

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

**MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE İÇERİKLİ ENJEKTE EDİLEBİLİR
KEMİK GREFTİ ÜRETİMİ ve
in vitro
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Özgün Selim GERMİYAN

Danışman: Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir

2021

Özgün Selim GERMİYAN tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “Mezenşimal Kök Hücre İçerikli Enjekte Edilebilir Kemik Grefti Üretimi ve *in vitro* Değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08/10/2021 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday, oyçokluğu/oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR

.....

Raportör Üye: Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL

.....

Üye : Doç. Dr. Canan SEVİMLİ GÜR

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Mezenşimal Kök Hücre İçerikli Enjekte Edilebilir Kemik Grefti Üretimi ve *in vitro* Değerlendirilmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.....

Özgün Selim GERMİYAN

ÖZET**MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE İÇERİKLİ ENJEKTE EDİLEBİLİR
KEMİK GREFTİ ÜRETİMİ ve
in vitro
DEĞERLENDİRİLMESİ**

GERMİYAN, Özgün Selim

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR

Eylül 2021, 71 sayfa

Kemik hasarları ve kemik anomalileri, travma, tümör rezeksiyonu, enfeksiyon ve kırıklar gibi birçok nedene bağlı olarak gelişebilmektedir ve tedavi edilmesi gereken durumlardır. Bu amaçla kollajen, trikalsiyum fosfat seramikleri, doğal hidroksiapatitler, demineralize kemik matriksi ve biyolojik olmayan polimerler gibi greftler ve alloplastik kemik eşdeğerleri kullanılmaktadır.

Kemik doku mühendisliğinin temeli, kemik hasarı oluşan anatomik bölgeye uygun kemik iyileşmesi için destek yapısı oluşturmak ve iyileşmeyi hızlandırmaktır. Klinik başarı, oluşan kemiğin yeniden şekillenme sonucu çevre kemik dokusu ile yapısal olarak bütünleşmesi ve yeni oluşan kemiğin fonksiyon görmek için yeterli mekanik dayanıklılığa sahip olması ile belirlenir.

Bu çalışmada mezenşimal kök hücreler hidroksiapatit ve β -Trikalsiyumfosfat yapılı mikro taşıyıcılar üzerine ekilerek spinner flaskta optimum karışma hızı belirlenerek üretilmiştir. Mikro taşıyıcılar üzerine ekilen hücreler aljinat/karboksimetil selüloz hibrid hidrojel ile karıştırılmış, böylece kemik yapısına uygun ve kök hücre tedavisi amaçlı enjekte edilebilir formda kemik grefti üretilmiş ve greftin *in vitro* performansı analiz edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Hidroksiapatit, β -Trikalsiyumfosfat, mezenşimal kök hücre (MSC), spinner flask, mikro taşıyıcı, kemik grefti



ABSTRACT**PRODUCTION and *in vitro* EVALUATION OF MESENCHYMAL
STEM CELL LADEN INJECTABLE BONE GRAFT**

GERMİYAN, Özgün Selim

MSc Thesis in Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aylin ŞENDEMİR

September 2021, 71 pages

Bone injuries and bone anomalies can develop due to many reasons, such as trauma, tumor resection, infection and fractures, and are conditions that need to be treated. For this purpose, grafts and alloplastic bone equivalents, such as collagen, tricalcium phosphate ceramics, natural hydroxyapatites, demineralized bone matrix and non-biological polymers are used.

Mikro taşıyıcılar üzerine ekilen hücreler aljinat/karboksimetil selüloz hibrid hidrojeli ile karıştırılmış, böylece kemik yapısına uygun ve kök hücre tedavisi amaçlı enjekte edilebilir formda kemik grefti üretilmiş ve greftin *in vitro* performansı analiz edilmiştir.

The basis of bone tissue engineering is to create a support structure for bone healing in accordance with the anatomical region of bone damage and to accelerate healing. Clinical success is determined by the structural integration of the newly formed bone with the surrounding bone tissue as a result of remodeling, and sufficient mechanical strength of the formed bone to function properly.

In this study, mesenchymal stem cells were seeded onto hydroxyapatite and β -tricalciumphosphate microcarriers, and they were cultured in the spinner flask by determining the optimum mixing speed. Cell laden microcarriers were mixed with alginate/carboxymethyl cellulose hybrid hydrogels, so that an injectable bone graft for stem cell therapy that is compatible with bone structure was produced, and its *in vitro* performance was analyzed.

Keywords: Hydroxyapatite, β -Tricalciumphosphate, mesenchymal stem cells (MSC), spinner flask, microcarrier, bone graft

ÖNSÖZ

Şahsıma örnek aldığım insanlığa yardım etmeyi, ıstık olmayı ve bu uğurda çalışmayı hayat amacı sayan tüm fedakâr bilim insanlarına, eğitimim ve tezım süresince her zaman destek olan bilgi birikimi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL'e, her zaman fikren ve manen yanımda olan Yük. Biyomühendis Umut Doğu SEÇKİN'e yüksek lisans tezım boyunca bilgilerini benimle paylaşan danışman hocam Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR'e ve her zaman bana inanan, güvenen aileme sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Özgün Selim GERMİYAN



İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK	i
KABUL ONAY SAYFASI	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
TABLolar DİZİNİ	xx
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Kemik Dokusu ve Özellikleri.....	2
2.1.1 Kemik Hücreleri ve Kemik İliği Mezenşimal Kök Hücresi.....	2
2.1.2 Kemik Matriksi.....	5
2.2 Kemik Hasarları ve Rejenerasyonu.....	5
2.2.1 Osteoindüksiyon.....	6
2.2.2 Osteokondüksiyon.....	6
2.2.3 Osseointegrasyon.....	7
2.3 Kemik Doku Mühendisliği.....	8
2.3.1 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Materyaller	8
2.3.2 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan İskeleler.....	9
2.3.2.1 Kemik Doku İskelelerinde Hidrojellerin Kullanımı.....	10
2.3.2.2 Kemik Doku İskelelerinde Seramiklerin Kullanımı.....	12

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1 Hidrojelin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	14
3.1.1 Hidrojelin Viskozitesi.....	15
3.1.2 Hidrojelin Porozitesi.....	15
3.2 Hücrelerin Mikro taşıyıcılar Üzerine Tutunma Özelliklerinin Belirlenmesi ..	15
3.2.1 Hücrelerin Mikro taşıyıcılar Üzerine Tutunma Kinetiği.....	16
3.2.2 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM).....	16
3.3 Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Hücre Kültürü Çalışmaları.....	17
3.3.1 Mikro taşıyıcıların ve Spinner Flaskın Sterilizasyonu.....	17
3.3.2 Hücre Kültürü.....	18
3.4 Spinner Flask Optimizasyonu.....	19
3.6 Mikro taşıyıcılar ile Hidrojelin Karıştırılması.....	20
3.7 Live & Dead Boyama.....	20
3.8 Histokimyasal Boyamalar.....	21
4. BULGULAR.....	24
4.1 İdeal Hidrojel Konsantrasyonun Belirlenmesi ve Karakterizasyonu.....	24
4.1.1 Hidrojellerin Basılabilirlik Yönünden İncelenmesi.....	24
4.1.2 Hidrojelin Porozitesi.....	25
4.2 Hücrelerin Mikro taşıyıcı Üzerine Tutunma Özelliklerinin Belirlenmesi.....	25
4.2.1 Hücrelerin Tutunma Kinetiğinin Belirlenmesi.....	27

İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa**

4.2.2 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM).....	27
4.3 Spinner Flask Optimizasyonu.....	30
4.4 Hücre Canlılığı Analizi.....	30
4.5 Live & Dead Boyama.....	32
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	59
TEŞEKKÜR.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kemik Yapısı.....	2
2.2. Kemik matriksi sentezi ve osteosit oluşumu	3
2.3. Kemik kırığı ve onarımı	6
2.4. Osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve osseointegrasyon.....	9
2.5. Aljinatın ve Karboksimetil selülozun moleküler gösterimi.....	13
3.1. Fusion 360 ile tasarlanan platform	16
3.2. SEM cihazı	17
3.3. L&D deney seti planı	22
4.1. Hibrid hidrojelın kayma gerilmesi - viskozite grafiği	26
4.2. Liyofilize olmayan hibrid hidrojelın μ -CT görüntüsü.....	27
4.3. Liyofilize hibrid hidrojelın μ -CT görüntüsü	27
4.4. Hücrelerin mikro taşıyıcı yüzeylerine tutunma grafiği.....	28
4.5. Mikro taşıyıcı yüzeyinin SEM görüntüleri.....	29
4.6. Mikro taşıyıcı yüzeyine tutunan hücrelerin SEM görüntüleri.....	30
4.7. Spinner flask ideal karıştırma hızı.....	31
4.8. Hücre canlılık grafikleri.....	32
4.9. Farklılaşma ortamı olmadan MC üzerinde 5.gün L&D.....	33

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.10. Farklılaşma ortamı ile MC üzerinde 5.gün L&D boyama.....	34
4.11. Farklılaşma ortamı olmadan jel içerisinde 5.gün L&D boyama.....	34
4.12. Farklılaşma ortamı ile jel içerisinde 5.gün L&D boyama.....	35
4.13. Farklılaşma ortamı olmadan MC üzerinde 10.gün L&D boyama.....	36
4.14. Farklılaşma ortamı ile MC üzerinde 10.gün L&D boyama.....	37
4.15. Farklılaşma ortamı olmadan jel içerisinde 10.gün L&D boyama.....	38
4.16. Farklılaşma ortamı ile jel içerisinde 10.gün L&D boyama.....	39
4.17. Farklılaşma ortamı olmadan lam üzerinde 21.gün hematoksil-eozin boyama	40
4.18. Farklılaşma ortamı ile lam üzerinde 21.gün hematoksil-eozin boyama	41
4.19. Farklılaşma ortamı olmadan lam üzerinde 28.gün hematoksil-eozin boyama	42
4.20. Farklılaşma ortamı ile lam üzerinde 28.gün hematoksil-eozin boyama	43
4.21. Farklılaşma ortamı olmadan lam üzerinde 21.gün anti-bone sialoprotein boyama	44
4.22. Farklılaşma ortamı ile lam üzerinde 21.gün anti-bone sialoprotein boyama	45

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil

Sayfa

4.23. Farklılaşma ortamı olmadan lam üzerinde 28.gün anti-bone sialoprotein boyama	46
4.24. Farklılaşma ortamı ile lam üzerinde 28.gün anti-bone sialoprotein boyama	47
4.25. Farklılaşma ortamı olmadan jel içerisinde 21.gün hematoksilen-eozin boyama	48
4.26. Farklılaşma ortamı ile jel içerisinde 21.gün hematoksilen-eozin boyama	49
4.27. Farklılaşma ortamı olmadan jel içerisinde 28.gün hematoksilen-eozin boyama	50
4.28. Farklılaşma ortamı ile jel içerisinde 28.gün hematoksilen-eozin boyama	51
4.29. Farklılaşma ortamı olmadan jel içerisinde 21.gün anti-bone sialoprotein boyama.....	52
4.30. Farklılaşma ortamı ile jel içerisinde 21.gün anti-bone sialoprotein boyama.....	53
4.31. Farklılaşma ortamı olmadan jel içerisinde 28.gün anti-bone sialoprotein boyama.....	54
4.32. Farklılaşma ortamı ile jel içerisinde 28.gün anti-bone sialoprotein boyama.....	55

TABLÖLAR DİZİNİTabloSayfa

Tablo 1: Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyolojik greftler.....	10
Tablo 2: Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü.....	21
Tablo 3: İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü.....	22



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

mm	Milimetre
O ₂	Oksijen
°C	Santigrat derece
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre
BMSCs	Kemik İliği Mezenşimal Kök Hücresi
mL	Mililitre
g/L	Gram/Litre
M	Molar
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
(PO ₄) ⁻³	Fosfat iyonu
HAp	Hidroksiapatit
β-TCP	β-Trikalsiyumfosfat
α-TCP	α-Trikalsiyumfosfat
MC	Mikro taşıyıcı
mg	Miligram
rpm	Dakikadaki devir sayısı

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar

Ca ²⁺	Kalsiyum iyonu
FBS	Fötal buzağı serumu
α -MEM	Minimum Essential Medium α
DMSO	Dimetilsülfoksit
CO ₂	Karbondioksit
HMDS	Hekzametildisilazan
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
CMC	Karboksimetil selüloz
ALG	Aljinat
μ -CT	Mikro bilgisayarlı tomografi
ANOVA	Varyans analizi
BLC	Kemik astar hücreleri
OP	Osteopontin
ON	Osteonektin
OC	Osteokalsin
H&E	Hematoksilen Eozin Boyama

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Kısaltmalar**

3D	Üç boyutlu
L&D	Canlı & ölü floresan boyama
CAD	Bilgisayar destekli tasarım
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
Mg ²⁺	Magnezyum iyonu
MKH	Mezenşimal kök hücre
PBS	Fosfat tamponlu saline solüsyonu
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
BSP	Kemik Sialoproteini
cP	Santipoise
Pa.s	Pascal saniye



1. GİRİŞ

Kemik, özel bir bağ dokusu olarak ossifikasyon ve osteogenez süreçleri ile gelişir. Ossifikasyon sırasında, osteoblastlar amorf bir materyal salgırlar ve yavaş yavaş büyük oranda kollajen yapılı olan osteoidi oluştururlar. Osteoidin oluşumundan sonra kalsiyum fosfat mineralleri osteoidin içerisinde birikerek birlikte kemik matriksini oluştururlar. Mineralizasyon sürecinde osteoblastlar çevrelenerek osteositleri oluşturur (Lee et al., 1992).

