dokusu hücrelerinin büyümesine ve yeni kan damarları içeren hücre dışı matris elementlerinin gelişmesine olanak sağladığı gözlenmiştir. doku iskelelerinin bozunmadan kalan bölümleri, fibröz bağ dokusunca zengin kollajen fiberler, fibroblastlar ve kan damarları ile dolmuş bir şekilde kavitenin ortasında kalmışlardır. Özellikle elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenmiş gruptaki,

kemikleşme skorlarının, simvastatinin osteoindüktif özelliğe sahip bir ilaç olduğunu desteklemektedir.

#### **4.5. Elektro-eğrilmiş PCL Esaslı Membranlardan Hazırlanan Doku İskelelerinin Ve Bunların Mezenkimal Kök Hücre İçeren Formlarının Sıçanlar İçin Kritik Büyüklükte Kranial Kemik Defekt Modelinde *in vivo* İncelenmesi**

Kranial bölge, vaskülarizasyon ve öncü hücrelerin varlığından dolayı, biyobozunma ve onarım süreçlerinin eş zamanlı değerlendirilmesi için özellikle ilgi çekmektedir (An, 2000). Kemik doku mühendisliğindeki hücre temelli yaklaşımlar için kemik iliği preparasyonları, mezenkimal kök hücreler ve osteoprojenitör hücreler kullanıldığı rapor edilmiştir (Aydın, 2008).

Seçilen hayvan modeline uygun olarak, ikinci hayvan aşama hayvan çalışmasında ağırlıkları 250 ila 300 gram arasında değişen sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlarının kranial bölgesinde 8 mm çapında kritik büyüklükte kemik defektleri oluşturulmuştur. Açılan bu defektlere, önceki bölümlerde detaylı olarak tartışılan elektro-eğrilmiş membranlardan hazırlanan doku iskelelerinin mezenkimal kök hücre içeren formları ( $1 \times 10^6$  hücre/doku iskelesi) yerleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak, defekt bölgesine insizyon sonrası mezenkimal kök hücreler ( $1 \times 10^6$  hücre ) tek başlarına enjekte edilmişlerdir. Önceki çalışmada olduğu gibi bu çalışma da 6 ay sürmüş ve 1, 3 ve 6. aylarda doku iskeleleri defekt bölgesinden çevre dokuyla birlikte çıkartılmış, fikse edilmiştir. Örnekler daha sonra  $\mu$ CT ve histoloji çalışmalarında değerlendirilmiştir.

##### **4.5.1. Hayvan Çalışmaları**

İkinci aşama hayvan çalışmasında kullanılan 60 sıçan 2 gruba (n=30) ayrılmıştır. İlk grup, defekt bölgesine doku iskelesi olmaksızın yalnızca mezenkimal kök hücrelerin enjekte edildiği *Kök Hücre Grubu* (kontrol grubu) ve ikinci grup ise insizyon sonrası içlerine kök hücrelerin enjekte edildiği doku iskelesi grubu, *Doku İskelesi + Kök Hücre Grubu* olarak adlandırılmıştır.

Bir önceki hayvan çalışmasında olduğu gibi Çalışmanın 1, 3 ve 6. aylarında tüm gruplardan 10'ar hayvan eter anestezisi ile ex edilmiştir. Defekt bölgesi açılmış ve

alınan numuneler formol çözültisi içerisine konulmuştur. Her bir numune alındıkları anda görsel olarak incelenmiş ve o zaman noktasında, o gruba ait ana özellikler not edilmiştir. Yapılan makroskopik gözlem bir önceki çalışmada gözlemlere benzerlik göstermekte, *Doku iskelesi + Kök Hücre* grubundaki tüm doku iskelelerinin yapısal bütünlüklerini korudukları belirlenmiştir. *Doku iskelesi + Kök Hücre Grubu'nun* 6. ay sonundaki görüntüsü Şekil 4.18'te sunulmuştur.



Şekil 4.18. *Doku iskelesi + Kök Hücre Grubu'nda* defekt bölgesinin 6. ay sonundaki görünümü

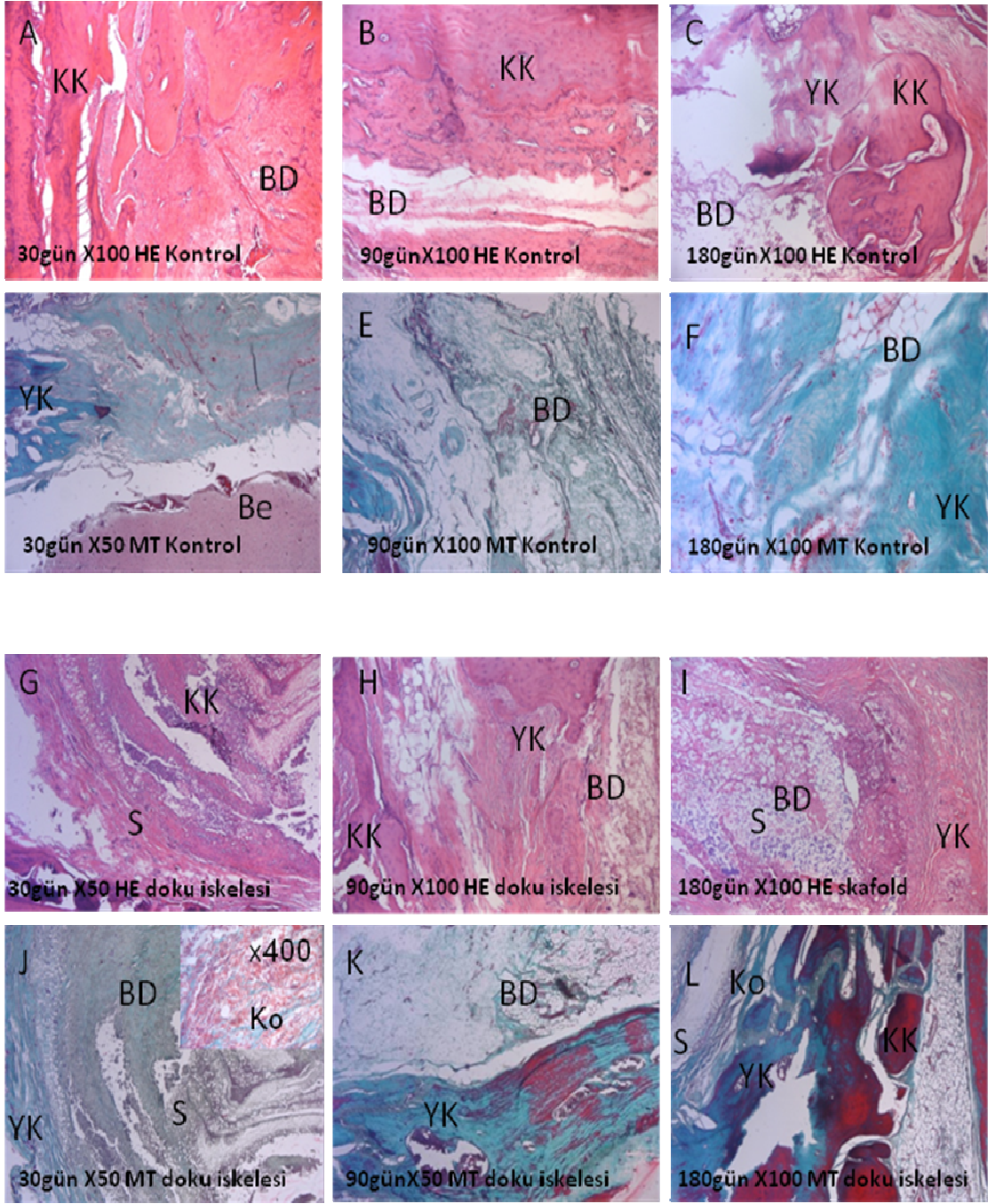
#### 4.5.2. Histoloji Çalışmaları

Bir önceki hayvan çalışmasında olduğu gibi, bu çalışma için mezenkimal kök hücrelerinin kemik defektlerinin iyileşmesi üzerindeki etkisi histolojik olarak değerlendirilmiştir.

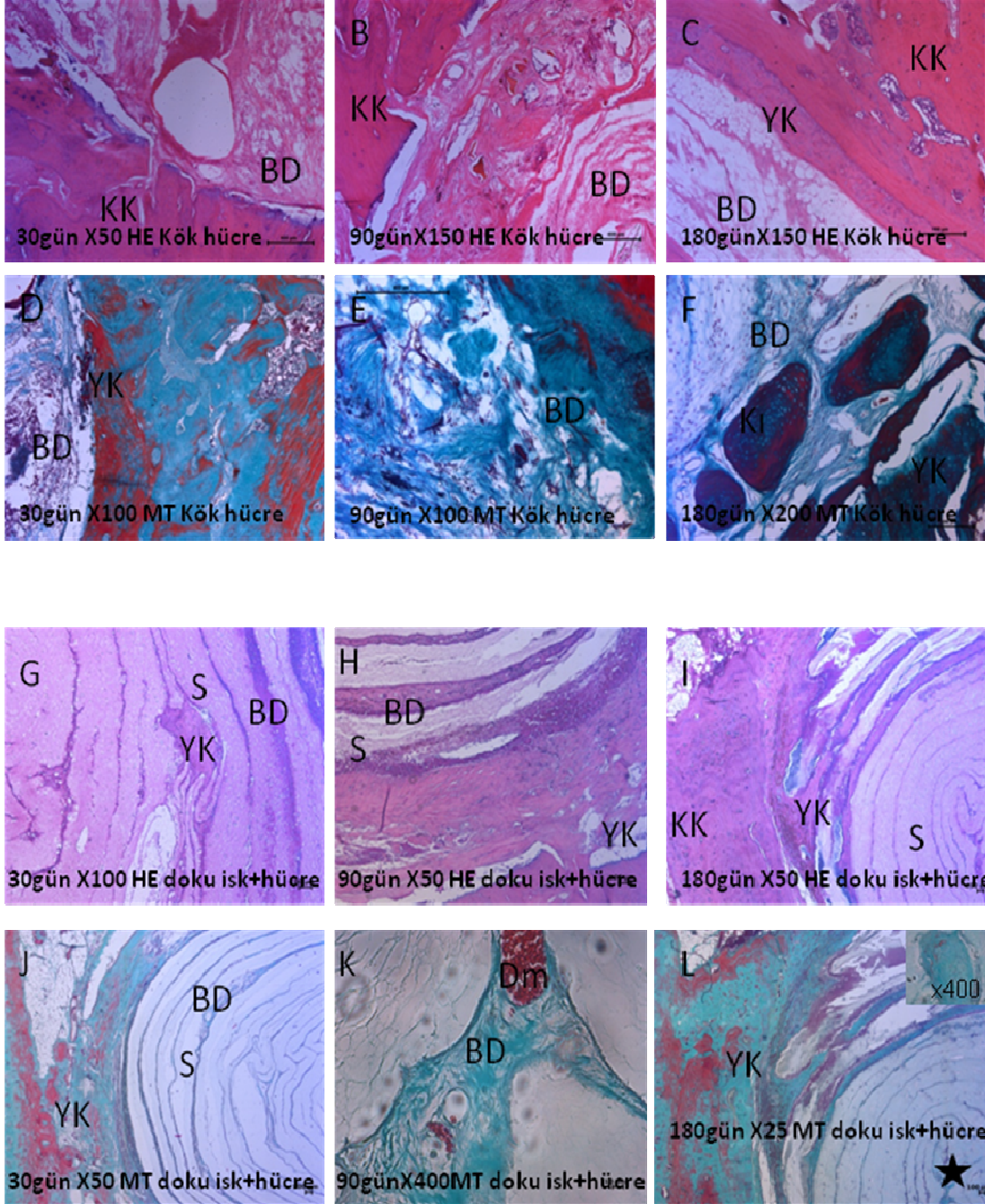
Kemik örnekleri %10'luk tamponlanmış nötral formalin çözültisine alınmış öncelikle  $\mu$ CT analizlerinde kullanılmışlardır. MicroCT sonrası dokular, De Castro çözültisinde (kloral hidrat, nitrik asit, distile su) kontrollü olarak dekalsifiye edilmiş ve sabit vakumlu otomatik bir doku takip cihazı ile izlenerek parafin bloklar içine gömülmüş, bu bloklardan 3-5  $\mu$ m kalınlığındaki kesitler alınmıştır. Kesitler daha