Kemiğin özellikle genç insanlarda yüksek rejeneratif kapasitesi, kırıkların çoğunun büyük müdahaleye gerek kalmadan iyileşeceği anlamına gelir. Ancak buna rağmen ağır parçalı kırıklar ve kemik tümörleri kaynaklı rezeksiyonlardan dolayı meydana gelen büyük kemik hasarları tümüyle rejenere olamayabilirler. Bu nedenle hasarlı bölgede cerrahi müdahaleye ihtiyaç duyulur. Hali hazırda uygulanabilen “Altın standart” tedavi leğen kemiğinin üst ucu gibi yük binmeyen ve kolayca ulaşılabilen bir bölgeden alınarak hasarlı bölgeye otolog greftleme yapılmasıdır (Bauer et al., 2000).

Klinik ihtiyaç göz önüne alındığında, ortopedide biyomateryal bazlı tedaviler pazarının hızlı bir oranda büyüdüğü görülmektedir. İmplantasyon amaçlı materyaller geçmişte titanyum implantlar gibi 'biyo-inert' olacak şekilde tasarlanırken, malzeme bilimcileri artık biyolojik moleküller veya hücrelerle bütünleşen ve dokuları yenileyen 'biyo-aktif' materyallerin tasarımına yönelmektedir (Stevens, 2008).

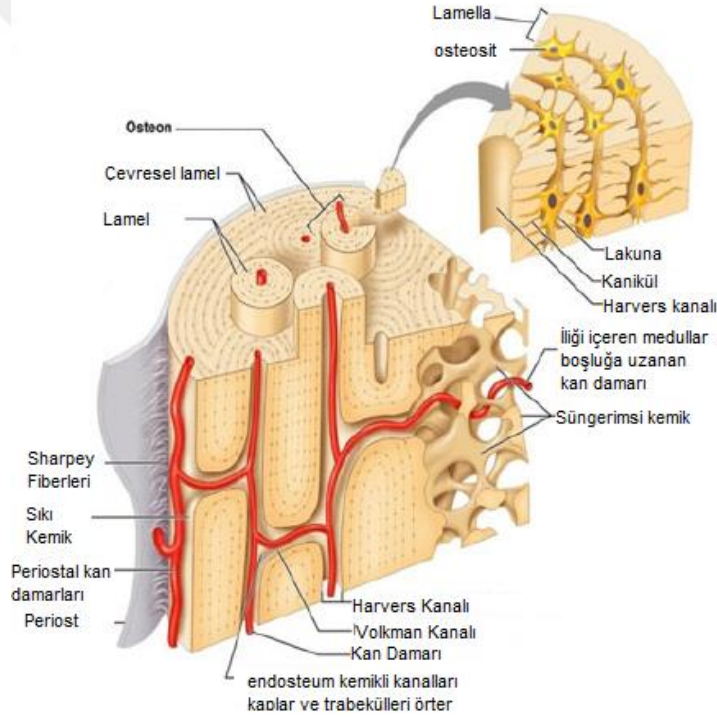
Günümüzde kemik rejenerasyonunda kullanılan materyallerin osteoindüktif: progenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını teşvik edebilen, osteokondüktif: kemik büyümesini destekleyen ve hasarlı bölgenin çevresindeki kemiğin büyümesini teşvik eden ve osseointegrasyon yapabilen: çevre kemiğe entegre olabilen özellikler sahip olması istenmektedir (Kretlow et al., 2007; Hench et al., 2002; Liu et al., 2007)

Bu yüksek lisans tezinde kemik dokusunun rejenerasyonunu hızlandırmak, immün sistem yanıtını en aza indirmek ve yabancı cisim reaksiyonunun önüne geçilerek kişiye özgü tedavi alanında yeni bir yöntem geliştirmek hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kemik Dokusu ve Özellikleri

Kemik dokusu kompleks, organize ve mineralize bir bağ dokusudur. Kemğin kollajen temelli yapılardan, kalsiyum fosfat kristallerinden, olgun ve olgun olmayan kemik hücrelerinden (Osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar) oluşan yüksek yapısal hiyerarşisi vardır. Kortikal ve trabeküler kemik bu bileşenlerin değişik şekilde yapılanmasıyla oluşmaktadır (Rao et al., 2013; Lu et al., 2012; Florencia-Silva et al., 2015). Yaşla beraber rejenerasyon potansiyeli azalmakla birlikte kemik, içeriğindeki osteoklastların yıkıcı ve osteoblastların yapıcı aktivitesiyle sürekli olarak yeniden şekillenen bir yapıya sahiptir (Şekil 2.1).

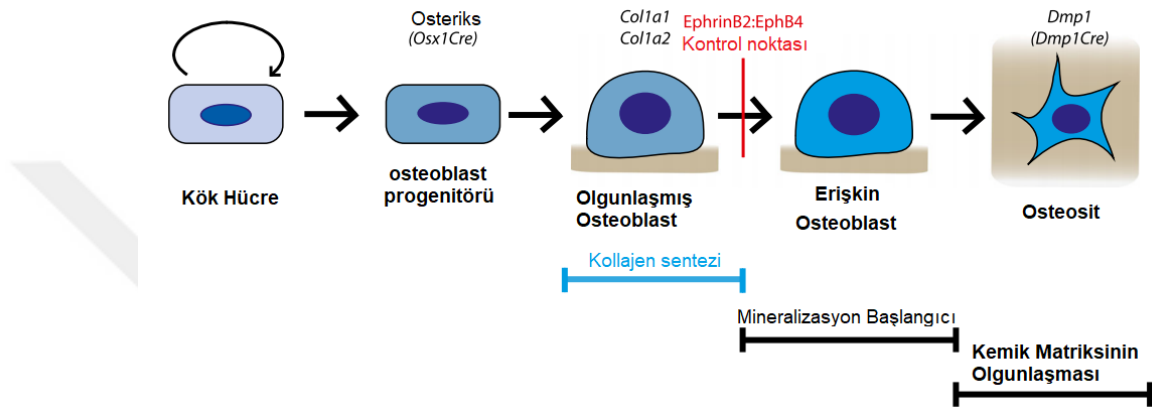


Şekil 2.1. Kemik Yapısı (Kumaret al., 2019'dan uyarlanmıştır).

2.1.1 Kemik Hücreleri ve Kemik İliği Mezenşimal Kök Hücresi

Kemik, osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar ve kemik astar hücreleri olmak üzere dört farklı hücre tipinden oluşur. Osteoblastlar, kemik astar hücreleri ve osteoklastlar kemik yüzeylerinde bulunur ve progenitör hücreler olarak adlandırılan lokal hücrelerden türetilir. Osteositler; kemğin içinde yer alan hücrelerdir ve ekstraselüler kemik matriksince "çevrelenmiş" osteoblastlardır.

Osteositler, kemiğin içinde yer alan hücrelerdir ve ekstraselüler kemik matriksince "çevrenilmiş" osteoblastlardır. Bu hücreler, osteoblast türevli en olgun farklılaşma durumunu temsil eden post-proliferatiflerdir. Kemik yapısında her mm³ kemikte yaklaşık 25.000 osteosit vardır. Osteositler düzenli olarak dağılmış boşlukları işgal eder ve kanalikül adı verilen birçok ince kanal onlardan her yöne yayılır. Kanaliküller, maddelerin kemikten difüzyonuna izin verir. Osteositlerden gelen çok sayıda hücresel işlem ürünü, kanalcıklarda her yöne doğru ilerler. Osteositlerin kanalikülleri, kemik yüzey yönüne dik bir şekilde düzenlenmiştir (Mohammed et al., 2008).



Şekil 2.2 Kemik matriksi sentezi ve osteosit oluşumu (Blank et al., 2019'dan uyarlanmıştır).

Osteoblastlar, kemik iliğinin pluripotent mezenşimal kök hücrelerinden kaynaklanan osteoprogenitör hücre adı verilen ilkel mezenşimal kökenli özel fibroblast benzeri hücrelerdir. Osteoblastların öncülerinin mezenşimal kök hücreler olduğu, kemiğin hücre popülasyonlarını kullanarak hem *in vivo* hem de *in vitro* kendini yenileme kapasitesine dayanmaktadır (Stein et al., 1993). Kemik iliği stromasının osteoblast, kondroblast, fibroblast, adiposit ve miyoblastlara farklılaşma kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Friedenstein, 1976).

Aktif formda, osteoblastlar küboid şeklindedir ve aktif kemik oluşumunun olduğu kemik yüzeyinde bulunur. Osteoblastlar, adherens ve gap bağlantıları aracılığıyla birbirleriyle temas halindedir. Bunlar, hücre içi ikincil haberci sistemlerle bağlantılı mikofilamentlere ve enzimlere (protein kinaz gibi) işlevsel olarak bağlıdır. Bu karmaşık düzenleme, hücreler arası tutunmayı ve hücreden hücreye iletişimi sağlar.

Osteoklastlar, makrofaj-monosit hücre soyundan türetilen çok çekirdekli büyük fagositik hücrelerdir (Walker, 1973). Kemik iliğinden belirli bir iskelet bölgesine göç ederler. Ya mevcut çok çekirdekli osteoklastlarla kaynaşabilir, "de novo" çok çekirdekli

osteoklastlar oluşturmak üzere birbirleriyle kaynaşabilirler, ya da gelecekteki olabilecek bir yaralanmanın iyileşmesi için bir öncü havuzu oluşturmak üzere mononükleer hücreler olarak kalabilirler.

Kemik mikro çevresi, osteoklast oluşumunda ve işlevinde önemli bir rol oynar ve diğer hücrelerden gelen lokal sinyallere ve kemik matrisinden ekstrakte edilen büyüme faktörlerine bağlıdır. Osteoklastlar, tartarat dirençli asit fosfataz enzimini (TRAP), kalsitonin reseptörlerini, vakuolar proton ATPaz ve vitronektin reseptörlerini eksprese eder (Lee et al., 1995).

Osteoklastlar, iskelet üzerindeki büyüme ve değişen mekanik streslere yanıt olarak kemiğin yeniden şekillenmesine katkıda bulunan kemik rezorpsiyonunda yer alır. Osteoklastlar ayrıca kan kalsiyum homeostazının uzun süreli korunmasına da katılırlar. Kemik rezorpsiyonu sırasında, osteoklastlar, Howship lacunae olarak bilinen çöküntüler oluşturan kemik yüzeyini emer.