sonra Hematoksilen eozin (HE) ve Masson trikrom (MT) ile boyanmıştır. MT ile kompakt kemiğin kırmızı, osteoid ve kırırdağın yeşil, hücre sitoplazmalarının eflatun boyandığı yüksek kontrastlı görüntüler elde edilmiştir. Kraniyal defekt alanı, bilgisayar ve dijital kamera (Leica DFC 480, Westlar Almanya) bağlantılı Leica DMR (Westlar Almanya) marka ışık mikroskobunda görüntüledikten sonra defekt alanı en küçük büyütmede saklanıp Qwin plus marka (Leica, Westlar Almanya) görüntü analiz programı ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Yeni trabeküler kemik alanlı toplam defekt alanına oranlanarak elde edilen piksel ölçümleri  $\mu\text{m}$  kareye dönüştürülmüştür. Osteoblastlarla çevrili osteoid/yeni kemik uzunluğu 200'lük üç büyütme alanında görüntü analiz programında hesaplanarak bu alanlardaki toplam osteoid/yeni kemik uzunluğuna oranlanmış; elde edilen oran yüzde olarak kaydedilmiştir. Defekt alanındaki yeni damarlar yine 200'lük büyütmede rastlantısal olarak seçilmiş 4 alanda dijital olarak sayılmış ve her örnek için elde edilen ortalama sayı kaydedilmiştir (Lu ve Rabie, 2004; Aronin et al., 2009). Biyomalzemeye; doku yanıtı, fibröz doku oluşumu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından semi kantitatif olarak skorlama yapılmış toplam skor kaydedilmiştir. Fibröz doku oluşumu için örnekler implant çevresinde kollajenden zengin sıkı bağ dokusu varsa (4), normal dokunun devamlılığı bozulmuş ve orta derecede sıkı kollajenden zengin bağ dokusu varsa (3), orta derecede sıkı bağ dokusu varsa (2), hafif fibroplazi ya da az sayıda iç biçimli fibroblastlar varsa (1), kontrol dokusundan farklı değil, implant çevresinde bağ dokusu yoksa (0) olarak skorlanmıştır. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu; implanta ciddi doku reaksiyonu ya da nekroz varsa (4), çok sayıda lenfosit, makrofaj, yabancı cisim dev hücresi, eozinofil ve nötrofil varsa (3), orta sayıda lenfosit, makrofaj ve az sayıda yabancı cisim dev hücresi ve nötrofil varsa (2), az sayıda lenfosit ve makrofaj var, dev hücre, eozinofil ve nötrofil yoksa (1), implant çevresinde lenfosit, makrofaj, dev hücre, nötrofil, eozinofil yoksa (0) olarak skorlanmıştır (Pişkin et al., 2009).

1, 3 ve 6. aylarda tüm gruplara ait histoloji kesitleri Şekiller 4.19-4.20'de sunulmuştur. İlgili şeklin açıklamaları ve şekillerde kullanılan kısaltmalar her bir şeklin altında verilmiştir.



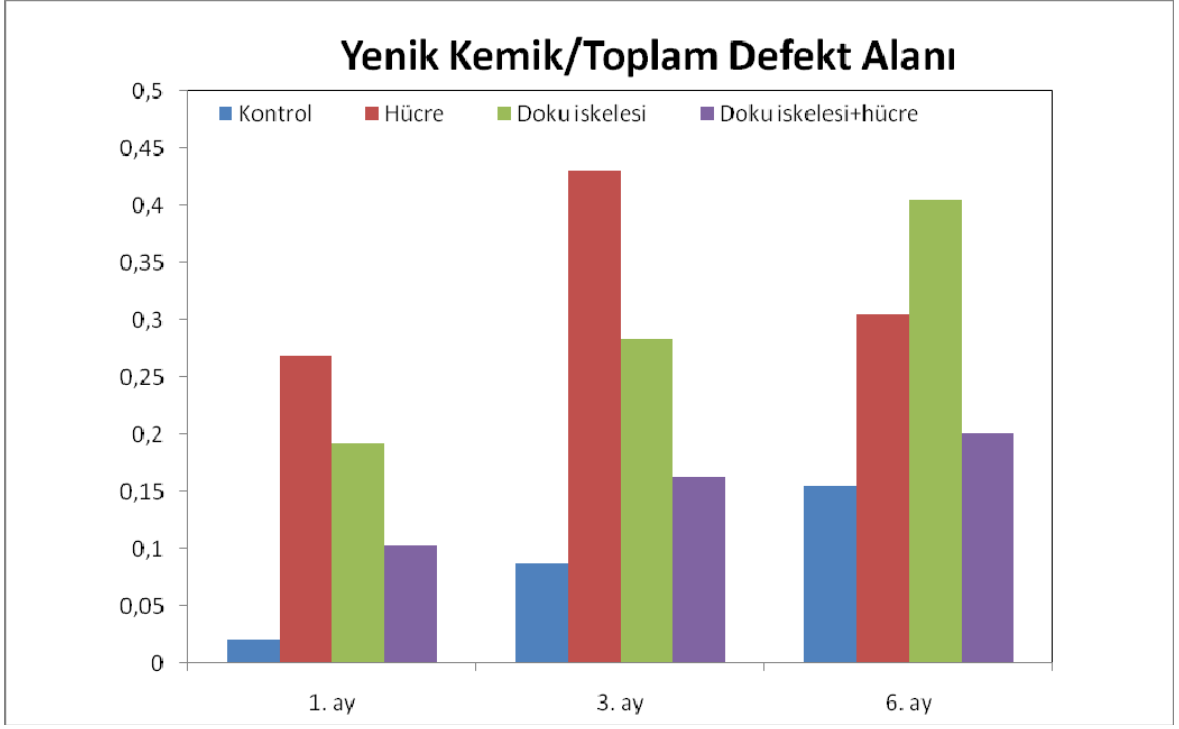
Şekil 4.19. Yukarıdaki üst grup kontrol, alt grup doku iskelesi gruplarına ait kompakt kemikle sınırlı kranial defekt alanına ait mikrograflarıdır. Sol sütun 30, orta sütun 90, sağ sütun ise 180 günü göstermektedir. E, F, G ve J inset kavitenin içindeki bağ dokusu alanlarına ait görüntülerdir. Doku iskelesi, makro kanallarının içinde kavitede düzenli kemik oluşumuna rehberlik etmektedir. G, J, I ve L’de doku iskelesinin makro kanalları ile fibroblastlar, kan damarları ve kollajen fibriller yakın temas halindedir. KK: Kompakt kemik, YK: Yeni kemik, BD: Bağ dokusu, S: Doku iskelesi, Ko: Kollajen fibril, HE: Hematoksilen eozin, MT: Masson trikrom.



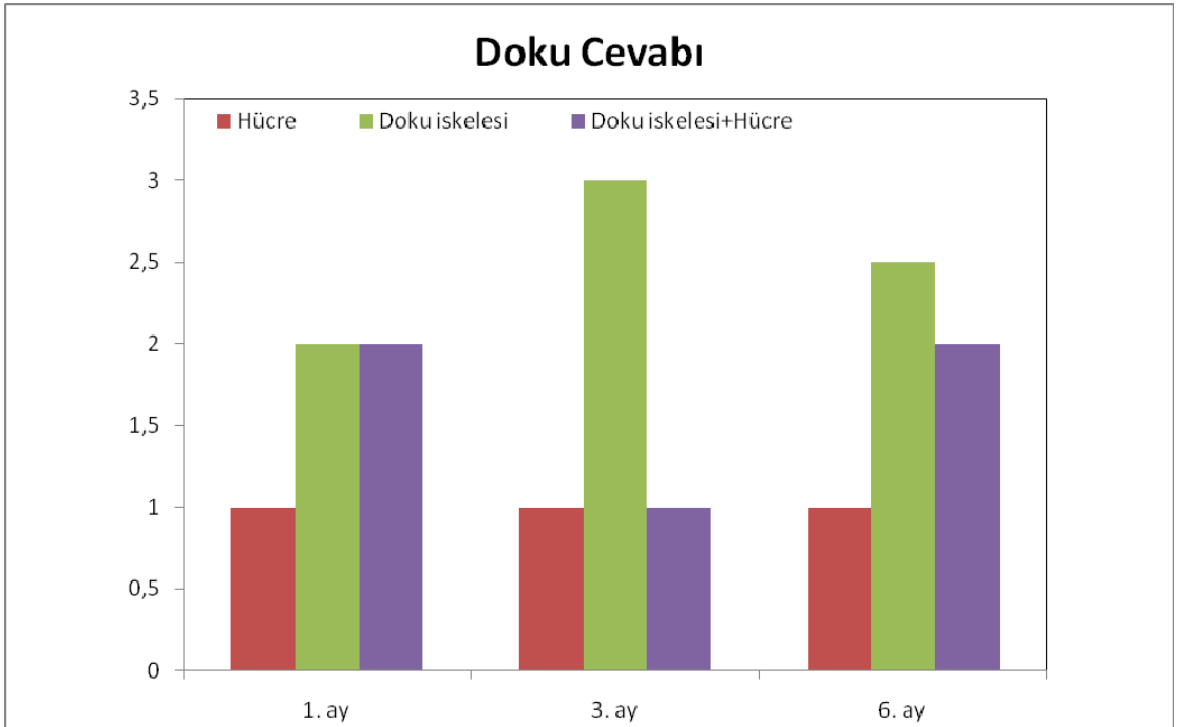
Şekil 4.20. Yukarıdaki üst grup kök hücre, alt grup doku iskelesi + kök hücre gruplarına ait kompakt kemikle sınırlı kranial defekt alanı mikrograflarıdır. Sol sütun 30, orta sütun 90, sağ sütun ise 180 günü göstermektedir. Doku iskelesi + hücre gruplarında kavitede doku iskelesinin makro kanallarında yeni kemik miktarının sadece kök hücre grubuna göre daha fazla olduğu izlenmektedir. K'da kavite merkezindeki damardan zengin intramembranöz kemikleşme alanı izlenmektedir. L insette kavitenin merkezinde yıldızla işaretli bölgedeki kemik spikülü görülmektedir. . KK: Kompakt kemik, YK: Yeni kemik, BD: Bağ dokusu, S: doku iskelesi, Ko: Kollajen fibril, Dm: Damar, HE: Hematoksilen eozin, MT: Masson trikrom.

İncelenen tüm zaman dilimlerinde (1, 3 ve 6. ay) doku iskelesi ve bunların kök hücre içeren formları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; defekt alanı ile oranlanan yeni kemik miktarı, aktif osteoblastlarla çevrili yeni kemik uzunluğu ve kan damarı miktarının istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). 3. ayın sonunda yalnız kök hücre uygulanan gruptaki yeni kemik miktarı hücre ve doku iskelesinin beraber uygulandığı gruba göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). 6. ayın sonunda aktif kemik yapıcı hücreler olan osteoblastlarla çevrili yeni kemik uzunluğu tek başına doku iskelesi uygulanan grupta ve sadece kök hücre ve kontrol gruplarına göre anlamlı olduğu görülmüştür ( $p<0.05$ ). Doku iskelesi ve hücre uygulanan gruplarda defekt alanında implant tanecikleri çevresindeki yeni kan damarı sayısı 3 ve 6. aylarda yalnız hücre ve yalnız doku iskelesi uygulanan gruplara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ). Bu sonuçlara göre incelenen tüm zaman dilimlerinde hücre ve doku iskelesi uygulanan gruplarda aktif kemik yapımı ve yeni damar oluşumu hızlanmıştır (Şekil 4.19-20).