Kemik astar hücreleri (BLC' ler), özellikle yetişkin iskeletinde belirgin olan, aktif olmayan (yeniden şekillenmeyen) kemik yüzeylerini kaplar. BLC' ler kemik yüzeyleri üzerinde ince bir şekilde uzanır, yassı veya hafif oval çekirdeklere sahiptir, diğer BLC' lere boşluk bağlantılarıyla bağlanır ve hücresel ürünleri yüzey kanalcıklarına gönderir (Blezikian et al., 2002). BLC' ler, osteojenik hücrelere çoğalmak ve farklılaşmak üzere indüklenebilir ve osteojenik öncülerin bir kaynağını temsil etmektedir. BLC' ler ve endosteal dokuların diğer hücreleri, kemik iliği stromal sisteminin ayrılmaz bir parçasıdır ve belki de indüktif mikro ortamı kontrol ederek hematopoezde önemli işlevlere sahiptir. Kemiğin yeniden şekillenmesinin aktivasyonu; aktif olmayan kemik yüzeylerinde meydana geldiğinden, BLC' ler, kemik erimesini ve yeniden şekillenmesini başlatan aktivasyon sinyalinin yayılmasında rol oynar. Ayrıca BLC' ler kemik sıvılarının korunmasında ve kemik sıvısı ile mineral homeostazı için dokular arası sıvı bölmeleri arasındaki iyon akışlarının korunmasında da rol oynamaktadır (Karsdal et al., 2002; Khosla et al., 2008)

Mezenşimal kök hücreler (MKH'ler), kan damarlarının abluminal tarafında yer alan özel bir mural hücre/perisit popölasyonu olarak hemen hemen tüm dokularda bulunan multipotent yetişkin kök hücrelerdir. İlk olarak kemik iliği (BM) stroması içinde tanımlanmışlar, sadece hematopoietik kök hücreler (HSC'ler) için mikro-çevresel destek sağlamakla kalmaz, aynı zamanda çeşitli mezodermal soylara farklılaşabilirler (Black et al., 2015).

MKH' ler kemik iliğinden kolayca izole edilebilir ve daha sonra *in vitro* olarak genişleyebilir ve ayrıca immünomodülatör özellikler sergilerler, böylece çeşitli terapötik uygulamalar için kullanılabilirler. Gelişmekte olan bir bilim olarak, rejeneratif tıp, geleneksel yöntemlerle tedavisi mümkün olmayan hastalıkları tedavi etmek için canlı hücreleri ve dokuları kullanır. Hücre temelli tedaviler, bu alanın önemli bir yönü olarak kanser ve otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. İnsan mezenkimal kök hücreleri (hMSC' ler), rejeneratif tıp ve hücre terapisi uygulamalarında önde gelen yöntemlerdendir. MKH' lerin karakterizasyonunda pek çok yöntem mevcuttur bunların arasında en sık kullanılanı ise farklılaşma kapasitelerinin değerlendirilmesidir. MKH' lerin osteoblastlara ve adipositlere farklılaşma kapasitesi, MKH'leri ayırt etmek için *in vitro* standart olarak kullanılır. Osteoblastlara farklılaşma, Alizarin Red veya von Kossa boyaması ile boyanarak gösterilebilir. Adiposit farklılaşması, Oil Red O ile boyama ile kolayca gösterilir (Baghaei et al., 2017).

2.1.2 Kemik Matriksi

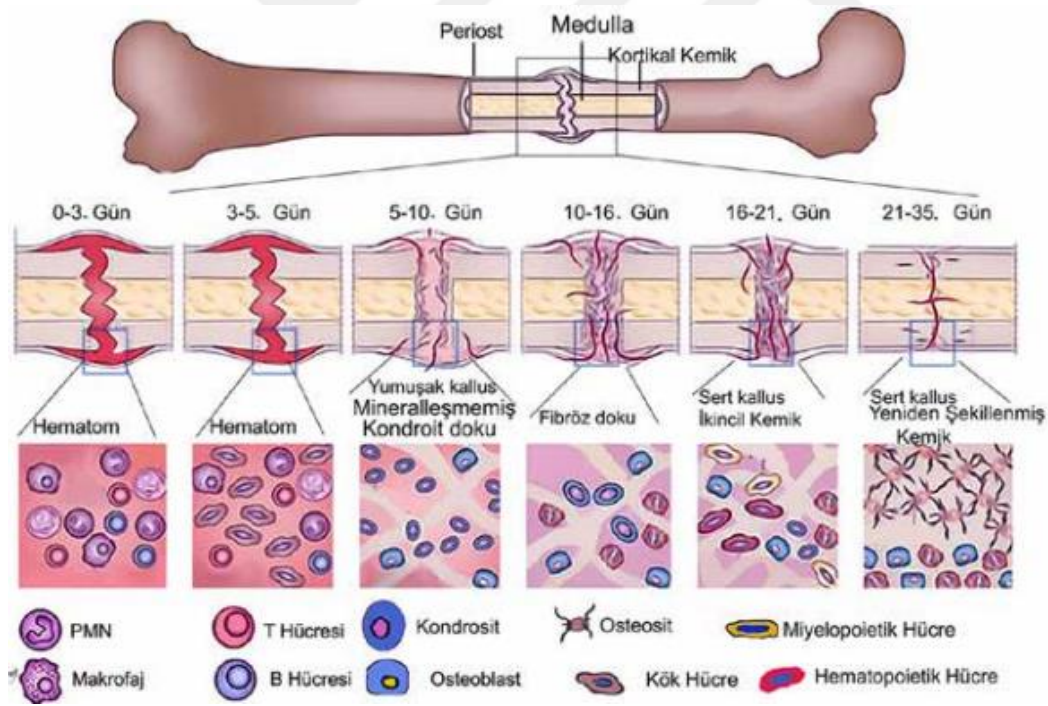
Kemik kütlelerinin %80- %90'ı ekstraselüler matriksten oluşmaktadır, ekstraselüler matriks büyük oranda Tip-I kollajen, Tip-III kollajen, kollajenöz olmayan protein (osteonektin, osteokalsin, kemik sialoprotein, Tip-V kollajen, Tip II kollajen, Tip IX kollajen, Tip XI kollajen, Tip X kollajen, aggrecan, kıkırdak bağlantı proteini-I, perlekan, matrilin, matriks gla protein, kemik asidik glikoprotein-75, dentin matriks asidik fosfoprotein-I, osteopontin)den ve kalsiyum fosfat minerallerinden oluşmaktadır (Alford et al., 2015; Cole, 2003).

Tip-I kollajen, kemik matriksinde bulunan tüm proteinlerin %80'ini oluşturur, kemiğe enerjiyi absorbe etme yeteneği kazandırarak kemiğin mekanik özelliklerini düzenler ve kollajen fibrillerinin içinde ve çevresinde osteoblast aracılı kristal birikimi tarafından üretilen sertliği dengeler (Viguet-Carrin et al., 2006).

Kemik matriksinin inorganik bileşeni, büyük ölçüde, kollajen fibrillerinin içinde ve çevresinde plakalar halinde biriken hidroksiapatit kristallerinden oluşur (Liu et al., 2016). Kemik oluşumunun tüm süreci osteoblastlar tarafından düzenlenir ve kemik dokularının mineralizasyonu ile sonuçlanır (Anh et al.,1998; Farley et al., 1994).

2.2 Kemik Hasarları ve Rejenerasyonu

Bir kırık ve hasar durumunda üç aşamalı bir iyileşme süreciyle kemik kendini onarabilmektedir. İlk aşamada oluşan hematoma içerisinde sentezlenen büyüme faktörleri osteoprogenitör hücrelerin hasar bölgesine göç etmesini ve osteoblastlara farklılaşmalarını sağlayarak kemik rejenerasyon sürecini düzenlemektedir. İlk enflamasyon sürecinde olduğu gibi takip eden onarım ve şekillenme süreçlerinde de TGF- β ailesi büyüme faktörleri özellikle kemik morfojenetik proteinleri (BMP's), insülin büyüme faktörü (IGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) zaman ve konsantrasyona bağlı bir şekilde sentezlenerek süreçlerin çeşitli farklı basamaklarını kontrol etmektedir. Genellikle kırığı takip eden üçüncü haftada kırık bölgesinde bir köprü görevi gören yumuşak kallus oluşmakta ve daha sonra yeniden şekillenme süreciyle bu yapı önce lamellar kemik ve daha sonra sırasıyla trabeküler kemik ve kompakt kemik ile yer değiştirerek orijinal yapı ve güçte kemik oluşturmaktadır (Şekil 2.2) (Stegen et al., 2015; Mammalis et al., 2011; Tanrikulu vd., 2017).



Şekil 2.3. Kemik kırığı ve onarımı (Tanrikulu et al., 2017).

2.2.1 Osteoindüksiyon

Osteoindüksiyon, osteoprogenitör hücreler oluşturmak ve heterotopik bölgelerde kemik üretmek için henüz osteojenik soya bağlı olmayan farklılaşmamış mezenşimal kök hücrelerin indüklenmesi olarak tanımlanır. Osteokondüksiyon ve osseointegrasyonun aksine osteoindüksiyon, kemik yapılarıyla sınırlı değildir, aynı zamanda hayvan modellerinde subkutan keseler gibi ektopik bölgelerde de görülmektedir (Weber, 2019).

Osteoindüktif bir biyomalzeme üç temel üzerine dayanmalıdır; bunlardan ilki ilgili bölgeye hücrelerin migrasyonunu ve hücrelerin sitokin, büyüme faktörü salınımlarını regüle edebilme potansiyelinde olmasıdır. İkincisi ise ideal osteoindüktif materyal, farklılaşmamış bir mezenkimal hücreyi olgun, kemik oluşturan bir osteoblasta dönüştürebilmelidir. Son olarak da ideal osteoindüktif materyal, iskelet dışı yerlere implante edildiğinde büyüme içi ektopik kemik oluşumunu indükleyebilmelidir (Miron et al., 2012).

2.2.2 Osteokondüksiyon

Osteokondüksiyon, kemik defektleri nedeniyle hasarlı bölgede kaybedilen dokunun yerine rejenerasyonu hızlandırmak amacıyla kullanılan greft yapısının içerisinde halihazırda kemik dokusunda bulunan kılcal damarların üç boyutlu biçimde büyümesi olarak tanımlanabilir. Bu da osteokondüksiyonun bir üç boyutlu mekanizma olduğunu ve kemik iyilişmesinde oldukça önemli bir mekanizma olduğunu göstermektedir. Osteokondüksiyon, cam, seramik ve plastik gibi biyolojik olmayan materyallerle ve otoklavlanmış kemik, deproteinize kemik, demineralize-tripsinize edilmiş kemik ve donmuş veya dondurularak kurutulmuş kemik gibi canlı olmayan biyolojik materyallerle yapılarıyla oluşturulan greft yapılarında gözlemlenmektedir (Weber, 2019)

Osteokondüksiyonun erken gözlemleri, otolog kemik transplantasyonuna dayanıyordu. İdeal osteokondüktif mikro mimariyi tanımlamak için ilk yaklaşımlar, otolog kemiği taklit etmek için rastgele dağılmış gözeneklere ve kanal tabanlı mikro mimarilere sahip iskeleler kullanılarak 1990'larda yapıldı. Bu bulgulara dayanarak, 0,3-0,5 mm' lik gözenek çapları uzun zamandır yanlış bir şekilde osteokondüksiyon için optimal olarak kabul edilmiştir (LeGeros, 2008).

Eklemeli üretim ile tanımlanmış gözenek boyutları, gözenek konumları ve gözenekler arasında tanımlanmış bağlantılara sahip bir kemik doku iskelelerinde; 0,7 mm ile 1,2 mm arasında gözeneklere sahip olan iskelelerinin yüksek düzeyde osteokondüktif

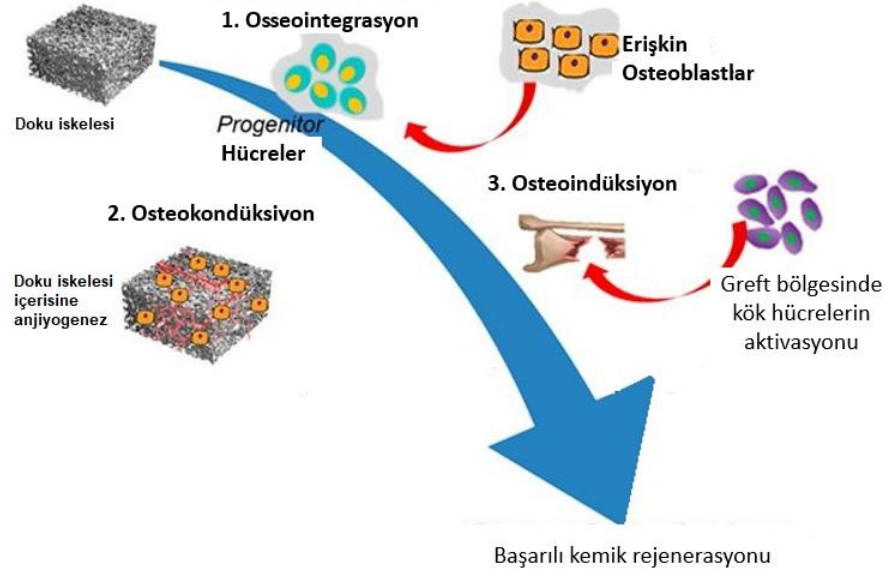
olduğu ancak gözenek çapları 0,5 mm'ye kadar ve 1,5 mm'nin üzerinde olan yapı iskelelerinin kusur köprüleme sergiledikleri için çok daha az osteokondüktif olduğu bulunmuştur (Gyabor et al., 2020)

Canlı bir kemik otogreftinde, osteokondüksiyon osteoindüktif süreçler tarafından kolaylaştırılır ve biyolojik olmayan materyallerin osteokondüksiyonundan daha hızlıdır. Osteokondüksiyon, yapı iskelesinden kaynaklanan osteoindüktif faktörlerden bağımsız olarak meydana geldiğinden, cansız ve sentetik kemik scaffoldlarında kemik rejenerasyonu için ana itici güçtür (Weber, 2019).

2.2.3 Osseointegrasyon

Greftin arada fibröz doku oluşumuna yol açmayacak şekilde alıcı kemik yüzeyine tutunabilmesine osseointegrasyon denir. Osseointegrasyon implant yüzeyi ile kemik arasındaki doğrudan teması tanımlar ve yalnızca iki boyutta gerçekleşmez. Osseointegrasyon sırasında, kemik hücreleri implantın yüzeyine tutunacak ve etrafta büyüyerek yerine sabitlenecektir. Bununla birlikte, osseointegrasyonun nihai etkinliği, bir implantın yüzey topografisine bağlıdır. İmplant yüzeyinin özellikleri, osseointegrasyonun ilk fazı sırasında ve ayrıca uzun süreli kemik yeniden şekillenmesi sırasında osteoblastların yapışması ve farklılaşması için çok önemlidir. Bu özellikler, asitle aşındırma, kum püskürtme, işleme ve kum püskürtme gibi üretim teknikleri ile mikro ölçekte değiştirilebilir. Bu yöntemler, osseointegrasyonun desteklenmesi için optimal derecede pürüzlülük üretmeyi amaçlamaktadır. Mikroskobik çukurlar, oluklar ve çıkıntılar, kemik dokusuna bir dayanak görevi görecektir yüzey alanını arttırır ve kemik-implant ara yüzünde biyolojik tepkiler için zemin hazırlar (Hudecki et al., 2019).

Osseointegrasyon, esas olarak titanyumdan yapılan dental implantlar için büyük öneme sahiptir. Yüzey dağlama ve kumlama ile elde edilebilen dental titanyum bazı implantların orta derecede kaba yüzey topografileri, mikro ve nano ölçüde osseointegrasyon için en uygun gibi görünmektedir. Bu, yüzeydeki optimum nano yapı ve hidrofilitik kombinasyonundan dolayı kan bileşenlerinin tercihli bağlanmasını yansıtabilir (Weber, 2019).



Şekil 2.4 İskele ile kemik rejenerasyonu sırasında: Osteoindüksiyon, osteokondüksiyon, osseointegrasyon (Weber, 2019'dan uyarlanmıştır)

2.3 Kemik Doku Mühendisliği

Travma, yaralanma, hastalık veya ilerleyen yıllara eşlik edebilen iskelet dokusunun kaybı veya işlev bozukluğu, çeşitli sosyoekonomik sorunların yanı sıra önemli morbiditeye neden olabilir. Ek olarak, değişen hasta demografisi, artan hasta beklentileri ve ardından gelen klinik senaryoların artan karmaşıklığı ile, yeni, daha güvenilir iskelet rejenerasyon stratejileri için gerekliliği sağlar. Kaybedilen önemli miktardaki iskelet dokusunu değiştirmek veya eski haline getirmek için mevcut yaklaşımlar, önemli sınırlamalar ve zararlı olabilecek doğal dezavantajlarla birlikte gelir (Black et al., 2015).

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp; kemik gelişimi, büyümesi ve iskelet onarımı ihtiyacını ele almak amacıyla *de novo* iskelet dokusu oluşumuna yönelik yeni yaklaşımlarla son yıllarda öne çıkmıştır. Kemik doku mühendisliği yaklaşımları, yaşlanan bir popülasyonun yaşam kalitesini iyileştirmek için ideal olarak sağlam, tekrarlanabilir ve geliştirilmiş kemik oluşumu stratejileri oluşturmak için kök hücreler, yenilikçi doku iskeleleri ve biyolojik faktörlerden yararlanmayı amaçlamaktadır (Black et al., 2015)

2.3.1 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Materyaller

Kırıklar, hastalıklar (osteoporoz ve osteosarkom) veya ameliyatlar (tümörün alınması) gibi olaylardan kaynaklanan kemik kusurları, otogreftler (kişinin kendi vücudundan alınan doku), allogreftler (aynı türden bir donörden) veya ksenogreftler (başka bir türden donörden alınan) kullanılarak tedavi edilir (Betz, 2002).

Tablo 1: Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyolojik greftler

Greft Tipi	Tanımı	Açıklama
Allogreft	Aynı tür farklı birey	İmmün reaksiyon oluşturabilir.
Otogreft	Bireyin kendisi	İmmün reaksiyon oluşturmaz enfeksiyona neden olmaz.
Ksenogreft	Farklı tür	İmmün reaksiyon oluşturma potansiyeli oldukça yüksek ve hayvan kaynaklı viral enfeksiyona sebep olabilir

Doğal kemik greftleri ve implantları, hastalık transferi, sınırlı kullanılabilirlik ve tekrarlanabilirlik, donör kıtlığı, sterilizasyon nedeniyle doğal matrislerin özelliklerinde değişiklikler ve bağışıklık reddi gibi çeşitli sınırlamalara sahiptir. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları için sentetik biyouyumlu polimerler tasarlamak için kapsamlı araştırmalar yapılmıştır (Zimmermann et al., 2011).

Gözenekli ve gözeneksiz sentetik kemik greftleri, metaller, seramikler, polimerler ve bunların kombinasyonları (hibrid malzemeler ve kompozitler) kullanılarak silindirler, vidalar, pimler, plakalar ve çubuklar gibi çeşitli morfolojilerin yanı sıra şekillendirilebilir macunlar ve jeller kullanılarak üretilir. Sert sentetik biyomalzemeler, invaziv bir ameliyatla implantasyon gerektirse de amorf macunlar ve jeller, kemik kusur bölgelerine enjekte edilebilir ve yerinde oluşuma tabi tutulabilir. Klinikte kullanılan metalik ortopedik implantlar biyoinerttir ve doğal kemik dokusuna kıyasla daha yüksek mekanik özelliklere sahiptir ancak bu durum kemiğin gelişiminde önemli bir fiziksel etmen olan strese karşı kalkan gibi davranarak kemik atrofisine yol açar (Puelo et al., 1999).

Seramik kemik greftleri de tercih edilen bir diğer materyaldir ancak, onların uygulaması düşük çekme mekanik özellikleri ve kırılabilirlikleri nedeniyle sınırlıdır. Ayrıca, metalik ve seramik implantlar biyobozunur değildir ve bu nedenle kemik iyileşmesinden sonra çıkarılması için ikincil bir ameliyat gerektirir (Lalawani et al., 2016).

Polimerlerin yapısı ve bileşimi, örneğin moleküler ağırlığı ve kimyasal bağları manipüle ederek spesifik özellikler vermek üzere uyarlanabilir. Polimerler, sulu bir ortama maruz kaldıklarında hidroliz veya hücreler tarafından enzimatik olarak bozunabilir. Polimerler, büyük ölçekte kolayca sentezlenebilir ve özellikleri moleküler tasarımla uyarlanabilir. Bu nedenle, polimerik yapı iskeleleri ve kompozitler, doku mühendisliği ve rejeneratif tıptaki kullanımı daha yaygındır (Lalwani et al., 2016).

2.3.2 Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan İskeleler

Geçmişten günümüze değin kemik dokusu mühendisliğinde kollajen ve fibrin gibi doğal malzemelerden polimerler gibi sentetik biyomateriyallere kadar uzanan çok çeşitli farklı yapı iskeleleri kullanılmıştır; kullanılan iskelelerin avantajları ve dezavantajları mevcuttur (Weisgerber et al., 2015; Machado et al., 2015; Rossi et al., 2015; Ibrahim et al., 2016)

Hücre tutunmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını artırmak amacıyla hücre dışı matrisi ve kök hücre nişini yeniden yaratmaya ve uyarmaya çalışan biyomateriyaller giderek daha fazla üretilmektedir (Nii et al., 2013; Minardi et al., 2015). Osteogenezi teşvik etmek için gerekli olan biyomateriyallerin optimal fizyo-kimyasal ve yapısal özelliklerini belirlemeye yönelik araştırmalar bulunmaktadır (Terheyden vd. 2001; Terheyden vd. 2001). Bir iskele için en temel gereksinim, hücre tutunmasını, hayatta kalmasını ve farklılaşmasını teşvik etmektir.

Kemik doku iskelelerinde bir diğer önemli unsur da vaskülarizasyonu destekleme yeteneğidir. Ek olarak, kalıcı implantları çıkarmak ve/veya değiştirmek için birden fazla ameliyat gerektiğinden iskeleti büyümeye devam eden çocuklarda biyobozunur kemik doku iskeleleri daha çok tercih edilir. Kemik doku mühendisliği için biyomateriyal tasarımındaki eğilim, osteoindüksiyonu arttırdığı gösterilen hücre dışı matris bileşenlerini barındıran biyoaktif doku iskeleleri oluşturmaya yönelmiştir (Ibrahim 2018).