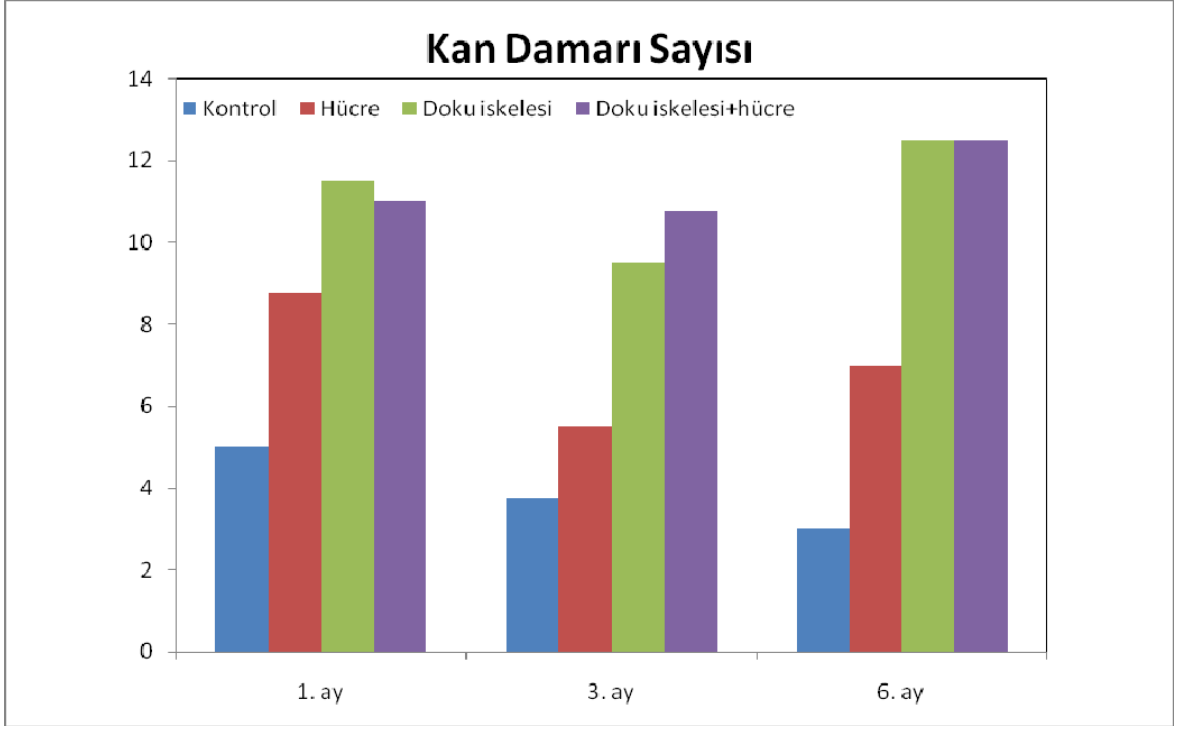
Doku iskelesine, hafif derecede bir doku yanıtı olduğundan doku yanıtı skorları genellikle düşük olarak izlenmiştir. Tüm zaman dilimlerinde biyomalzemeye doku yanıtı, hücrelere olan yanıtın daha düşük olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Doku iskelesi komşuluğunda lenfosit, makrofaj ve yer yer yabancı cisim dev hücreleri izlenmekle birlikte hiçbir örnekte ve zaman diliminde fibrozis (skar dokusu), nekroz ve ciddi yabancı cisim reaksiyonuna rastlanmamıştır. Doku iskelesi, hem perifer hem de merkezden başlayarak sirküler kanallarının içinde düzenli ve sağlıklı kemik yapımına rehberlik etmiştir. Hücre ile beraber uygulandığında kanallardaki kemik yapımını istatistiksel olarak anlamlı arttırmıştır ( $p<0.05$ ). Bu sonuç, lenfomonositer infiltrasyonun kemikleşmeye engel olmadığını göstermektedir. Malzeme otuzuncu günden itibaren *in vivo* olarak periferden merkeze doğru bozunmaya başlamış olsa da, 6. ayın sonunda kavitede makro kanallı yapısal bütünlüğünü aynen korumaktadır. 6. ayın sonunda hiçbir kavitede tam kemikleşme izlenmemiştir (Şekil 4.19-20). Yapılan bu çalışmaya göre, uygulanan kök hücre-polimer kompoziti biyouyumlu olarak kritik kraniyal defektin intramembranöz kemikleşmesini uyardığı sonucu çıkarılmıştır. Şekil 4.21-4.24'de grupların, tüm zaman dilimlerinde, yeni kemik/toplam defekt alanı, doku cevabı, kan damarı sayısı ve osteoblast döşeli yeni kemik uzunluğuna ilişkin tanımsal istatistikler grafikler halinde sunulmuştur.



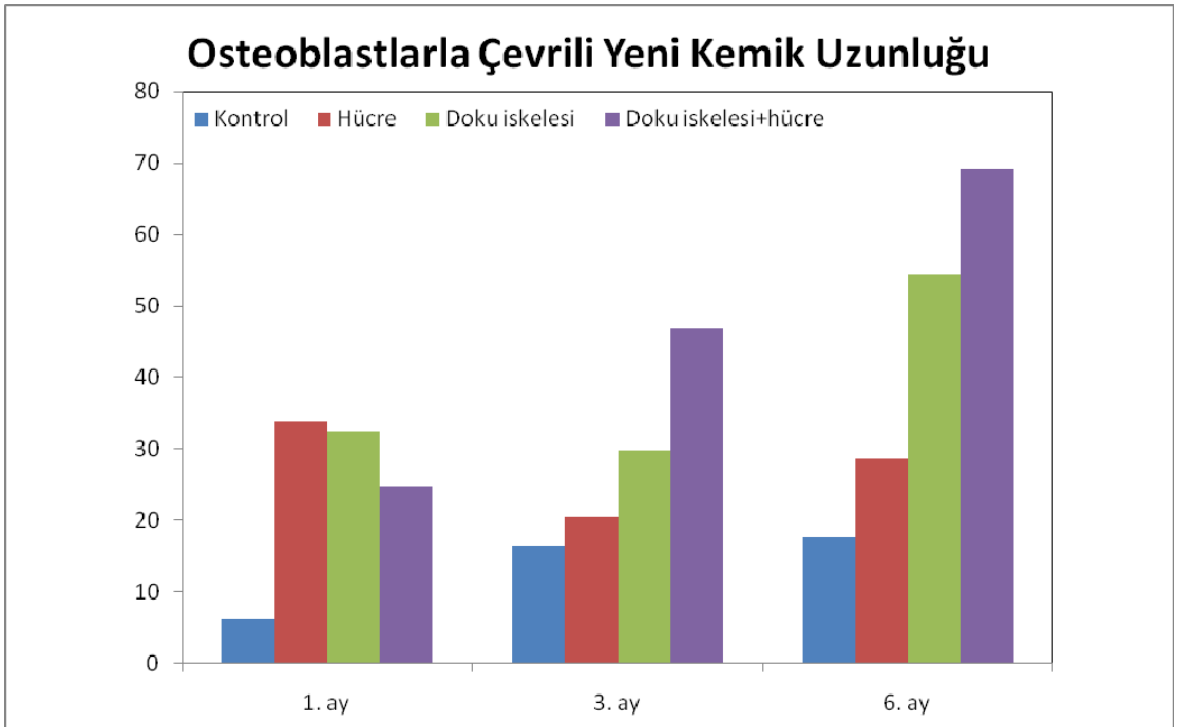
Şekil 4.21. Yeni kemik/toplam defekt alanına ilişkin tanımlı istatistikler



Şekil 4.22. Doku cevabına ilişkin tanımlı istatistikler



Şekil 4.23. Kan damarı sayısına ilişkin tanımlı istatistikler



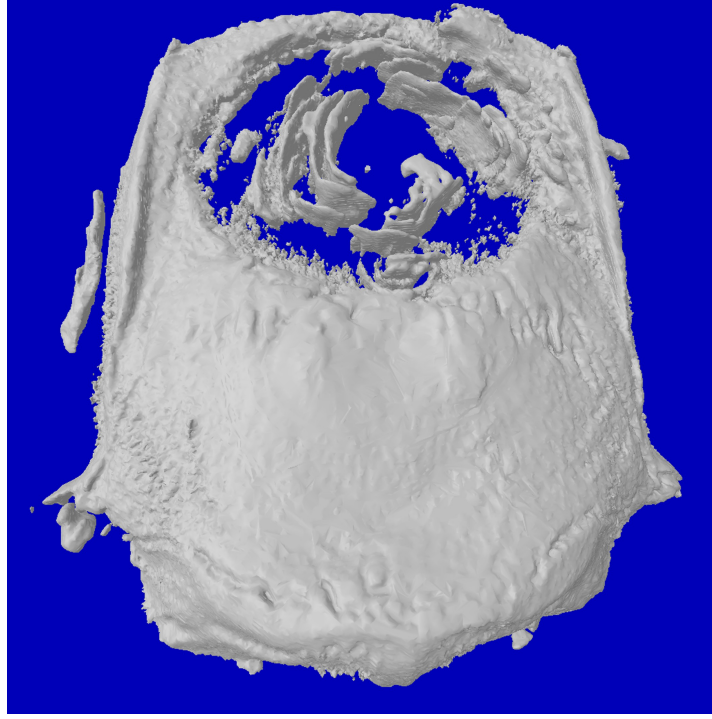
Şekil 4.24. Osteoblastlarla çevrili yeni kemik uzunluğuna ilişkin tanımlı istatistikler

#### 4.5.3. MicroCT Çalışmaları

Bu çalışmanın analizler, kemik oluşumunun göstergesi olarak defekt alanı boyunca mineralize olmuş kemik matrisini belirlemek için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Anabilim Dalı'nda yerleşik x-ray mikro-bilgisayarlı tomografi ( $\mu$ CT, Skyscan1174, Belçika) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu cihazla yalnızca 6. ayda *Doku iskelesi + Kök Hücre* grubundan alınan örnekler değerlendirilmiş, bir önceki hayvan çalışmasından elde edilen MicroCT bulguları ile karşılaştırma gerçekleştirilmiştir. Sözü geçen grup için, defekt bölgesi içindeki doku hacmi ( $\text{mm}^3$ ), yeni kemik hacmi ( $\text{mm}^3$ ) ve yeni kemik hacminin doku hacmine oranları belirlenmiş ve çizelge 4.10'da sunulmuştur. Şekil 4.25'de altı ay için elde edilen üç boyutlu görüntü gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. *Doku İskelesi + Kök Hücre Grubu'na* ait tüm denek hayvanları için 6. ay  $\mu$ -CT değerleri

Toplam Defekt Hacmi ( $\text{mm}^3$ )	Yeni Kemik Hacmi ( $\text{mm}^3$ )	Yeni Kemik Hacmi/Toplam Defekt Hacmi (%)
157,977271	18,31390735	11,59275
113,1462004	6,940962952	6,13451
142,4618446	13,96349183	9,80157
127,3373865	7,286718153	5,72237
138,8037724	10,63930423	7,66500
113,0693617	12,60229822	11,14563
100,1948763	7,106975738	7,09315



Şekil 4.25. *Doku iskelesi + Kök Hücre Grubu'nun* 6. ayına ait üç boyutlu genel  $\mu$ CT görüntüsü.

$\mu$ CT analizleri, 6. ay sonundaki *Doku iskelesi + Kök Hücre Grubu* için gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, sözü geçen grup için oluşan yeni kemik hacminin toplam defekt hacmine oranı ortalama % 8.45 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, histolojik değerlendirmede elde edilen yeni kemik oluşumunun toplam defekt hacmine oranı ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu görülmüştür. Bunun nedeni ise,  $\mu$ CT taramalarında yalnızca mineralize olmuş kemik dokusunun ölçüldüğü henüz mineralize olmamış kemik öncüllerinin ölçüme dahil olmamasıdır. Ayrıca, histoloji sonuçlarına paralel olarak 6. ay için alınan  $\mu$ CT sonuçları, doku iskelesinin makro kanalları boyunca merkezden başlayan bir kemikleşme olduğunu göstermiştir.