Kemik doku mühendisliği için en çok çalışılan iskeleler, genel olarak hidrojeller, hücresizleştirilmiş matris, biyoseramik polimerler ve nano malzemeler olarak kategorize edilebilir (Ibrahim 2018)

2.3.2.1 Kemik Doku İskelelerinde Hidrojellerin Kullanımı

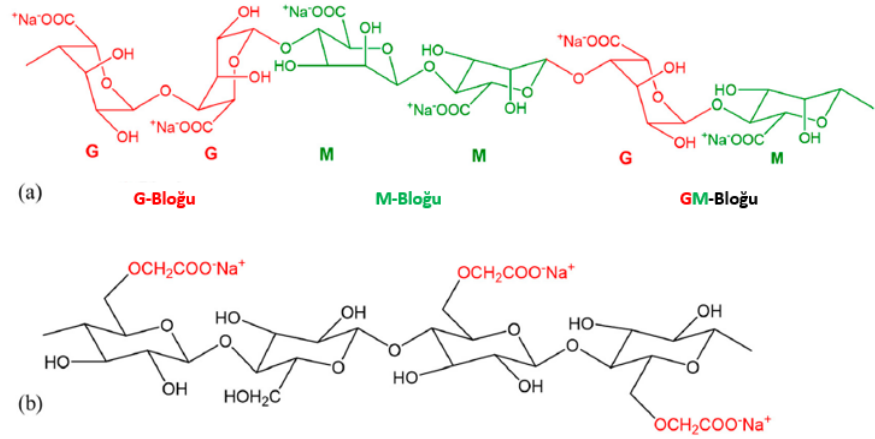
Aljinat, fibrin ve kollajen gibi hidrojeller, nispeten ucuz oldukları, yeniden kolayca üretilbildikleri, biyolojik olarak absorbe edilebildikleri ve klinik kullanım için

güvenilir oldukları için kemik dokusu mühendisliğinde iskele olarak sıklıkla tercih edilirler. Fibrin, pıhtılaşmanın temel bir bileşenidir ve anjiyojenik özelliklere sahiptir, bu da onu kemik dokusu mühendisliği için arzu edilen bir yapı iskelesi haline getirir (Ceccarelli et al., 2014). Bir iskele olarak, 3D kültürde osteoprogenitör hücrelerin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve osteogenezini desteklediği ve ayrıca vaskülarizasyonu desteklediği bilinmektedir (Gasporotto et al., 2014; Lohse et al., 2012) Osteogenezi uyarmak için hidroksiapatit kristalleri veya büyüme faktörleri gibi osteoindüktif bileşenlerle de kullanılmaktadır (Machado et al., 2015).

Kollajen Tip-I hidrojinin de fibrin gibi kemik doku mühendisliğinde kullanımı oldukça yaygındır. Biyobozunur olan ve halihazırda insan uygulamalarında kullanılan bir bazal membran bileşeni olan kollajen Tip-I, osteoprogenitörler ve bazal membranda salgılanan kollajen ile etkileşime girerek, osteojenik farklılaşmayı destekler. Kollajen, kritik defektleri *in vivo* onarmak ve vaskülarizasyonu teşvik etmek için osteoprogenitör hücre farklılaşmasını kolaylaştırabildiğinden, iskele olarak kullanımı oldukça yaygındır (Chung et al., 2015).

Kemik doku mühendisliğinde özellikle 3D biyobaskı çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir diğer hidrojel de aljinattır. Doğal olarak elde edilen bir hidrofilik anyonik polisakkarit olan aljinat. Kahverengi yosunlardan elde edilen ve en çok kullanılan biyopolimerlerden biridir. Aljinat (1-4) blokları β -D-mannuronik asit (M) ve α -L-glukronik asit (G) monomerleri içerir (Şekil2.5.a). Doku yenilenmesi için destekleyici matris materyali olarak görev alır ve biyoyumluluk düzeyi yüksektir. Biyoyumluluk ve biyobozunurluk özelliklerinden dolayı doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılır. Aljinat polimerinin çapraz bağlanması için CaCl_2 kullanılır. Sıvı formda enjekte edilen CaCl_2 aljinat yapısındaki sodyum ile reaksiyon vererek sıvı aljinatın katılaşmasını sağlamaktadır (Hong Ru et al., 2004).

Karboksimetil selüloz (CMC), doğal selülozdan kimyasal modifikasyonla elde edilen biyolojik olarak parçalanabilen ve biyoyumlu bir anyonik polimerdir (Şekil2.5.b) ve yapı olarak kitosana çok benzer (Wang vd. 2018; Gaetani vd. 2012) Bunun yanı sıra karboksimetil selüloz (CMC), viskozite değiştirici veya koyulaştırıcı için kullanılan yüksek moleküler ağırlıklı suda çözünür bir polisakkarittir. CMC' nin matris proteininin bağlanmasının hücre göçüne ve hücre tutunmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (Garret et al., 2007).



Şekil 2.5: (a) Aljinatın moleküler gösterimi, **(b)** Karboksimetil selülozun moleküler gösterimi
(Habib et al., 2018'den uyarlanmıştır)

Hidrojellerin çoğu kemik doku mühendisliği çalışmalarında tek başına olmaktan ziyade hibrid hidrojel ya da bir kompozitin bileşeni olarak kullanılmaktadırlar. Bu tez çalışmasında, aljinat ve karboksimetil selüloz hidrojelleri, ayrı ayrı ve farklı konsantrasyonlarda bir araya getirilerek elde edilen hibrid hidrojeller ile denemeler yapılmıştır.

2.3.2.2 Kemik Doku İskelelerinde Seramiklerin Kullanımı

Biyoseramikler gibi inorganik biyomalzemeler, mekanik güçleri, osteoindüktif potansiyelleri ve mevcut klinik kullanımlarında maksillafasiyal ve ortopedik implantlarda elde edilen güvenilirlikleriyle kemik doku mühendisliği için kullanılan malzemelerdir. biyoseramikler, trikalsiyumfosfat gibi biyobozunur gözenekli yapı iskeleleri ve biyoaktif camlar biçiminde biyolojik olarak aktif yüzeyler oluşturmak için modifiye edilebilir (Baino et al., 2015).

Osteoblastlarının proliferasyonunu ve osteojenik farklılaşmasını desteklemeye ek olarak, biyoseramik yapı iskelelerinin ayrıca kültürde murin osteoklastlarını aktive ettiği ve böylece kemik mikro çevresini taklit etme potansiyeli sağladığı gösterilmiştir (Roohani-Esfahani et al., 2016).

Kemik doku mühendisliğinde kullanılan çeşitli tiplerden kalsiyum fosfat seramikleri, benzer mimari özellikleri ve kemiğe kıyasla yüzey kimyası nedeniyle kemik kusurlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılanlar arasında trikalsiyumfosfat (TCP) ve hidroksiapatit (HAp) bulunur (Hollinger et al., 1986). Mükemmel biyoyoumluluk, osteokondüktivite ve osseointegrasyon sergilerler. (Ohgushi et al., 1989; Goshima et al., 1991; Ripamonti et al., 1996)

Hidroksiapatit, kemik dokusunun inorganik yapısını oluşturan osteokonduktif kalsiyum fosfat olup, kemik rejenerasyonu ve kemik doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılan biyoseramik malzemedir; biyouyumluluğu yüksektir ve kemik rejenerasyonu için altın standart olarak kabul edilir (Swethaa et al., 2010).

TCP, hızlı bozunan bir seramiğe bir örnektir ve kırık onarımını geliştirmek için farklı formülasyonlarda (α -TCP, β -TCP) kullanılmıştır. Normal kemikle aynı yeniden şekillenme sürecinden geçer ve kemiğe aynı yapısal özelliklere sahip doku oluşturur. (Parikh, 2002) TCP'nin yeni kemik oluşumunu teşvik ettiği mekanizma tam olarak belirlenememiştir ancak bunun TCP çözünmesinin bir sonucu olarak üretilen kalsiyum fosfat kristalleri ile ilgili olabileceğini düşünülmektedir. Bu parçacıklar, osteoblast fonksiyonu üzerinde dolaylı bir uyarıcı etkiye sahip olan osteoklast proliferasyonunu uyarır (Frost, 1991).

Biyoseramik doku iskelelerinin osteogenezi aktive ettiği bilinen bir gerçektir. Örneğin; insan BMSC ve insan göbek kordonu endotel hücrelerinin ko-kültürü ile yapılan bir çalışmada iskelenin bu hücre tipleri arasında etkileşime izin verip hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gelişmiş osteogenez ve vaskülarizasyon ile sonuçlanmıştır (Li et al., 2014).

Yapılan tez çalışması kapsamında yapısı %60 Hidroksiapatit-%40 β -Trikalsiyum-fosfat greft materyalleri ticari olarak satın alınmış olup spinner flaskta yapılan hücre kültürü çalışmasında mikro taşıyıcı olarak kullanılmışlardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında özetle;

- (1) Kemik greftinin enjekte edilebilir formda olabilmesi için ideal formda hidrojel hazırlanıp karakterize edilmiştir.
- (2) Ege Üniversitesi Biyomalzemeler ve 3 Boyutlu Biyoarafazlar laboratuvar stoklarında bulunan sıçan kemik iliği mezenşimal kök hücreleri çoğaltılarak ticari olarak satın alınan Hidroksiapatit/ β -trikalsiyumfosfat yapılı mikro taşıyıcılar üzerine tutunma özellikleri belirlenmiştir.
- (3) Ticari olarak satın alınan Hidroksiapatit/ β -trikalsiyumfosfat yapılı mikro taşıyıcılar ile çoğaltılan mezenşimal kök hücreler spinner flaskta bir araya getirilerek ideal karışma hızı ve süresi belirlenmiştir.
- (4) Spinner flaskta optimizasyon gerçekleştirildikten sonra mikro taşıyıcılar hidrojel ile karıştırılarak enjekte edilebilir formda kemik grefti elde edilmiştir.
- (5) Elde edilen greft 5. ve 10. günlerde Live & Dead boyamaya 21. ve 28. günlerde *in vitro* olarak farklılaşma yönünden incelenmiştir.

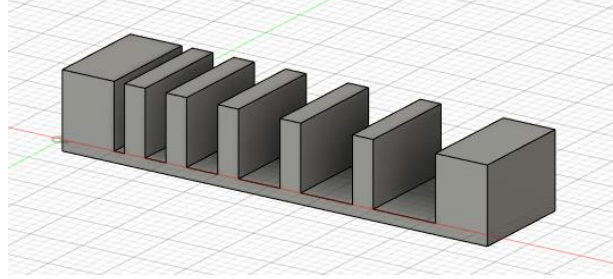
İstatistiksel karşılaştırmalar, iki grup arasındaki ortalama farkın istatistiki açıdan anlamlı olup olmadığını belirlemek amacı ile tek yönlü ANOVA analizi ile gerçekleştirilmiştir. Farklılıklar, $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$ ve $p^{****} < 0.0001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.1 Hidrojelin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Bu kapsamda yapılan çalışmalar Ege Üniversitesi Biyomalzemeler ve 3 Boyutlu Biyoarafazlar laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasında, farklı konsantrasyonlarda Aljinat (Alginic acid sodium salt from brown algae, A2033, Sigma Aldrich, Almanya) ve Karboksimetil selüloz (Sodium Carboxymethyl cellulose $M_w \sim 90,000$, 419273, Sigma Aldrich, Almanya) hibrid hidro-jelleri hazırlanarak basılabilirlik yönünden incelenmiştir. Bu amaçla 1, 2, 3, 4, 5, 6 mm'lik boşluklara sahip bir platform (Şekil 3.1) Fusion 360 CAD programı aracılığı ile

modellenip Ege Üniversitesi Biyomalzemeler ve 3 Boyutlu Biyoarafazlar laboratuvarında bulunan 3D yazıcı ile basılmıştır.



Şekil 3.1 Fusion 360 ile tasarlanan platform

Tasarlanan ve üretilen platform üzerine %4 w/v Aljinat, %3 w/v Aljinat- %1 w/v Karboksimetil selüloz, %2 w/v Aljinat- %2 w/v Karboksimetil selüloz, %1 Aljinat- %3 Karboksimetil selüloz ve son olarak %4 Karboksimetil selüloz hidrojel olarak filament dayanımlarına bakılmıştır. İdeal hidrojel kompozisyonu belirlenerek viskozitesi ölçülmüş ve μ -CT ile porozitesi incelenmiştir.

3.1.1 Hidrojin Viskozitesi

Tasarlanan platform üzerinde filament dayanımlarına bakılan hidrojellerden ideal olarak belirlene hidrojin viskozitesi ölçülmüştür viskozite ölçümü Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarında bulunan reometre (Thermo Scientific, Haake Mars) ile ölçülmüştür.

3.1.2 Hidrojin Porozitesi

Doku iskeleleri için en önemli parametrelerden biri hücrelerin sağlıklı ve canlı kalabilmeleridir bu nedenle porozite doku iskeleleri için önemli bir parametredir. Bu amaçla kullanılan hidrojele çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleştikten sonra Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan mikro-CT (Scanco Medical μ CT 50) cihazı ile porozitesi incelenmiştir.

3.2 Hücrelerin Mikro Taşıyıcılar Üzerine Tutunma Özelliklerinin Belirlenmesi

Ege Üniversitesi Biyomalzemeler ve 3 Boyutlu Biyoarafazlar laboratuvar stoklarında bulunan sıçan kemik iliği mezenşimal kök hücreleri çözdürülüp kültüre alınarak

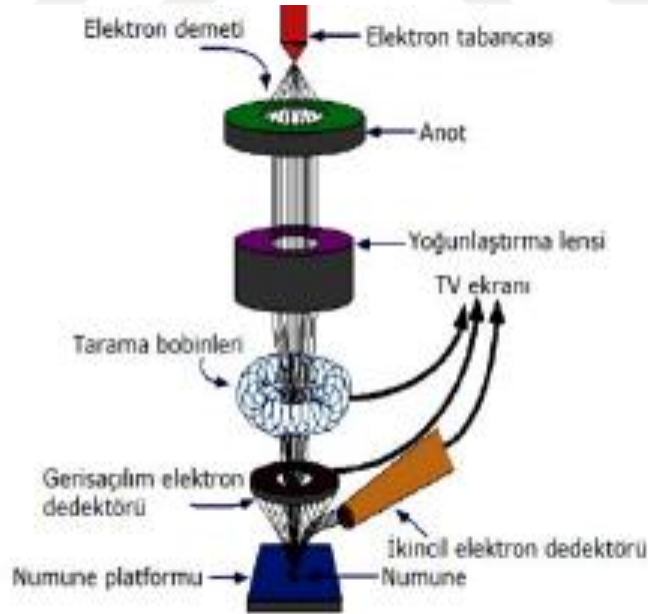
çoğaltılmış ve ticari olarak satın alınan Hidroksiapatit/ β -trikalsiyumfosfat yapılı mikro taşıyıcılar üzerine tutunma özellikleri belirlenmiştir.

3.2.1 Hücrelerin Mikro taşıyıcılar Üzerine Tutunma Kinetiği

24 gözlü well plate içerisi agar ile kaplanmış ve böylece hücrenin well plate yüzeyine tutunması engellenmiştir. Ardından agar donduğunda üzerine 1 cm²' lik yüzey alanına sahip cover slipler konmuş ve üzerlerine de ticari olarak satın alınan Hidroksiapatit / β -Trikalsiyumfosfat yapılı mikro taşıyıcılar 39 mg/cm² olacak şekilde konulmuştur daha sonra üzerlerine 10⁵ hücre ekilmiştir ardından 1., 5. ve takip eden her 5 dk.' da bir ekimi yapılan hücreler üzerinden 50 μ L alınmış ve alınan hücre içerikli besi ortamı süspansiyonunda bulunan tutunmayan hücreler sayılarak tutunmuş hücre miktarının hesapları yapılmıştır. Deney düzeneği istatistiksel olarak anlamlı olması için üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır

3.2.2 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

SEM' in çalışma prensibi şu şekildedir; analizi yapılacak olan örnek uygun şekilde kurutulduktan sonra vakum ortamında plazma altın ile yüzeyi kaplanır ardından örnek üzerine elektronlar gönderilir ve örneğe çarpan elektronlar saçılır ve geri dönen elektron detektöre çarparak görüntü oluşturur (Şekil 3.2.2).



Şekil 3.2 SEM cihazı

Mikro taşıyıcıların yüzeyinin ve mikro taşıyıcılara tutunan hücrelerin yüzey morfolojilerinin incelenmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmış ve görüntüler kaydedilmiştir. Numunelerin hazırlanmasında kullanılan protokol şu şekildedir;

- Örnekler 30 sn PBS ile yıkanır
- 0.5 mL gluteraldehit, 9.5 mL 0,1 M sodyum kakodilat çözeltisi içerisine eklenerek tampon A hazırlanmış olur. Örnekler tampon A' da 30 dk. bekletilir.
- Tampon A çekildikten sonra %7 sükröz içeren 1 M sodyum kakodilat çözeltisi koyulur ve 30 dk. bekletilir. (Tampon B)
- Tampon B çekildikten sonra 1 M sodyum kakodilat içinde %2 osmiyum tetroksit içeren Tampon C eklenir ve 30 dk. bekletilir.
- Örnekler 5 dk. distile su ile yıkanır. (x2)
- Distile su çekildikten sonra örnekler alkol serilerinde 5' er dk.. bekletilir. (Alkol serileri sırasıyla %35, 50, 70, 85, 95, 100, 100)
- Alkol serileri tamamlanınca örnekler HMDS solüsyonunda 15 dk. bekletilir. Kurumaları için HMDS çekildikten sonra kurumaları için oda sıcaklığında 30 dk. bekletilir.
- Kuruma tamamlandıktan sonra örnekler desikatöre koyulur.

Hazırlanmış numunelerin yüzeyleri altınla kaplanmış (Leica EM ACE600, Almanya) ve taramalı elektron mikroskobu ile hücre morfolojileri görüntülenmiştir. İnceleme Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan Taramalı Elektron Mikroskobu (ThermoFisher Scientific Apreo S) cihazı kullanılmıştır.

3.3 Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Hücre Kültürü Çalışmaları

3.3.1 Mikro taşıyıcıların ve Spinner Flaskın Sterilizasyonu

Ticari olarak satın alınan mikro taşıyıcılar ile hücre kültürü çalışmalarında kullanılan malzemeler kullanılmadan önce sterilizasyona tabi tutulmuştur. Sterilizasyon işlemleri Ege Üniversitesi Biyomühendislik bölümü 3 Boyutlu Biyomalzemeler ve Biyofazlar Laboratuvarı ve Medikal Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda steril şartların sağlanması için mikro taşıyıcılar etilen oksit sterilizasyonu ile steril edilmiştir.

Hücre kültüründe kullanılacak olan spinner flaskın yüzeyine hücrelerin tutunmasını engellemek amacıyla öncelikle hücre kültürüne uygun silikon (Silicone high vacuum

grease heavy, 107921, Merck, Almanya) ile kaplanmıştır ardından %30'u distile su ile doldurularak bir kulağı silikon tıpa diğer kulağı da hidroforik pamuk tıpa ile kapatılarak alüminyum folyo ile sarılmış ve otoklav ile sterilizasyon prosesine tabi tutulmuştur.

3.3.2 Hücre Kültürü

Bu işlemler sonrası deney düzeneğine bağlı olarak sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri sıvı azot tankından, -196°C (Air Liquide DMC-Cryopal TP 60-60 L), alınarak çözündürülmüş ve ardından pasajlanmıştır. Kullanılan hücreler Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü 3 Boyutlu Biyomalzemeler ve Biyoarafazlar Laboratuvarı hücre stoklarında bulunan, Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul (EUHADYEK)' unun 2017-119 no'lu ve 29.11.2017 tarihli iznine uygun olarak izole edilen kemik iliği mezenkimal kök hücreleridir. Deney düzenekleri, elde edilen stok hücreler köklük özelliklerini kaybetmeyecek şekilde (Pasaj 2-5 aralığında) planlanmıştır. Hücrelerin sıvı azottan çözündürülme prosedürü şu şekildedir;

- -196°C (Air Liquide DMC-Cryopal TP 60-60 L)' de stoklanmış olan kriyotüplerdeki sıçan Kemik iliği mezenşimal kök hücreleri pasajlanmak için çıkartıldı.
- 37°C' deki su banyosunda, dondurulmuş halde bulunan kriyotüpler içindeki dondurma ortamının %70'i çözünene kadar bekletildi.
- Tüp içeriklerindeki hücre ve dondurma ortamı, %10 FBS (Fetal Bovine Serum, SH30071.03, HyClone, ABD), %1 gentamisin (10 mg/ml CP19-2972, Capricorn Scientific, Almanya) içeren α -MEM (CP20-3614, Capricorn Scientific, Almanya) besi ortamı ile seyreltili. Seyreltilen besi ortamı, hücre ve dondurma ortamı içerikli süspanse ortam 15 mL santrifüj tüpüne alındı.
- Toplanan hücreler, dondurma ortamının uzaklaştırılması için 1000 rpm' de 4°C' de 5 dakika santrifüjlendi (5810 R, Eppendorf, Almanya).
- Santrifüj sonrası tüpler steril kabine alındı. Tüplerde dip tarafta hücreler, üst tarafta süspenatant bulunmaktadır, süspenatant yavaşça dökülerek hücrelerden ayrılması sağlanmıştır.
- Hücrelerin bulunduğu dipteki pellet, hafifçe tüpün dibine vurularak yüzeyden kaldırıldı ve üzerine taze besi ortamı eklenerek homojenizasyon sağlanmıştır.
- Süspanse haldeki hücreler uygun ölçüdeki flaskaya alınarak pasajlanması gerçekleştirilmiştir.
- Uygun etiketleme yapıldıktan sonra flask 37°C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde (Forma Steri-Cycle, Thermo, Almanya) inkübasyona bırakıldı.

Hücre kültürü devamlılığı için pasajlama prosedürü şu şekildedir;

- Hücrelerin bulunduğu flasklardaki kullanılmış besi ortamı dökülerek flaktan uzaklaştırılır.
- Hücrelerin yüzeyi 37°C'deki Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS (L1825, Biochrom AG, Almanya) ile yıkanarak hücrelerin yapısında atık maddeler ve zayıf tutunmuş hücreler ortamdaki uzaklaştırılır.
- Hücrelerin üzerine tripsin (%0,05)- EDTA solüsyonu (L0932, Biowest, Amerika) eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C'deki CO_2 'siz inkübatörde (Heræus, ThermoFisher Scientific, Almanya) bekletilerek hücreler yüzeyden kaldırıldı.
- Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendiğinde %10 FBS içeren besi ortamı ile hücreler bir santrifüj tüpüne toplanarak 1000 rpm 4°C, 5 dakika olacak şekilde santrifüjlendi. Santrifüjasyon sonrası, süpernatant kabin içerisinde uzaklaştırıldı. Santrifüj tüpünün dibindeki kalan pellet şeklindeki hücreler hafifçe vurarak yüzeyden kaldırılıp üzerine taze besi ortamı eklenerek homojenize edilip süspansiyon haline getirildi.
- Hücre süspansiyonları 1:3 oranında yeni bir flaska alındı ve üzerine taze besi ortamı koyularak kültüre devam edildi. Kültivasyon, 37°C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde (Forma Steri-Cycle, Thermo, Almanya) inkübasyonda devam edildi.

Hücre kültürü çalışmaları hücre sayısı planlanan deneyler için istenen düzeye gelene değin devam etmiştir ardından hücreler toplanarak deney düzenekleri kurulmuştur.

3.4 Spinner Flask Optimizasyonu

Steril edilen spinner flask içerisine 15 mL %10 FBS (Fetal Bovine Serum, SH30071.03, HyClone, ABD), %1 gentamisin (10 mg/mL CP19-2972, Capricorn Scientific, Almanya) ve %1 HEPES (1M, 15630-080, Gibco, ThermoFisher Scientific, Almanya) içeren α -MEM (CP20-3614, Capricorn Scientific, Almanya) besi ortamı konularak içerisine 300 mg mikro taşıyıcı konulmuştur ardından kültürden alınan hücreler 10 mL'lik süspansiyon halinde son konsantrasyon 10^5 hücre/mL olacak şekilde spinner flask içerisine eklenmiştir tutunma kinetiğinde belirlenen süre kadar beklenmiş ve ardından spinner flask içerisinde karışma başlatılmıştır.