## 5. SONUÇLAR

- Poli( $\epsilon$ -kaprolakton),  $\epsilon$ -kaprolakton monomeri, katalizör olarak kalay oktoat kullanılarak yüksek (85 kDa) ve düşük (15 kDa) olmak üzere iki farklı molekül ağırlığında sentezlenmiştir.
- $\epsilon$ -kaprolakton polimerizasyonu, bir cam reaktörde vakum altında azot atmosferinde 120°C sıcaklıkta ve 24 saat sürede etüv içerisinde gerçekleştirilmiştir. Düşük molekül ağırlığına sahip polimer için monomer/katalizör oranı: 1700/3 (mol/mol), yüksek molekül ağırlığına sahip polimer için monomer/katalizör oranı: 1700/1 olarak seçilmiştir.
- Sentezlenen polimerlerden, kloroform ve DMF çözeltilisi içerisinde ağırlıkça % 80 düşük molekül ağırlıklı PCL ağırlıkça % 20 yüksek molekül ağırlıklı PCL karıştırılarak blendler hazırlanmıştır. Düşük molekül ağırlıklı PCL'in bozunma süresini kısaltacağı, yüksek molekül ağırlıklı PCL'in mekanik dayanımı artırması ve proses edilebilirliği kolaylaştıracağı öngörülmüştür.
- Hazırlanan blendlerden elektro-eğirme yöntemi ile örgüsüz nanofiber yapıda membranlar üretilmiştir. 1 mm kalınlığında membran eldesi için elektro-eğirme koşulları; polimer derişimi: ağırlıkça %40 (40 g/100 ml PCL); pipet ucu-toplayıcı arası uzaklık: 15 cm; uygulanacak gerilim: 15kV ve süre: 45 dakika olarak belirlenmiştir.
- Elektro-eğirme yöntemi ile hazırlanmış membranların FTIR spektrumu çekilmiş, PCL'e ait karakteristik piklerin varlığı gösterilmiştir. PCL için literatürde sunulan piklerle kıyaslandığında elektro-eğirme sonrası piklerde çok az kaymalar kaydedilmiştir.
- Membranların <sup>1</sup>H-NMR spektrumu çekilmiş, kaprolakton monomerinde farklı pozisyonlarda yer alan H atomlarına ait karakteristik pikler gösterilmiştir. Bu pikler

literatürle karşılaştırılmış, elektro-eğirme sonrası elde edilen membranların yapılarında bir değişikliğin olmadığı gösterilmiştir.

- Membranların camsı geçiş sıcaklığını ( $T_g$ ) ve erime sıcaklığını ( $T_m$ ) sayısal olarak göstermek için DSC termogramları çekilmiş, membranların camsı geçiş sıcaklığı ( $T_g$ )  $-61,81\text{ }^{\circ}\text{C}$  ve erime sıcaklığı ( $T_m$ )  $-58,77\text{ }^{\circ}\text{C}$  olarak bulunmuştur. Literatürle karşılaştırıldığında, elektro-eğirme sonrası camsı geçiş sıcaklığı aynı kalırken, erime sıcaklığının biraz azaldığı gözlenmiştir.
- Sentezlenen düşük molekül ağırlıklı PCL ve yüksek molekül ağırlıklı PCL için ağırlıkça ve sayıca ortalama molekül ağırlıkları ve heterojonluk indeksleri sırasıyla;  $M_w$ : 14321,  $M_n$ : 6715, HI: 2,13 ve  $M_w$ : 84387,  $M_n$ : 51172, HI: 1,64 olarak bulunmuştur. Bu polimerlerin elektro-eğirme sonrası, ağırlıkça ve sayıca ortalama molekül ağırlıkları ve heterojonluk indeksleri sırasıyla;  $M_w$ : 14056,  $M_n$ : 6238, HI: 2,11 ve  $M_w$ : 83983,  $M_n$ : 50873, HI: 1,63 olarak kaydedilmiştir. Değerlerde az da olsa kayma vardır ancak elektro-eğirme işleminin polimerlerde herhangi bir bozunmaya neden olmadığı söylenebilir.
- Yapılan mekanik test sonucu elektro-eğirme yöntemi ile hazırlanmış membranların kopma gerilimi 47,13 MPa, elastik modülü 4,1 MPa ve kopma uzaması ise %142 olarak bulunmuştur.
- Hazırlanan membranlar, 3 ay boyunca *in vitro* olarak bozunmaya bırakılmışlardır. Membranların hem ağırlıkça ( $M_w$ ) ve hem de sayıca ( $M_n$ ) ortalama molekül ağırlıklarında düzgün bir azalma izlenmiştir.
- Membranların daha sonra SEM görüntüleri alınmış, bu görüntülerden ortalama fiber çapı:  $517\pm 198\text{ nm}$  ve ortalama gözenek boyutu:  $1076\pm 494\text{ nm}$  olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçta nanofiber yapıda mikrogözeneklere sahip membranların üretildiğinin bir göstergesidir.

- Elektro-eğirme yöntemi ile hazırlanan membranlar literatürde ilk defa basit fakat orijinal bir yaklaşımla dairesel olarak elle katlanmış (“spiral wounding”), daha sonra 8 mm çapında ve 1,5 mm kalınlığında kesilerek makro kanallara sahip üç boyutlu biyobozunur doku iskeleleri hazırlanmıştır (Şekil 4.8).
- Hazırlanan membranlara ve doku iskelelerine iki farklı yaklaşımla simvastatin yüklenmiştir.
- İlk yaklaşımda, simvastatin içeren ilaç çözeltisi, elektro-eğirme öncesi hazırlanan polimer blendi ile homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştırılmıştır. Simvastatin içeren polimer çözeltisi daha sonra elektro-eğirme ile proses edilmiş ve membranlar hazırlanmıştır. Hazırlanan simvastatin yüklü membranlardan yine dairesel olarak elle katlama yöntemi ile doku iskeleleri üretilmiştir.
- İkinci yaklaşım ise, yığın salıma uygun bir sistem için, simvastatin elektro-eğirme ile üretilen membranlardan hazırlanan üç boyutlu doku iskeleleri üzerine damlatılmıştır.
- Hazırlanan doku iskeleleri ve bunların simvastatin yüklü formları durgun hücre kültür ortamlarında hücre tutunması ve çoğalması bakımından değerlendirilmiş, hücrelerde herhangi bir ters etki gözlenmemiş ve tüm gruplardaki hücreler birbirlerine yakın çoğalma profilleri göstermişlerdir.
- Çalışmanın bu aşamasında, birinci aşama hayvan deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde, elektro-eğirme ile üretilen membranlardan hazırlanan doku iskeleleri, bunların simvastatin yüklü formları literatürde sıçanlar için tanımlanan kritik büyüklükte kranial kemik defekti modeline uygun olarak hayvanların kranial bölgesinde oluşturulan 8 mm dış çapında defektler için onarım malzemesi olarak denenmiştir.

- Bu amaçla hayvanlar, kontrol grubu, boş doku iskelesi grubu, elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenen grup (kontrollü salım grubu), elektro-eğirme sonrası simvastatin damlatılan grup (ani “burst” salım grubu) olarak 4 gruba ayrılmış, 6 ay süren çalışmalarda 1, 3 ve 6. aylarda her gruptan hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler alınmıştır. Örnekler fikse edilmiş ve  $\mu$ CT analizleri ve histolojik değerlendirmeleri gerçekleştirilmiştir. Grupların birbirleriyle karşılaştırılmasında ve elde edilen sonuçlarının anlamlılığının ölçülmesi için istatistik testler yapılmıştır.
- Kritik büyüklükteki kraniyal defekt boyunca çeşitli intramembranöz ve bazı bölgelerde endokondral kemikleşmenin aşamaları gözlenmiştir. İlk ayda, yabancı cisim dev hücreleri ile birlikte bazı dağınık polimorf nükleer lökositler kaydedilmiş, doku reaksiyonu zamanla ince bir kollajen bantlar oluşturarak azalmış, polimerik partiküllerin bozunduğu olduğu bölgelerde fibroblastlarla birlikte damarlanma başlamıştır. Gruplar arasında doku cevabı skorları açısından herhangi bir fark tespit edilmemiştir.
- Kemikleşme, kortikal kemiğin uç kısımlarından doku iskelesinin içlerine doğru başlamıştır. Her iki simvastatin yüklü doku iskelesi grubunda kortikal kemik uçlarında, kortikal tabakalara yakın olan makro kanalların duvarlarında ve kıkırdak adacıklarında çok sayıda yeni kemik matrisini sentezleyen aktif osteoblastlar gözlenmiştir.
- Kontrol grubuna ait iyileşme skorları altıncı ayda diğer gruplarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Simvastatin yüklü doku iskeleleri gruplarına histolojik kemik defekti iyileşme skorları, boş doku iskelesi grubuna ait skordardan yüksek olduğu gösterilmiştir. Elektro-eğirme sırasında simvastatin yüklenen grupta (kontrollü salım grubu, grup C) iyileşme önemli derecede hızlanmıştır. Bu gruba ait altıncı ay kemik defekti iyileşme skorları, simvastatin içermeyen boş doku iskelesi grubundan ve elektro-

eğirme sonrası simvastatin damlatılan gruptan (ani salım grubu, grup D) yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

- Bu sonuçlara göre elektro-eğirme sırasında doku iskelelerine yüklenen simvastatinin, özellikle üç aydan altı aya kadar olan süreçte kritik büyüklükteki kemik defekti iyileşmesine önemli bir etkisi olduğu söylenebilir. Başka bir ifadeyle kontrollü olarak salımı sağlanan simvastatinin, ani olarak salınmasından daha etkilidir. Ayrıca bu grupta, altıncı aya ait iyileşme skorları yine bu grubun üçüncü ay iyileşme skorlarına göre önemli derecede yüksektir ( $p<0.05$ )
- Doku iskelelerine ait makro kanallar osteoklastların ve osteoblastların tutunmasına ve periferden başlayarak merkeze doğru yayılmalarına olanak sağlamıştır. Bu duruma ek olarak, simvastatinin öncül osteoblastlardan ve osteoklastlardan meydana gelen dura mater ve periostu sözü geçen makro kanallara ve nanofiber yapıdaki doku iskelelerine doğru indüklediği belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen en anlamlı sonuç, 3. ve 6. altıncı aylarda makro kanallar boyunca mineralize olmuş kemik dokusunun gelişmesidir.
- Çalışmanın son bölümünde ikinci aşama hayvan deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bir önceki hayvan çalışmasında olduğu bu çalışmada da sıçanlar için belirlenen kritik büyüklükte kraniyal kemik defekti modeli seçilmiştir. Hayvan modeline uygun olarak sıçanların kraniyal bölgesinde 8 mm çapında kritik büyüklükte kemik defekti oluşturulmuştur.
- Oluşturan defektlere, mezenkimal kök hücre içeren doku iskeleleri (*Doku iskelesi + kök hücre grubu*) yerleştirilmiş, yalnızca kök hücre içeren defekt grubu (*Kök hücre grubu*), bir önceki hayvan çalışmasında incelenen yalnız doku iskelesi (*Doku iskelesi grubu*) ve boş defekt grubu (*Kontrol grubu*) karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

- 6 ay süren çalışmada 1, 3 ve 6. ayların sonunda her gruptan hayvanlar sakrifiye edilerek numuneler alınmıştır. Numuneler fikse edilmiş, öncelikle MicroCT analizleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 3-5 µm kalınlığında kesitler alınmış ve grupların birbirleriyle karşılaştırmalı olarak istatistik programlarının yardımıyla histolojik değerlendirme gerçekleştirilmiştir.
- İncelenen tüm zaman dilimlerinde (1, 3 ve 6. aylarda) doku iskelesi ve kök hücre uygulanan gruplarında, defekt alanı ile oranlanan yeni oluşan kemik miktarı, aktif osteoblastlarla çevrili yeni kemik uzunluğu ve kan damarı miktarı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha yüksek olarak belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).
- 3. ay sonunda yalnız kök hücre uygulanan gruptaki yeni kemik miktarı hücre ve doku iskelesinin beraber uygulandığı gruba göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).
- 6. ayın sonunda aktif kemik yapıcı hücreler olan osteoblastlarla çevrili yeni kemik uzunluğu tek başına doku iskelesi uygulanan grupta ve sadece kök hücre ve kontrol gruplarına göre anlamlı olduğu görülmüştür ( $p<0.05$ ).
- Doku iskelesi ve hücre uygulanan gruplarda defekt alanında implant tanecikleri çevresindeki yeni kan damarı sayısı 3. ve 6. aylarda yalnız hücre ve yalnız doku iskelesi uygulanan gruplara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ).
- Bu sonuçlara göre incelenen tüm zaman dilimlerinde hücre ve doku iskelesi uygulanan gruplarda aktif kemik yapımı ve yeni damar oluşumu hızlanmıştır (Şekil 4.15-16).

- Tüm zaman dilimlerinde biyomalzemeye doku yanıtı, hücrelere olan yanıtta daha düşük olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Bu sonuca göre, doku iskelesinin biyoyumlu olduğuna karar verilmiştir.
- Doku iskelesi komşuluğunda lenfosit, makrofaj ve yer yer yabancı cisim dev hücreleri izlenmekle birlikte hiçbir örnekte ve zaman diliminde fibrozis (skar dokusu), nekroz ve ciddi yabancı cisim reaksiyonuna rastlanmamıştır. Doku iskelesi, hem perifer hem de merkezden başlayarak sirküler kanallarının içinde düzenli ve sağlıklı kemik yapımına rehberlik etmiştir. Hücre ile beraber uygulandığında kanallardaki kemik yapımını istatistiksel anlamı olarak arttırmıştır ( $p < 0.05$ ). Bu sonuç, lenfomonositer infiltrasyonun kemikleşmeye engel olmadığını göstermektedir.
- Çalışmanın bitiminde, kavitede doku iskelelerinin makro kanallı yapısal bütünlüğünü aynen koruduğu ve 6. ayın sonunda hiçbir kavitede tam kemikleşmenin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.15-16).
- İkinci aşama hayvan deneylerinde  $\mu$ CT analizleri, yalnızca 6. ay sonundaki Doku iskelesi + Kök Hücre Grubu için yapılmıştır. Histoloji sonuçlarına paralel olarak 6. ay için alınan MicroCT sonuçları, doku iskelesinin makro kanalları boyunca merkezden başlayan bir kemikleşme olduğunu göstermiştir.
- $\mu$ CT sonuçlarında yeni kemik hacminin toplam defekt hacmine oranı ortalama % 8.45 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, histolojik değerlendirmede elde edilen yeni kemik oluşumunun toplam defekt hacmine oranı ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu görülmüştür. Bunun nedeni ise,  $\mu$ CT taramalarında yalnızca mineralize olmuş kemik dokusunun ölçüldüğü henüz mineralize olmamış kemik öncüllerinin ölçüme dahil olmamasıdır.

## 6. KAYNAKLAR

Aalami, O.O., Nacamuli, R.P., Lenton, K.A., Cowan. CM, Fang, T.D., Fong, K.D., 2004, Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults, *Plast. Reconstr. Surg.*, 114(3): 713–720.

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

Ahsan T. and Nerem, R.M., 2005, Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry, *Orthod. Craniofac. Res.*, 8: 134.

Alsberg E., Hill E.E., Mooney D.J., 2001, Craniofacial tissue engineering. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 12(1): 64-75.

An, Y.H., Woolf, S.K., Friedman, R.J., 2000, Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices, *Biomaterials*, 21(24): 2635–2652.

Aronin C.E.P., Sadik K.W., Lay L.A., Rion D.B., Tholpady S.S., Ogle R.C., Botchwey, E.A., 2009, Comparative effects of scaffold pore size, pore volume, and total void volume on cranial bone healing patterns using microsphere-based scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res.*, 89A: 632–641.

Aydın, H.M., 2008, *Biyobozunur Polimerik Materyaller ve/veya Bunların Kalsiyum Fosfat Kompozitlerinin Üretimi ve Sert Doku Onarımında Kullanımı*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 165s.

Aykan, T., 2007, *Simvastatinin Deneysel Alveol Defektlerine Etkilerinin Değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007, 108s.

Babensee J.E., McIntire L.V., Mikos A.G., 2000, Growth factor delivery for tissue engineering. *Pharmaceutical Research*, 17:497-504.

Bacon, A., 2002, Polymers – a synthetic or natural choice? *Drug Discovery Today*, 7(24): 1202–1203.

Badami, A.S., Kreke, M.R., Thompson, M.S., Riffle, J.S., 2006, Effect of fibre diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates, *Biomaterials*, 27: 596.

Bancroft J.D. and Stevens A., 1996, *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th ed. Chapter 15, Churchill Livingstone, Newyork, 309-339p.

Bauer D.C., Mundy G.R., Jamal S.A., Black D.M., Cauley, J.A., Ensrud K.E., van der Klift M., Pols H.A.P., 2004, Use of statins and fracture: results of 4 prospective studies and cumulative meta-analysis of observational studies and controlled trials, *Arch. Intern. Med.*, 164: 146-152.

Boccaccini A.R., Maquet V., 2003, Bioresorbable and bioactive polymer/ Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications, *Compos. Sci. Technol.*, 63: 2417–2429.

Borenstein, J.T., Weinberg, E.J., Orrick, B.K., Sundback, C., Kaazempur-Mofrad M.R., Vacanti, J.P., 2007, Microfabrication of three-dimensional engineered scaffolds. *Tissue Eng*, 13(8):1837-1844.

Bosch C., Melsen B., Vargervik K., 1998, Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials, *J. Craniofac. Surg.*, 9: 310-316.

Bosetti, M., Boccafoschi, F., Leigheb, M., Cannas, M.F., 2007, Effect of different growth factors on human osteoblasts activities: a possible application in bone regeneration for tissue engineering, *Biomolecular Engineering*, 24: 613–618.

Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, D.D., Schwartz, Z., 1996, Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response, *Biomaterials*, 17(2): 137-146.

Boyne, P.J., 1966, Osseous healing after oblique osteotomy of the mandibular ramus, J. Oral. Surg., 24(2): 125-133.

Bölgen N., Menceloğlu Y.Z., Aatay K., Vargel İ., Pişkin E., 2005, *In vitro* and *in vivo* degradation of non-woven materials made of poly(e-caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning at different conditions, J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 16: 1537–1555.

Bölgen N., Vargel İ., Korkusuz P., Menceloğlu Y. Z., Pişkin E., 2007, *In vivo* performance of antibiotic embedded electrospun PCL membranes for prevention of abdominal adhesions, J. Biomedical. Mater. Res. Part B: Applied Biomaterials, 81: 530-543.

Bran, G.M., Stern-Straeter, J., Hörmann, K., Riedel, F., Goessler, U.R., 2008, Apoptosis in bone for tissue engineering, Archives of Medical Research, 39: 467-482.

Bronzino, J.D, 1995, The Biomedical Engineering Handbook, CRC Press.

Burg, K.J.L., Porter, S., Kellam, J.F., 2000, Biomaterial developments for bone tissue engineering, Biomaterials, 21(23): 2347-2359.

Burkoth, A.K., Burdick, J. and Anseth, K.S., 2000, Surface and bulk modifications to photocrosslinked polyanhydrides to control degradation behaviour, Journal of Biomedical Materials Research, 51: 352–359.

Canter, H.İ., 2003, Kalvariyal Kemik Defekti Modelinde Bone Morphogenic Protein-2 ve Transforming Growth Factor- $\beta$  Kullanılmasının Allogreft Yaşamına Etkisi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara, 81s.

Caplan, A.I., 2000, Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. *Tissue Eng.*, 6: 1–8.

Cauley, J., Jackson, R., Pettinger, M., Lacroix, A., Bauer, D., Chen, Z., Daugherty, S., Hsia, J., Lewis C., McGowan J., McNeeley S., Passaro, M., 2000, Statin use and bone mineral density (BMD) in older women, *J. Bone Min. Res.*, 15: 155.

Chang, M.C. and Tanaka, J., 2002a, FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde, *Biomaterials*, 23(24): 4811–4818.

Chang, M.C. and Tanaka, J., 2002b, XPS study for the microstructure development of hydroxyapatite-collagen nanocomposites crosslinked using glutaraldehyde, *Biomaterials*, 23: 3879–3885.

Chasman D.I., Posada D., Subrahmanyam L., Cook N.R., Stanton V.P. Jr, Ridker P.M., 2004, Pharmacogenetic study of statin therapy and cholesterol reduction. *J. Am. Med. Assoc.*, 291: 2821-2827.

Chen, D.R., Bei, J.Z., Wang, S.G., 2000, Polycaprolactone microparticles and their biodegradation, *Polymer Degradation and Stability*, 67: 455-459.

Chen, F., Lee, C.N., Teoh, S.H., 2007, Nanofibrous modification on ultra-thin poly( $\epsilon$ -caprolactone) membrane via electrospinning, *Materials Science and Engineering C*, 27: 325-332.

Chen, G.P., Ushida, T. and Tateishi, T., 2001, Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering, *Materials Science and Engineering C* 17: 63–69.

Chen, G.Q., Wu, Q., 2005, The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials, *Biomaterials*, 26: 6565–6578.

Chen, M.K. and Badylak, S.F., 2001, Small bowel tissue engineering using small intestinal submucosa as a scaffold, *Journal of Surgical Research*, 99: 352–358.

Chen, Z.Z., Li, D.C., Lu, H., Tang, Y.P., Sun, M.L. and Wang, Z., 2004, Fabrication of artificial bioactive bone using rapid prototyping, *Rapid Prototyping Journal*, 10(5): 327–333.

Clarke, K.I., Graves, S.E., Wong, A.T.C. and Triffitt, J.T., 1993, Investigation into the formation and mechanical properties of a bioactive material based on collagen and calcium phosphate, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 4: 107–110.

Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC., 1993, Rekombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in acanine long- bone segmental defect model, *Clin. Orthoped. Related Research*, 301: 302-312.

Cooper, J.A., Lu, H.H., Ko, F.K., Freeman, J.W. and Laurencin, CT., 2005 2000, Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation, *Biomaterials*, 26: 1523–1532.

Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L., 1999, *Robbin's Pathologic Basis of Disease*. 6th ed. WB Saunders Co., London.

Craft, P.D., Mani, M.M., Pazel, J., Masters, F.W., 1974, Experiment study of healing in fractures of membranous bone. *Plast. Reconstr. Surg.*, 53(3): 321-325.

Curran, J.M., Chen, R. and Hunt, J.A., 2006, The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate, *Biomaterials*, 27: 4783.

Dahlin, C., Alberius, P., Linde, A., 1991, Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique, *J. Neurosurg.*, 74(3): 487–491.

Damien C.J. and Parsons J.R., 2001, Bone graft and bone graft substitutes: A review of current technology and applications, *J. Appl. Biomater.*, 2: 187-208.

Darling, A.L. and Sun, W., 2005, Free-form fabrication and micro-CT characterization of poly-epsilon-caprolactone tissue scaffolds, *IEEE Eng Med Biol. Mag.*, 24, 78.

Das, S., Hollister, S.J., Flanagan, C., Adewunmi, A., Bark, K., Chen, C., Ramaswamy, K., Rose, D. and Widjaja, E., 2003, Freeform fabrication of Nylon-6 tissue engineering scaffolds, *Rapid Prototyping Journal*, 9(1): 43–49.

Day R.M., Boccaccini A.R., Shurey S., Roether J.A., Forbes A., Hench L.L., 2004, Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds, *Biomaterials*, 25: 5857–66.

Devin, J. E., Attawia, M.A., Laurencin, C.T., 1996, Three-dimensional degradable porous polymer-ceramic matrices for use in bone repair, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 7: 661-669.

Edwards C.J., Hart D.J., Spector T.D., 2000, Oral statins and increased bone-mineral density in postmenopausal women, *Lancet*, 355: 2218-2219.

Engelberg, I., Kohn, J., 1991, Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: A comparative study, *Biomaterials*, 12 (3): 292-304.

Enneking, W. and Campanacci, D., 2001, Retrieved human allografts: a clinicopathological study, *J. Bone Joint Surg.*, 83A(7): 971–986.

Enneking, W. and Mindell, E., 1991, Observations on massive retrieved human allografts, *J. Bone Joint Surg.*, 73A: 1123–1142.