Spinner flask içerisinde karışma hızı başlangıçta 80 rpm olarak ayarlanmış ancak daha sonra mikro taşıyıcıların çöktüğü ve karıştırmanın sağlanamadığı görülmüş ardından manyetik karıştırıcı karıştırma hızı 100 rpm olarak ayarlanmıştır.

Spinner flask optimizasyonu Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü 3 Boyutlu Biyomalzemeler ve Biyoarafazlar Laboratuvarı bulunan CO₂'siz inkübatör içerisinde yapılmıştır; bu nedenle kullanılan ortamda %1 HEPES bulunmaktadır. Spinner flask içerisindeki ortamın iki günde bir %75'i alınıp santrifüjlenmiş ve daha sonra süpernatant dökülüp yerine taze besi ortamı konularak spinner flaska koyulmuştur.

3.5 Hücre canlılığı analizi (MTT)

MTT analizi hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri ölçümüne dayanan bir hücre canlılığı analiz yöntemidir. Hücreler bir kolorimetrik substratla birlikte (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)) inkübe edilir MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen besi yeri veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarıya yakın bir renkte solüsyon oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimleri ile parçalanması sonucu MTT mor renkli, suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrieleri aracılığı ile olur. Oluşan bu formazan kristalleri dimetil sülfoksit ile çözüldüğünde mor renk verir ve spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir (Castell et al., 1996).

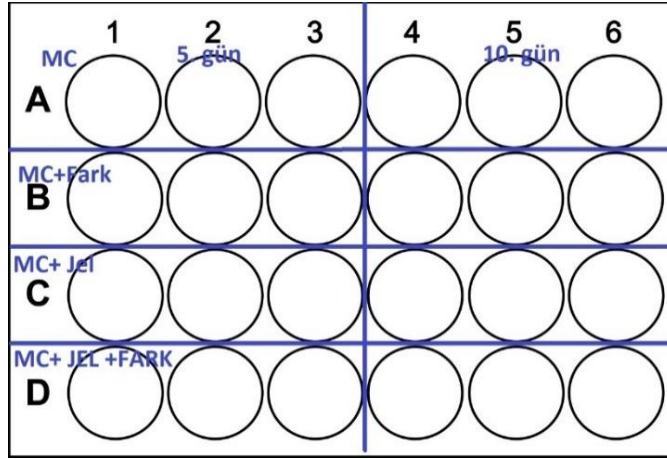
Spinner flaskta kültür devam ederken 36. 72. 96. ve 120. saatlerde üst sıvıdan ve mikro taşıyıcılardan örnek alınarak MTT (M5655, Sigma, ABD) ile hücre canlılığı analizi yapılmıştır.

3.6 Mikro taşıyıcılar ile Hidrojelin Karıştırılması

Hücreler ile bir araya getirilen mikro taşıyıcılar 500µL besi ortamı ile 1 mL' lik eppendorf tüplere alınmıştır ardından üzerlerine 500µL %4 w/v aljinat- %4 w/v Karboksimetil selüloz hibrid hidrojeli eklenerek homojen hale getirilmiştir daha sonra 1 mL' lik insülin enjektörü yardımıyla %2 w/v CaCl₂ içeren çapraz bağlanma ortamına alınarak jelin çapraz bağlanması sağlanmıştır

3.7 Live & Dead Boyama

Hücre içerikli greft yapıları ile jel içermeyen mikro taşıyıcı yapıları 5. ve 10. günlerde Live & Dead (L3224, Invitrogen, Amerika) boyamaya tabi tutulmuş ve ardından floresan mikroskopta görüntülenerek fotoğraflanmıştır. 24 gözlü süspanse well platein ilk üç sütunu 5. gün için sonraki üç sütunu da 10. gün için ayrılmıştır platein ilk iki satırında yalnızca mikro taşıyıcı ve hücreler son iki satırında ise jel ile karıştırılarak deney seti oluşturulmuştur (Şekil 3.3). Live & Dead boyama ve görüntüleme Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü 3 Boyutlu Biyomalzemeler ve Biyoarafazlar Laboratuvarında yapılmıştır.



Şekil 3.3 L&D deney seti planı

3.8 Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Boyamalar

Hücre içerikli greft yapıları ve jel içermeyen mikro taşıyıcı yapıları esas olarak farklılaşmanın görüldüğü 21. ve 28. günlerde histolojik olarak incelenecektir, farklılaşmada kullanılan standart protokoller olan Alizarin Red-S ve von Kossa boyamaları kimyasal yapıları gereği ortamda bulunan kalsiyum fosfat depozitlerine bağlanmaktadır. Ancak bu çalışmada kullanılan MC'lerin yapıları esasen kalsiyum fosfat bileşikleri olduğundan farklılaşmalar immünohistokimyasal boyama ile saptanmaya çalışılmıştır. Kullanılan boyama protokolleri tablodaki gibidir. (Tablo-2 ve Tablo-3).

Tablo 2: Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

	İşlem	Süre
Rehidratasyon Aşaması	%100 Alkol	2 dk..
	%100 Alkol	2 dk..
	%95 Alkol	2 dk..
	%80 Alkol	2 dk..
	Distile su	5 dk..
Hematoksilen ve Eozin Boyama Aşaması	Hematoksilen	10 dk..
	Akar su	1 dk.. yıkama
	Asit alkol	Fazla rengi akana kadar yıkama
	Akar su	2-3 kez daldır çıkar
	Amonyaklı su	2-3 kez daldır çıkar
	Akarsu	2-3 kez daldır çıkar
	Distile su	1 dk..
	Eozin	2 dk..

Dehidratasyon Aşaması	%95 Alkol	1-2 kez daldır çıkar
	%100 Alkol	1-2 kez daldır çıkar
	%100 Alkol	2 kez daldır çıkar

Dehidratasyon aşaması bittikten sonra kurutulacak olan doku kesitleri, fazla boyanın akması ve preparatın temizlenmesi amacıyla 30 dk. ksilolde bekletilir. Ksilolden çıkarılan preparatlar, kurutulduktan sonra, entellan ile kapatılır.

Tablo 3: İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü

Uygulanacak İşlemler	Süre
%100 Alkol	2 dk..
%100 Alkol	2 dk..
%95 Alkol	2 dk..
%80 Alkol	2 dk..
Distile su ile yıkama	5 dk..
Sodyum sitrat solüsyonu 90°C mikrodalgada	30 dk..
Soğuk su banyosu	20 dk..
Distile su	5 dk..
%0,1'lik Triton x solüsyonunda	5 dk..
%3'lük H ₂ O ₂ solüsyonu	10 dk..
PBS tamponu içerisinde 3 kez	2'şer dk..
Dokuları etrafı pappen ile çizilir ve Serum blocking solüsyonu damlatılır	30 dk..
Serum blocking solüsyonu dokudan uzaklaştırılır ve primer antikor damlatılır nemli ortamda +4°C	Gece boyu
PBS tamponu içerisinde 3 kez	2 dk..
Primer ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor	30 dk..
PBS tamponu içerisinde 3 kez	2 dk..
Streptoavidin ile işaretli antikor (HRP)	30 dk..
PBS tamponu içerisinde 3 kez	2 dk..
DAB (3,3-diaminobenzidine)	Gözle takip
Distile su ile yıkama	3 dk..
Hematoksilen	1 dk..
Çeşme suyu ile yıkama	5 dk..
Distile su ile yıkama	2 dk..

%95 alkol	Daldır çıkar şeklinde
%100 alkol	Daldır çıkar şeklinde
%100 alkol	Daldır çıkar şeklinde

Tablodaki işlem basamaklarının uygulanmasından sonra ise preparatlar şeffaflaştırılmak amacıyla 30 dakika boyunca ksilol ile muamele edilir. Ksilol sonrasında ise preparatlar entellan ile kapatılarak görüntülemeye hazır hale getirilir.

Tüm histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD. laboratuvarında yapılmıştır.



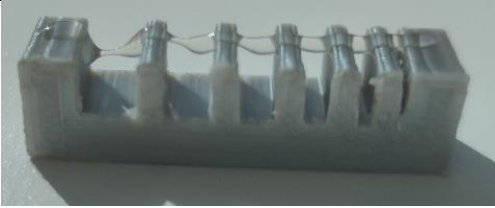
4. BULGULAR

4.1 İdeal Hidrojel Konsantrasyonun Belirlenmesi ve Karakterizasyonu

4.1.1 Hidrojellerin Basılabilirlik Yönünden İncelenmesi

Tez çalışmasında aljinat ve karboksimetil selüloz hidrojelleri farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak filament dağılma testi ile basılabilirliği değerlendirilmiştir.

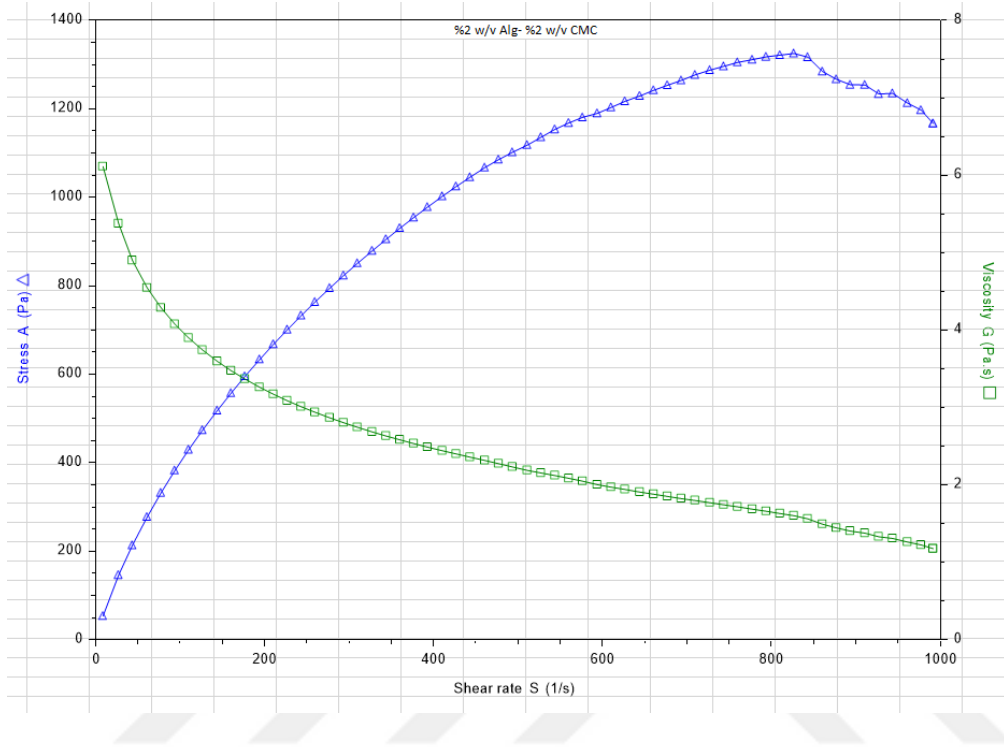
Tablo 1: Hidrojellerin filament dağılma testi

%4 Aljinat	%4 CMC
	
%3 Aljinat-%1 CMC	%3 CMC- %1 Aljinat
	
%2 CMC- %2 ALG	
	

Elde edilen görüntüler sonucunda çalışmaya %2 w/v Aljinat- %2 w/v Karboksimetil selüloz hibrid hidrojel ile devam etme kararı verilmiştir.

4.1.2 Hidrojelin Viskozitesi

%2 Aljinat ve %2 Karboksimetil selüloz hibrid hidrojelinin viskozitesi ölçülmüş-tür ve şekildeki grafik elde edilmiştir.