Fambri L., Migliaresi C., Kesenci K., Pişkin E., 2002, Biodegradable Polymers, In: R. Barbucci, editor. *Integrated Biomaterials Science*, Kluwer Acad Plenum Press Publication, New York, 119-187p.

Fang, Z., Starly, B. and Sun, W., 2005, Computer-aided characterization for effective mechanical properties of porous tissue scaffolds, *Computer-Aided Design*, 37(1): 65–72.

Fennis, J.P., Stoeltinga, P.J., Jansen, A., 2002, Mandibular reconstruction: a clinic and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 31(3): 281-286.

Fındıkçioğlu, K., 2006, Trombositten Zengin ve Fakir Plazmanın Kritik Boyutta Kemik Defekti İyileşmesine Etkisi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara, 104s.

Formhals, A., 1934, Process and apparatus fo preparing artificial threads, US Patent 1,975,504.

Frame, J.W., 1980, A convenient animal model for testing bone substitute materials, *J. Oral Surg.*, 38(3): 176–180.

Freed, L.E. and Vunjak-Novakovic, G., 1998, Culture of organized cell communities, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 33: 15–30.

Freed, L.E., Guilak, F., Guo, X.E., Gray, M.L., Tranquillo, R., Holmes, J.W., Radisc, M., Sefton, M.V., Kaplan, D. and Vunjak-Novakovic, G., 2006, Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors and signaling, *Tissue Engineering*, 12(12): 3285–3305.

Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G., Biron, R.J., Eagles, D.B., Lesnoy, D.C., Barlow, S.K., Langer, R., 1994, Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering, *Biotechnology*, 12: 689–693.

Friedman, C.D., Costantino, P.D., Takagi, S., Chow, I.C., 1998, Bone source hydroxyapatite cement: a Novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction, *J. Biomed. Mater. Res.*, 43(4): 428-432.

Furberg C.D., 1999, Natural statins and stroke risk, *Circulation*, 99: 185-188.

Gadzag A.R., Lane J.M., Glaser D., Forster R.A., 1995, Alternative to autogenous bone graft: efficacy and indications, *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 3: 1–8.

Garrett I.R., Gutierrez G., Mundy G.R., 2001, Statins and bone formation, *Current Pharmaceutical Design*, 7: 715-736.

Garrett I.R., Mundy G., 2002, The role of statins as potential targets for bone formation. *Arthritis Res* 2002, 4: 237-240.

Gartner L.P. and James L.H., 2000, *Color Atlas of Histology*, 3rd ed. Chapter 4, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 73p.

Gerçek Beşkardeş, I., 2008, *Biyoseramik ve Biyosinyal Moleküllerle Desteklenmiş Poli(Kaprolakton) Doku İskeleleri: Sentez, Karakterizasyon ve Kemik Doku Mühendisliği Uygulamaları*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 113s.

Glowacki, J., Altobelli, D., Mulliken, J.B., 1981, Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects, *Calcif. Tissue Int.*, 33(1): 71–76.

Goldberg, V., et al., 1984, Improved acceptance of frozen bone allografts in genetically mismatched dogs by immunosuppression, *J. Bone Joint Surg.*, 66, 937–950.

Goldberg, V., et al., 1985, Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation, *J. Orthop. Res.*, 3(4): 389–404.

Goldberg, V., et al., 1990, Biological and physical properties of autogenous vascularized fibular grafts in dogs, *J. Bone Joint Surg.*, 72A, 801–810.

Gomes, M.E., Godinho, J.S., Tchalamov, D., Cunha, A.M., and Reis, R.L., 2002, Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing

methodologies, morphology, degradation and mechanical properties, *Mater. Sci. Eng., C* 20(1-2): 19-26.

Gomes, M.E., Godinho, J.S., Tchalamov, D., Cunha, A.M., and Reis, R.L., 2002, Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties, *Mater. Sci. Eng., C* 20(1-2): 19-26.

Gomes, M.E., Sikavitsas, V.I., Behravesch, E., Reis, R.L. et al., 2003, Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured on starch-based three-dimensional scaffolds, *J Biomed. Mater. Res. A*, 67: 87.

Grande, D.A., Halberstadt, C., Naughton, G., Schwartz, R., Manji, R., 1997, Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts, *J. Biomed. Res.*, 34(2): 211-220.

Griffith, L.G., 2002, Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961: 83–95.

Gross, R.A., Kalra, B., 2002, Biodegradable polymers for the environment, *Science*, 297, 803-807.

Guarino, V., Causa, F., Taddei, P., Foggia, M., Ciapetti, G., Martini, D., Fagnano, C., Baldini, N., Ambrosio, L., 2008, Poly(lactide) acid fibre-reinforced polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 29: 3662–3670.

Guarino, V., Causa, F., Taddei, P., Foggia, M., Ciapetti, G., Martini, D., Fagnano, C., Baldini, N., Ambrosio, L., 2008, Poly(lactide) acid fibre-reinforced polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 29: 3662–3670.

Gutowska, A.B., Jeong, B., Jasionowski, M., 2001, Injectable gels for tissue engineering, *Anat. Rec.*, 263(4): 342-349.

Han, J., Branford-White, C.J., Zhu, L.-M., 2009, Preparation of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/poly(trimethylene carbonate) blend nanofibers by electrospinning, *Carbohydrate Polymers*, in press

Hanes, J., Chiba, M. and Langer, R., 1998, Degradation of porous poly(anhydride-co-imide) microspheres and implications for controlled macromolecule delivery, *Biomaterials*, 19: 163–172.

Hedberg, E.L., Shih, C.K., Lemoine, J.J., Timmer, M.D., K. Liebschner, M.A., Jansen, J.A. and Mikos, AG., 2005b, In vitro degradation of porous poly(propylene fumarate)/poly(DL-lactico-glycolic acid) composite scaffolds, *Biomaterials*, 26(16): 215.

Hildebrand, T., Laib, A., Müller, R., Dequeker, J., Rügsegger, P., 1999, Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus, *J. Bone Miner. Res.*, 14: 1167-1174.

Ho, S.T. and Hutmacher, D.W., 2006, A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds, *Biomaterials*, 27, 1362.

Hollinger, J.O., Kleinschmidt, J.C., 1990, The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials, *J. Craniofac. Surg.*, 1(1): 60–68.

Holmes, R.E., 1979, Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant, *Plast. Reconstr. Surg.*, 63(5): 626-633.

Horiuchi, N. and Maeda. T., 2006, Statins and bone metabolism, *Oral diseases*, 12: 85-101.

Hu, Y., Zhang, C., Zhang, S., Xiong, Z., Xu, J., 2003, Development of porous poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite/collagen scaffold as a BMP delivery system and its use in healing canine segmental bone defect, *Journal of Biomedical. Mat. Res.*, 67A: 591-598.

Huang Z.M., Zhang Y.Z., Kotaki M., Ramakrishna S., 2003, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Comp. Sci. Tech.*, 63: 2223-2253.

Hutmacher D.W., Schantz T., Zein I., Ng K.W., Teoh S.H., Tan K.C., 2001, Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling, *J. Biomed. Mater. Res.*, 55: 203–216.

Hutmacher, D.W., 2000, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, 21: 2529–2543.

Hutmacher, D.W., 2001, Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues – state of the art and future perspectives, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 12(1): 107-124.

Hutmacher, D.W., Sittinger, M. and Risbud, M.V., 2004, Scaffoldbased tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems, *Trends in Biotechnology*, 22(7): 354–362.

Ibim, S.M., Uhrich, K.E., Bronson, R., Eil-Amin, S.F., Langer, R.S. and Laurencin, C.T., 1998, Poly(anhydride-co-imides): in vivo biocompatibility in a rat model, *Biomaterials*, 19: 941–951.

Ismail F.A., 2006, Design and in vitro evaluation of polymeric formulae of simvastatin for local bone induction, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 32 : 1199-206.

Jackson, I.T., Helden G., Marx, R., 1986, Skull bone grafts in maxillofacial and craniofacial surgery, *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 44: 949-955.

Jager, M., Feser, T., Denck, H. and Krauspe, R., 2005, Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured onto three different polymers *in vitro*, *Ann. Biomed. Eng.*, 33: 1319.

Jang J.-H., Castano O., Kim, H.-W., 2009, Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, in press.

Jonsson N., Asplund K., 2001, Does pretreatment with statins improve clinical outcome after stroke? A pilot case-referent study, *Stroke*, 32: 1112-1115.

Junqueira L.C and Carneiro J., 2003, *Basic Histology*, 10th ed. Chapter 8, McGraw-Hill, New York, 144-146p.

Karageorgiou, V., Kaplan, D., 2005, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials.*, 26(27): 5474-5491.

Kierszenbaum A.L., 2002, *Histology and cell biology: an introduction to pathology*, Chapter 5, Mosby Inc., St. Louis, 127 p and 131p.

Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Hydroxyapatite/poly(epsilon-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials* 2004; 25: 1279-1287.

Kim, W.S., Vacanti, J.P., Cima, L., Money, D., Upton, J., Puelacher, W.C., Vacanti, C.A., 1994, Cartilage engineered in predetermined shapes employing cell transplantation on synthetic biodegradable polymers, *Plastic Reconstr. Surg.*, 94(2): 233-237.

Kondo, N., Ogose, A., Tokunaga, K., Ito, T., Arai, K., Kudo, N., 2005, Bone formation and resorption of highly purified beta-tricalcium phosphate in the rat femoral condyle, *Biomaterials*, 26(28): 5600–5608.

Kose, G.T., Korkusuz, F., Ozkul, A., Soysal, Y., Ozdemir, T., Yildiz, C. and Hasirci, V., 2005, Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices, *Biomaterials*, 26(25): 5187–5197.

Krebsbach, P.H., Mankani, M.H., Satomura, K., Kuznetsov, S.A., Robey, P.G., 1998, Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells, *Transplantation*, 66(10): 1272–1278.

Kweon, H., Yoo, M.K., Park, I.K., Kim, T.H. et al., 2003, A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering, *Biomaterials*, 24: 801.

Kweon, H.Y., Yoo, M.K., Park, I.K., Kim, T.H., Lee, H.C., Lee, H.S., Oh, J.S., Akaike, T., Cho, C.S., 2003, A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering, *Biomaterials*, 24, 801–808.

Lalan, S., Pomerantseva, I. and Vacanti, J.P., 2001, Tissue engineering and its potential impact on surgery, *World J. Surg.*, 25: 1458.

Lam, C.X.F., Mo, X.M., Teoh, S.H. and Hutmacher, D.W., 2002, Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer, *Materials Science and Engineering C*, 20: 49–56.

Langer, R. and Vacanti, J.P., 1993, Tissue engineering, *Science*, 260: 920-926.

Langer, R. and Wise D.L., 1984, *Medical Applications of Controlled Release*, Vol.I and II. CRC Press, Boca Raton, FL.

Lannutti J., Reneker D., Ma T., Tomasko D., Farson D., 2007, Electrospinning for tissue engineering scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C*, 27: 504–509.

Lee, D. and Ansell, C., 2003, Emerging applications for biomaterials in tissue engineering, *MD Technology Watch Series*, Article 3.

Lee, K.H., Kim, H.Y., Khil, M. S., Ra Y.M., Lee, D.R., 2003, Characterization of nano-structured poly( $\epsilon$ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning, *Polymer*, 44: 1287-1294.

Lee, S.H., Shin H., 2007, Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 339–359.

Levy, I., Paldi, T. and Shoseyov, O., 2004, Engineering a bifunctional starch-cellulose cross-bridge protein, *Biomaterials*, 25(10): 1841.

Li W., Laurencin C., Caterson E., Tuan R., Ko F., 2002, Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res.*, 60: 613-621.

Lieberman, J.R., Daluiski, A., Einhorn, T.A., 2002, The role of growth factors in the repair of bone, Biology and clinical applications, *J. Bone Jt. Surg.*, 84-A: 1032–1044.

Lin, A.S., Barrows, T.H., Cartmell, S.H. and Guldberg, R.E., 2003, Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds, *Biomaterials*, 24: 481.

Liu X. and Ma P.X., 2004, Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Ann. Biomed. Eng.*, 32(3): 477-486.

Liu, C., Xia, Z., Czernuszka, J.T., 2007, Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering, *Chemical Engineering Research and Design Part A*, 85(A7): 1051–1064.

Liu, D.M., 1997, Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8: 227–232.

Lowry, K.J., Hamson, K.R., Bear, L., Peng, Y.B., Calaluce, R., Evans, M.L., Anglen, J.O. and Allen, W.C., 1997, Polycaprolactone/glass bioabsorbable

implant in a rabbit humerus fracture model, *Journal of Biomaterials Research*, 36: 536–541.

Lu, L., Peter, S.J., Lai, H.L., 2000a, In vitro degradation of porous poly(L-lactic acid) foams, *Biomaterials*, 21: 1595–1605.

Lu, L., Peter, S.J., Lyman, M.D., 2000b, In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams, *Biomaterials*, 21: 1837–1845.

Lu, M., Rabie, A.B.M., 2004, Quantitative assessment of early healing of intramembranous and endochondral autogenous bone grafts using micro-computed tomography and Qwin image analyzer, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 33: 369-376.

Luu, Y.K., Kim, K., Hsiao, B.S., Chu, B. and Hadjiargyrou, M., 2003, Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers, *Journal of Controlled Release*, 89(2): 341–353.

Ma P.X, Choi J.W., 2001, Biodegradable Polymer Scaffolds with Well-Defined Interconnected Spherical Pore Network, 7(1): 23-33.

Ma P.X., 2004, Scaffolds for tissue fabrications, *Mater. Today*, 7: 30-40.

Ma, P.X. and Zhang, R., 2000, Fibrillar Matrices, US Patent 6,146, 892.

Ma, P.X. and Zhang, R., 2001, Porous composite materials, US Patent 6,281,257.

Maquet V., Boccaccini A.R., Pravata L., Notingher I., Jerome R., 2004, Porous poly([alpha]-hydroxyacid)/Bioglass(R) composite scaffolds for bone tissue engineering. I: Preparation and *in vitro* characterisation, *Biomaterials*, 25: 4185–4194.

Marques, A.P. and Reis, R.L., 2005, Hydroxyapatite reinforcement of different starch-based polymers affects osteoblast-like cells adhesion/spreading and proliferation, *Materials Science and Engineering: C*, 25(2): 215.

Meenen, N.M., Osborn, J.F., Dallek, M. et al., 1992, Hydroxyapatiteceramic for juxta-articular implantation, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 3: 345–351.

Miko, A.G. and Temenoff, J.S., 2000, Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering, *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 13(2): 114–119.

Mikos, A.G., Sarakinos, G., Leite, S.M. et al., 1993a, Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation, *J. Biomed. Mater. Res.*, 27: 183-189.

Mikos, A.G., Sarakinos, G., Leite, S.M. et al., 1993b, Laminated threedimensional biodegradable foams for use in tissue engineering, *Biomaterials*, 14: 323-330.

Mikos, A.G., Temenoff, J.S., 2000, Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering, *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, Vol.3, No.2.

Mistry A.S. and Mikos A.G., 2005, Tissue engineering strategies for bone regeneration, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 94: 1–22.

Montjovent, M.O., Mathieu, L., Schmoekel, H., Mark, S., Bourban, P.E., Zambelli, P.Y., et al., 2007, Repair of critical size defects in the rat cranium using ceramicreinforced PLA scaffolds obtained by supercritical gas foaming, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 83(1): 41–51.

Moroni, L., de Wijn, J.R., van Blitterswijk, C.A., 2008, Integrating novel technologies to fabricate smart scaffolds, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 19(5): 543-572.

Muggli, D.S., Burkoth, A.K. and Anseth, K.S., 1999, Crosslinked polyanhydrides for use in orthopedic applications: degradation behaviour and mechanics, *Journal of Biomedical Materials Research*,46(2): 271–278.

Mulliken, J.B., Glowacki, J., 1980, Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region, *Plast. Reconstr. Surg.*, 65(5): 553–560.

Mundy G., Garrett R., Harris S., Chan J., Chen D., Rossini G., 1999, Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins, *Science*, 286 (5446): 1946-9.

Ng K.W., Hutmacher D.W., Schantz J.T., Ng C.S., Too H.P., Lim T.C., Phan T.T., Teoh S.H., 2001, Evaluation of ultra-thin poly(epsilon-caprolactone) films for tissue-engineered skin, *Tissue Engineering*, 7: 441–455.

Oh, S.H., Park, I.K., Kim, J.M., Lee, J.H., 2007, In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method, *Biomaterials*, 28(9): 1664-1671.

Ohgushi, H., Miyake, J., Tateishi, T., 2003, Mesenchymal stem cells and bioceramics: strategies to regenerate the skeleton. *Novartis Found Symp*, 249: 118-127.

Ono I, Tateshita, T, Satou, M., Sasaki, T., Matsumoto, M., Kodama, N., 1999, Treatment of large, complex-form cranial bone defects using hydroxyapatite ceramic implants, *Plastic Reconstr. Surg.*, 104: 339–349.

Özeç, İ., 2003, Lokal Olarak Uygulanan Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2'nin Distraksiyon Osteogenezi Üzerine Etkisinin Deneysel Olarak İncelenmesi, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas.

Özgürbüz, L.M., 2006, Sert Doku Onarımı İçin Zenograft Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 76s.

Pelker, R. and Friedlaender, G., 1987, Biomechanical aspects of bone autografts and allografts, *Orthop. Clin. N. Am.*, 18: 235–239.

Peter, S.J., Lu, L., Kim, D.J. and Mikos, A.G., 2000, Marrow stromal osteoblast function on a poly(propylene fumarate)/ $\beta$ -tricalcium phosphate biodegradable orthopaedic composite, *Biomaterials*, 21: 1207–1213.

Peter, S.J., Miller, M.J., Yasko, A.W., Yaszemski, M.J. and Mikos, A.G., 1998, Polymer concepts in tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)*, 43: 422–427.

Peter, S.J., Miller, S.T., Zhu, G. et al., 1998, In vivo degradation of a poly(propylene fumarate)/  $\beta$ -tricalcium phosphate injectable composite scaffold, *J. Biomed. Mater. Res.*, 41: 1-7.

Pişkin E, Biodegradable Polymers in Medicine. In: G. Scott editor. *Degradable Polymers: Principles and Applications*. Dordrecht: Kluwer Acad Publ, 2002. P.321-377.

Pişkin E., Bölgen N., Eğri S., İsoğlu İ.A., 2007, Electrospun matrices made of poly( $\alpha$ -hydroxy acids) for medical use, *Nanomedicine*, 2(4): 441-457

Pişkin E., İsoğlu İ.A., Bölgen N., Griffiths S., Vargel İ., Çavuşoğlu T., Korkusuz P., Güzel E., Cartmell S., 2009, *In vivo* Performance of Simvastatin Loaded Electrospun Spiral-Wounded Polycaprolactone Scaffolds in Reconstruction of Cranial Bone Defects in a Rat Model, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 90A(4): 1137-1151.

Pitt, C.G., 1990, Poly( $\epsilon$ -caprolactone) and its copolymers. In: Chassin M, Langer R, editors. *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. Dekker, New York, 71–119p.

Pitt, C.G., Chasalow, F.I., Hibionada, Y.M., Klimas, D.M., Schindler, A., 1981, Aliphatic polyesters I: the degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) in vivo, NIDA Research Monograph, 28, 232–253.

Prabhakaran, M.P., Venugopal J., Ramakrishna S., 2009, Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering, Acta Biomaterialia, in press.

Pratt, A.B., Weber F.E., Schmoekel H.G., Müller R., Hubbell J.A., 2004, Synthetic extracellular matrices for in situ tissue engineering, Biotechnol. Bioeng. 86: 27-36.

Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S.M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., et al., 2001, Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells, N. Engl. J. Med., 344(5): 385–386.

Quian, H., Bei, J., Wang, S., 2000, Synthesis, characterization and degradation of ABA block copolymer of L-lactide and  $\epsilon$ -caprolactone, Polymer and Stability, 68: 423-429.

Rabkin, E. and Schoen, F.J., 2002, Cardiovascular tissue engineering, Cardiovascular Pathology, 11: 305–317.

Ramakrishna, S., Mayer, J., Wintermantel, E., Leong, K.W., 2001, Biomedical applications of polymer-composite materials: a review, Comp. Sci. Tech. 61: 1189–224.

Ranucci, C.S., Kumar, A., Batra, S.P., Moghe, P.V., 2000, Control of hepatocyte function on collagen foams: sizing matrix pores toward selective induction of 2-D and 3-D cellular morphogenesis, Biomaterials, 21: 783–793.

Rauch U., Osende J.I., Chesebro J.H., Fuster V., Vorchheimer D.A., Harris K., Harris P., Sandler D.A., Fallon J.T., Jayaraman S., Badimon J.J., 2000, Statins

and cardiovascular diseases: the multiple effects of lipid-lowering therapy by statins, *Atherosclerosis*, 153: 181-189.

Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J., Boccaccini, A.R., 2006, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 27(18): 3413–3431.

Risbud, M., 2001, Tissue engineering: implications in the treatment of organ and tissue defects, *Biogerontology*, 2: 117.

Rodrigues, C.V.M., Serricella, P., Linhares, A.B.R., Guerdes, R.M., Borojevic, R., Rossi, M.A., Duarte, M.E.L. and Farina, M., 2003, Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 24: 4987–4997.

Rogers M.J., 2000, Statins: lower lipids and better bones?, *Nature Medicine*, 6: 21-23.

Rothamel, D., Schwarz, F., Sager, M., Herten, M., Sculean, A. And Becker, J., 2005, Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat, *Clinical Oral Implants Research*, 16(3): 369–378.

Sachlos, E. and Czernuszka, J.T., 2003a, Making tissue engineering scaffold work: review on the application of SFF technology to the production of tissue engineering scaffolds, *European Cells and Materials*, 5: 29–40.

Sachlos, E., Czernuszka, J.T., 2003, Making tissue engineering scaffolds work: review on the application of solid freeform fabrication, technology to the production of tissue engineering scaffolds, *European Cells and Materials*, 5: 29-40.

Sachlos, E., Reis, N., Ainsley, C., Derby, B. and Czernuszka, J.T., 2003b, A process to make collagen scaffolds with an artificial circulatory system using

rapid prototyping, *Materials Research Society Symposia Proceedings*, 758: LL5.3.1–LL5.3.6.

Sachlos, E., Reis, N., Ainsley, C., Derby, B. and Czernuszka, J.T., 2003c, Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by, SFF., *Biomaterials*, 24: 1487–1497.

Schantz J.T., Hutmacher D.W., Lam C.X.F., Bringmann M., Wong K.M., Lim T.C., Chou N., Guldberg R., Teoh S.H., 2003, Repair of calvarial defects with customised tissue-engineered bone grafts - II. Evaluation of cellular efficiency and efficacy *in vivo*, *Tissue Eng.*, 9: 127-139.

Schantz J.T., Teoh S.H., Lim T.C., Endres M., Lam C.X., Hutmacher D.W., 2003, Repair of calvarial defects with customized tissue-engineered bone grafts - I. Evaluation of osteogenesis in a three-dimensional culture system, *Tissue Eng*, 9: 113-126.

Schepers E., de Clercq M., Ducheyne P., Kempeneers R., 1991, Bioactive glass particulate material as filler for bone lesions, *J. Oral. Rehab.*, 18: 439–52.

Schmitz, J.P. and Hollinger, O., 1986, The critical size defects as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 205: 299-308.

Serrano, M.C., Pagani, R., Vallet-Regi, M., Pena, J., 2004, *In vitro* biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts, *Biomaterials*, 25: 5603.

Sharma B. and Elisseeff J.H., 2004, Engineering structurally organized cartilage and bone tissues, *Ann. Biomed. Eng.*, 32: 148–159.

Shepherd J., Hunninghake D.B., Barter P., McKenney J.M., Hutchinson H.G., 2003, Guidelines for lowering lipids to reduce coronary artery disease risk: a

comparison of rosuvastatin with atorvastatin, pravastatin, and simvastatin for achieving lipid-lowering goals, *J. Am. Cardiol.*, 91: 11-17.

Sikavitsas, V.I., Temenoff, J.S., Mikos, A.G., 2001, Biomaterials and bone mechanotransduction, *Biomaterials*, 22: 2581-2593.

Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., Trehan, A., 2004, Poly( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres and nanospheres: an overview, *International Journal of Pharmaceutics*, 278, 1-23.

Smith L.A. and Ma P.X., 2004, Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 39: 125–131.

Sokolsky-Papkov M., Agashi K., Olaye A., Shakesheff K, Domb, A.J., 2007, Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 187–206.

Stancu C. and Sima A., 2001, Statins: mechanism of action and effects, *J. Cell Mol. Med.*, 5(4): 378-87.

Stevens, M.M., 2008, Biomaterials for bone tissue engineering, *Materials Today*, 11(5): 18-25.

Stevenson, S. and Horowitz, M., 1992, Current concepts review: the response to bone allografts, *J. Bone Joint Surg. Am.*, 74A: 939–950.

Stevenson, S., 1987, The immune response to osteochondral allografts in dogs, *J. Bone Joint Surg.*, 69A: 573–582.

Stock, U.A. and Vacanti, J.P., 2001, Tissue engineering: current state and prospects, *Annu. Rev. Med.*, 52: 443.

Sugiyama M., Kodama T., Konishi K., 2000, Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271: 688-692.

Sukhodub, L.F., Moseke, C., Sukhodub, L.B., Sulkio-Cleff, B., Maleev, V.Y., Semenov, M.A., Bereznyak, E.G. and Bolbukh, T.V., 2004, Collagen-hydroxyapatite-water interactions investigated by, X.R.D., piezogravimetry, infrared and Raman spectroscopy, *Journal of Molecular Structure*, 704(1–3): 53–58.

Szycher, M., 1991, *High Performance Biomaterials*, Technicom, Zurich.

Tang, Z.G., Black, R.A., Curran, J.M., Hunt, J.A., Rhodes, N.P., Williams, D.F., 2004, Surface properties and biocompatibility of solvent-cast poly[ε-caprolactone] films, *Biomaterials*, 25: 4741–4748.

Taylor, P.M., Cass, A.E.G. and Yacoub, M.H., 2006, Extracellular matrix scaffolds for tissue engineering heart valves, *Progress in Pediatric Cardiology*, 21: 219–225.

Tessier, P., 1982, Autogen bone graft taken from the calvarium for facial and cranial applications, *Clin. Plas. Surg.*, 9: 531-538.

Thomson, R.C., Yaszemski, M.J., Powers, J.M., Mikos, A.G., 1995, Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone, *J. Biomater. Sci. Polymer Edition*, 7: 23–38.

Thylin, M.R., McConnell J.C., Schmid M.J., Reckling R.R., Ojha J., Bhattacharyya I., 2002, Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone, *J. Periodontol.*, 73 (10): 1141-8.

Toh, S. and Hernandez-Diaz, S., 2007, Statins and fracture risk. A systematic review, *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.*, 16: 627-640.

Travis J.S. and von Recum H.A., 2008, Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials* 29, 1989-2006.

Tuan H.S. and Hutmacher D.W., 2005, Application of micro CT and computation modeling in bone tissue engineering, *Computer-Aided Design*, 37: 1151-1161.

Turnbull, R.S., Freeman, E., 1974, Use of wounds in the parietal bone of the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects, *J. Periodontal Res.*, 9(1): 39–43.

Urist, M., 1980, Bone transplants and implants, in *Fundamental and Clinical Bone Physiology* (Urist, M., ed.), Lippincott, Philadelphia, pp. 331–368.

Vail, N.K., Swain, L.D., Fox, W.C., Aufdemorte, T.B., Lee, G. and Barlow, J.W., 1999, Materials for biomedical application, *Materials & Design*, 20(2–3): 123–132.

Vogel G., 1999, Cholesterol-lowering drugs may boost bones, *Science*, 286: 1825–1826.

Walter D.H., Schachinger V., Elsner M., Mach S., Auch-Schwelk W., Zeiher A., Effect of statin therapy on restenosis after coronary stent implantation, *Am. J. Cardiol.* 85: 962-968.

Wang, E.A., Rosen, V., Cordes, P., Hexick, R.M., Kriz, M.J., Luxenberg, D.P., Sibley, B.S., Wozney, J.M., 1988, Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 85: 9484–9488.

Wang, X., Um, I.C., Fang, D., Okamoto, A., Hsiao, B.S., Chu, B., 2005b, Formation of water-resistant hyaluronic acid nanofibers by blowing-assisted electro-spinning and non-toxic post treatments, *Polymer*, 46: 4853-4867.

Whang K., Goldstick T.K., Healy K.E., 2000, A biodegradable polymer scaffold for delivery of osteotropic factors, *Biomaterials*, 21: 2545-2551.

Whang, K., Thomas, C.H. and Healy, K.E., 1995, A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds, *Polymer*, 36(4): 837–842.

Wong R.W.K. and Rabie A.B.M., 2003, Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. *Br. J. of Oral Maxillofac. Surg.*, 41:244-248.

Wong R.W.K. and Rabie A.B.M., 2005, Early healing pattern of statin-induced osteogenesis, *Br. J. of Oral Maxillofac. Surg.*, 43: 46-50.

Woodward S.C., Brewer P.S., Moatamed F., Schindler A., Pitt C.G., 1985, The intracellular degradation of poly (ε-caprolactone), *J. Biomed. Mater. Res.* 19: 437-444.

Yang, S., Leong, K.F., Du, Z., and Chua, C.K., 2001, The design of scaffolds for use in tissue engineering, Part I, Traditional factors, *Tissue Eng.*, 7(6): 679-689.

Yang, X.Q., Yuan, M.L., Li, W. and Zhang, G.Y., 2004, Synthesis and properties of collagen/poly(lactic acid) blends, *Journal of Applied Polymer Science*, 94: 1670–1675.

Yang, Y., Magnay, J.L., Cooling, L, El Haj, A.J., 2002, Development of a 'mechano-active' scaffold for tissue engineering, *Biomaterials*, 23(10): 2119-2126.

Yee, A.J., Bae H.W., Friess D., 2006, The use of simvastatin in rabbit posterolateral lumbar intertransverse process spine fusion, *Spine J.*, 6: 391-396.

Yoshikawa, T., Ohgushi, H., Nakajima, H., Yamada, E., Ichijima, K., Tamai, S., Ohta, T, 2004, In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution, *Transplantation*, 69: 128–134.

Yoshimoto, H., Shin, Y.M., Terai, H., Vacanti, J.P., 2003, A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 24: 2077-2082.

Zhao, F., Yin, Y.J., Lu, W.W., Leong, J.C., Zhang, W., Zhang, J.Y., Zhang, M.F. and Yao, K.D., 2002, Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds, *Biomaterials*, 23: 3227–3234.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** İsmail Alper İšođlu

**Doğum yeri:** Ankara

**Doğum yılı:** 1977

**Medeni hali:** Bekar

### **Eğitim ve Akademik Durumu:**

**Lise:** Adana İsmail Sefa Özler Almanca Anadolu Lisesi, 1992 – 1995

**Lisans:** Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 1995 – 2000

**Yüksek Lisans:** Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 2001 - 2003

**Yabancı Dil:** Almanca, İngilizce

## YAYINLAR

### **Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler**

E. Pişkin, **İ. A. İšođlu**, N. Bölgen, S. Griffiths, İ. Vargel, T. Çavuşoğlu, P. Korkusuz, E. Güzel and S. Cartmell, In vivo Performance of Simvastatin Loaded Electrospun Spiral-Wounded Polycaprolactone Scaffolds in Reconstruction of Cranial Bone Defects in a Rat Model, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009; 90A (4): 1137-1151.

E. Pişkin, N. Bölgen, S. Eğri and **İ. A. İşoğlu**, Electrospun Matrices Made of Poly(a-hydroxy acids) for Medical Use, *Nanomedicine*, 2007; 2(4): 441-457.

Z. Aksu and **İ. A. İşoğlu**, Use of dried sugar beet pulp for binary biosorption of Gemazol Turquoise Blue-G reactive dye and copper(II) ions: Equilibrium modeling, *Chemical Engineering Journal*, 2007; 127(1-3): 177-188.

Z. Aksu and **İ. A. İşoğlu**, Use of agricultural waste sugar beet pulp for the removal of Gemazol turquoise blue-G reactive dye from aqueous solution *Journal of Hazardous Materials*, 2006; 137(1): 418-430.

Z. Aksu and **İ. A. İşoğlu**, Removal of copper(II) ions from aqueous solution by biosorption onto agricultural waste sugar beet pulp, *Process Biochemistry*, 2005; 40 (9): 3031-3044.

#### **Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler**

**İ. A. İşoğlu**, N. Bölgen, İ. Vargel, T. Çavuşoğlu, P. Korkusuz, E. Güzel ve E. Pişkin, "Electrospun Spiral-Wounded Polycaprolactone Scaffolds with or without Stem Cells for Cranial Bone Defects: an Animal Model," TERMIS-EU 2008 Meeting, Porto, Vol. 14, 847, Mary Ann Liebert, Tissue Engineering Part A, New York, 2008.

E. Pişkin, N. Bölgen, S. Eğri, H. M. Aydın and **İ. A. İşoğlu**, "Novel Scaffolds for Tissue Engineering," Trento Innovation Conferences in Materials Engineering: 1st Meeting Advances in Polymers, Composites and Biomaterials, 35, Trento, 2007.

E. Pişkin, **İ. A. İşoğlu**, N. Bölgen, S. Griffiths, İ. Vargel, T. Çavuşoğlu, P. Korkusuz, E. Güzel ve S. Cartmell, "Simvastatin Releasing Novel PCL Scaffolds in Rat Cranium Defects," TERMIS-EU 2007 Meeting, London, Vol. 13, 1756, Mary Ann Liebert, Tissue Engineering Part A, New York, 2007.

**İ. A. İşoğlu**, N. Bölgen and E.Pişkin, "Synthesis and Characerization of Nanofibrous Matrices Made from Blends of Low and High Molecular Weight Poly( $\epsilon$ -caprolactone) for Drug Delivery" NANOMAT 2006 International Workshop on Nanostructured Materials, 232, Antalya, 2006.

N. Bölgen, **İ. A. İşoğlu**, İ. Vargel, P. Korkusuz, S. Griffiths, S. Cartmell and E. Pişkin, "Some Novel Applications of Electrospun Biodegradable PCL Materials," International Conference on Design of Biomaterials (BIND-06), Kanpur, 2006.

#### **Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler**

T. Çavuşoğlu, İ. Vargel, E. Pişkin, **İ. A. İşoğlu**, N. Bölgen, P. Korkusuz, E. Güzel, S. Griffiths ve S. Cartmell, "Kraniyel Kemik Defekti Onarımında Elektrospinning Yöntemi ile Simvastatin Yüklenmiş Polikaprolakton Doku İskeletlerinin Kullanımı," 30. Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Ulusal Kongresi, 745-746, Antalya, 2008.

E. Pişkin, **İ. A. İşoğlu**, N. Bölgen, İ. Vargel, S. Griffiths, T. Çavuşoğlu, P. Korkusuz, E. Güzel and S. Cartmell, "Simvastatin Delivering PCL Scaffolds in Reconstruction of Cranial Bone Defects," 9th National Histology and Embryology Congress with International Contribution, Adana, Vol.1, 85-86, Cell and Tissue Biology Research, Adana, 2008.

E. Pişkin, N. Bölgen, İ. Vargel, P. Korkusuz, H.M. Aydın, S. Eğri, K. Tuzlakoğlu, **İ. A. İşoğlu**, X. Kaitian, K. Kesenci, G. Köktürk, A. Kozluca, E. Ural, D. Uzunok, C. Babaç, T. Şirin, S. Dinçer, M. Türk, G. Güven, S. Odabaş, F. Sayar, M. Türkoğlu,

H. Yavuz-Ersan, A. Şenköylü, Z.M.O. Rzaev and T. Kutsal, "Biodegradable Polymers and Novel Scaffolds for Tissue Engineering: Experience of Hacettepe University Group," Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery Stem Cell and Tissue Engineering Symposium, Samsun, 2007.