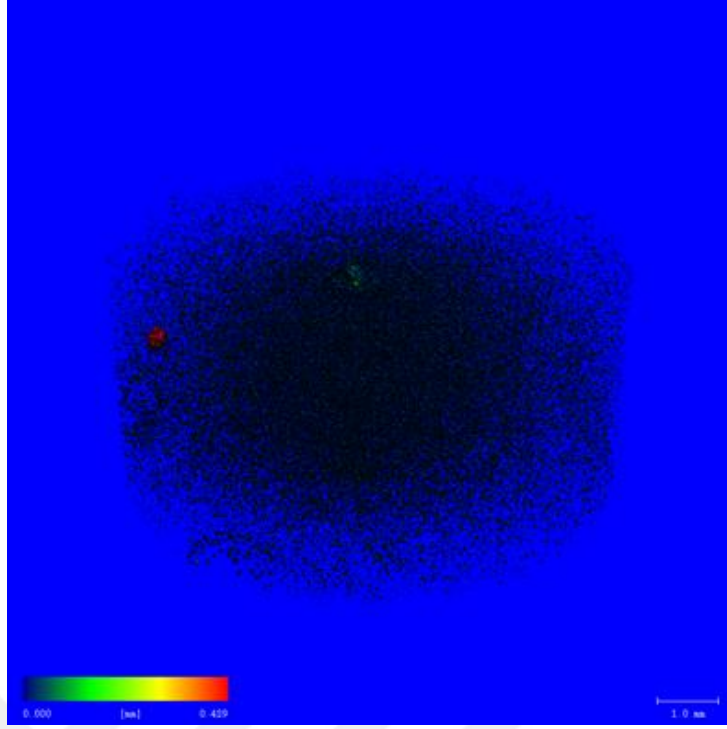


Şekil 4.1 %2 w/v Aljinat/ %2 w/v CMC hibrid hidrojelinin kayma gerilmesi- viskozite grafiği

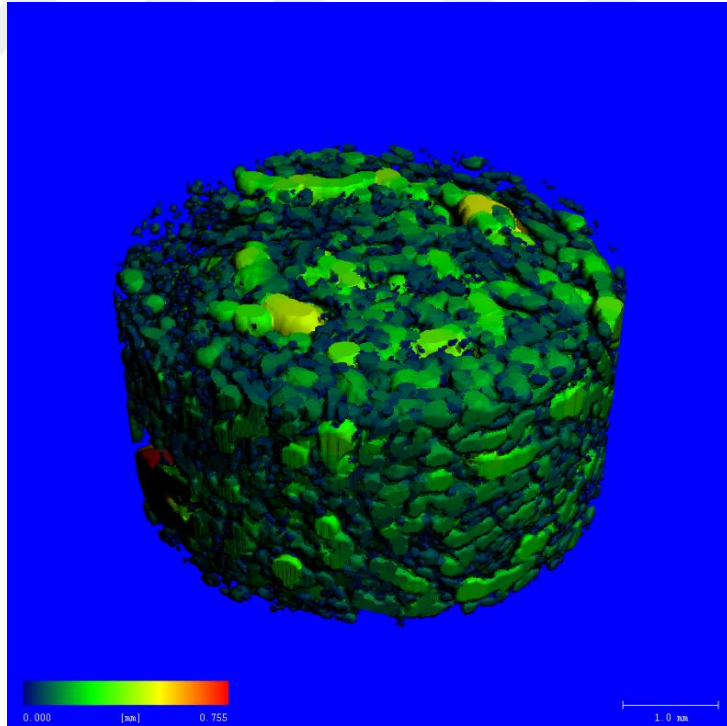
Yapılan biyobaskı çalışmalarında hücrelerin canlılığına zarar vermeyecek viskozite aralığının 300 cP ve altında olmaması (He et al. 2016), 100.000 cP ve üzerinde olmaması (Khalil et al. 2009) gerektiğini göstermektedir. Elde edilen grafik hibrid hidrojelinin viskozitesinin kayma gerilmesine bağlı olarak 1200 cP- 6500 cP aralığında değişmekte olduğunu göstermiştir; bu da hidrojellerde biyobaskı için istenen viskoziteye ulaşıldığını göstermektedir.

4.1.3 Hidrojelin Porozitesi

Hazırlanan hibrid hidrojelden 1 mL örnek alınarak CaCl_2 çözeltisi içerisine damlatılmış ve ardından μ -CT cihazı ile porozitesine bakılmıştır daha sonra aynı şekilde bir örnek daha hazırlanarak liyofilize edilerek porozitesine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlarda hidrojelinin liyofilize halinde ortalama por çapı 0,184 mm, liyofilize olmayan halinde ortalama por çapı 0,0278 mm olarak belirlenmiştir; ayrıca liyofilize hidrojelde porozite %59 olarak belirlenmiş, liyofilize olmayan hidrojelde porozite değeri %1,06 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3).



Şekil 4.2: Liyofilize olmayan hibrid hidrojin μ -CT ile elde edilen porozite görüntüsü: ortalama por çapı 0,0278 mm, porozite değeri %1,06

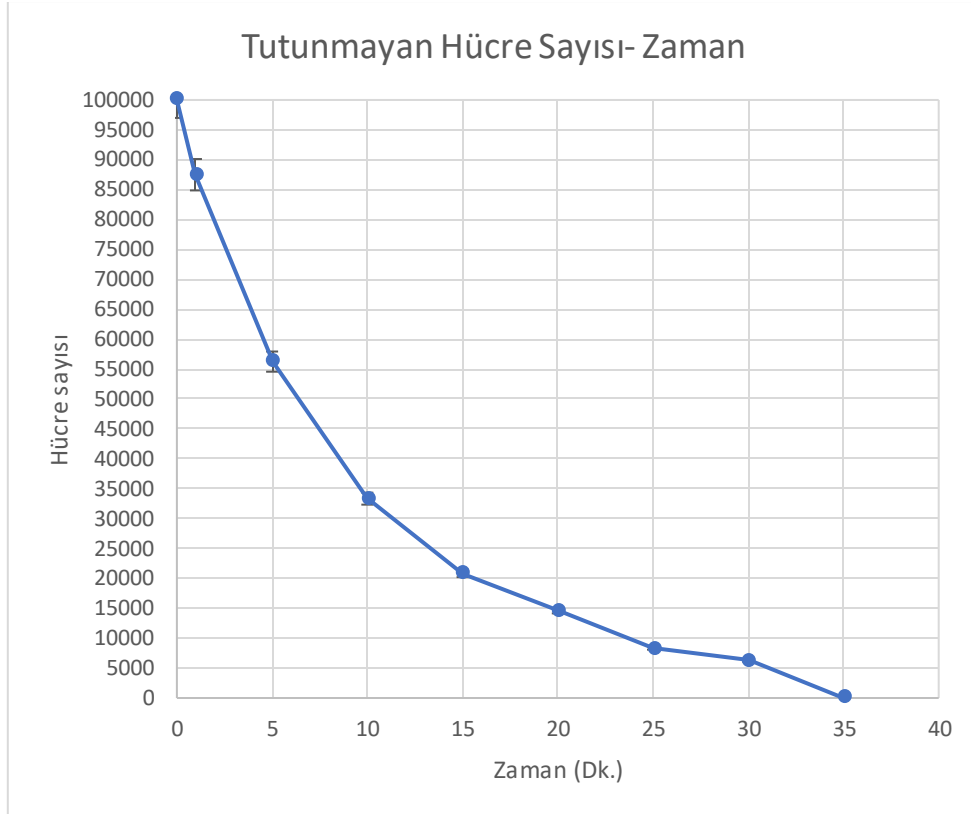


Şekil 4.3: Liyofilize hibrid hidrojin μ -CT ile elde edilen porozite görüntüsü: ortalama por çapı: 0,184 mm, porozite değeri %59

4.2 Hücrelerin Mikro taşıyıcı Üzerine Tutunma Özelliklerinin Belirlenmesi

4.2.1 Hücrelerin Tutunma Kinetiğinin Belirlenmesi

Hücreler mikro taşıyıcılar üzerine ekilerek tutunma kinetiği belirlenmiştir.

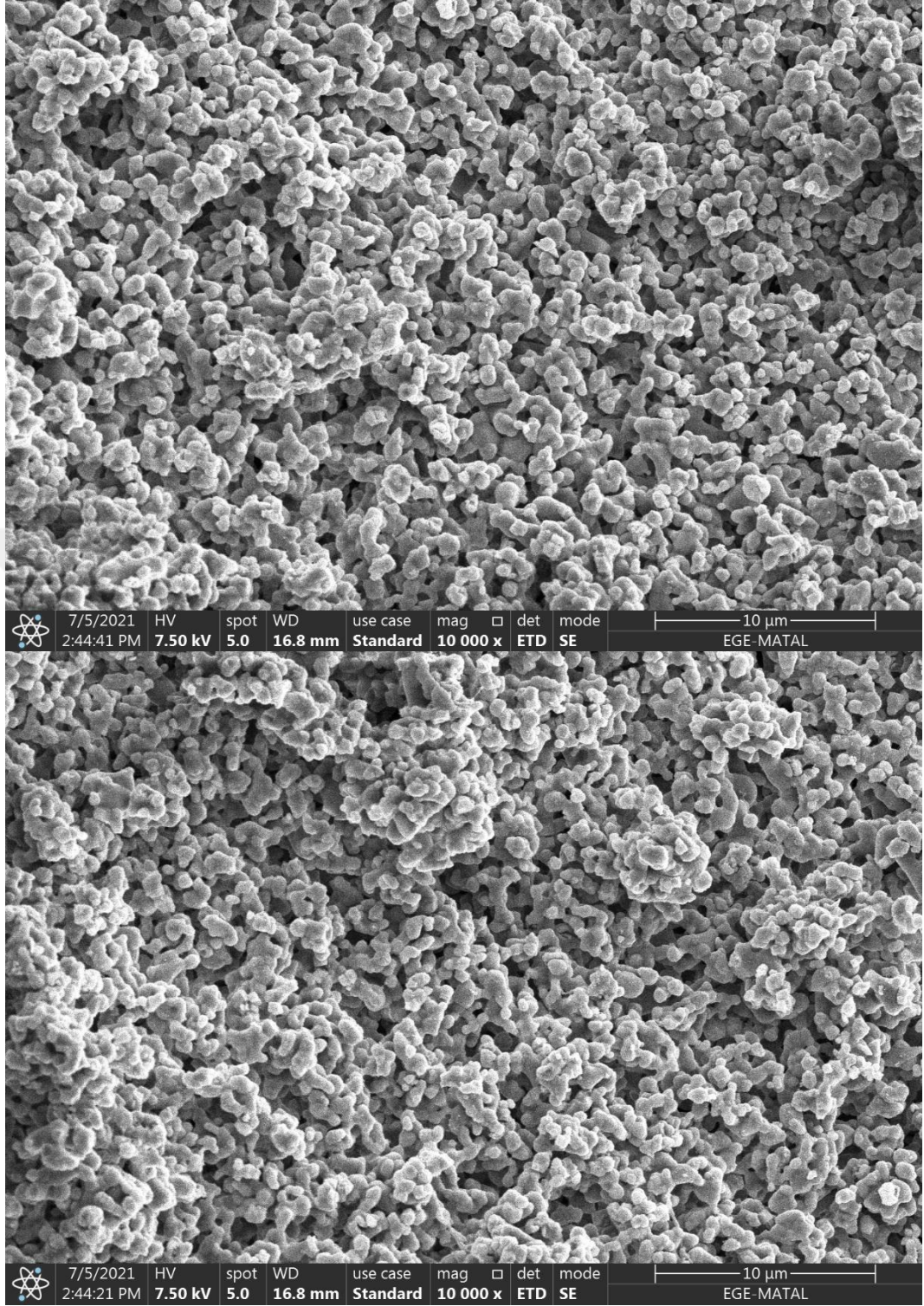


Şekil 4.4 Mikro taşıyıcı yüzeylerine ekilen hücrelerin zamana bağlı olarak oluşturulan tutunma grafiği; ilk hücre konsantrasyonu 10^5 h/mL olup hücrelerin tamamen tutunma süresi 35 dk. olarak belirlenmiştir.

Buna göre hücrelerin HAp/ β -TCP yapıları mikro taşıyıcı yüzeylerine 35 dakikada tamamen tutundukları saptanmıştır.

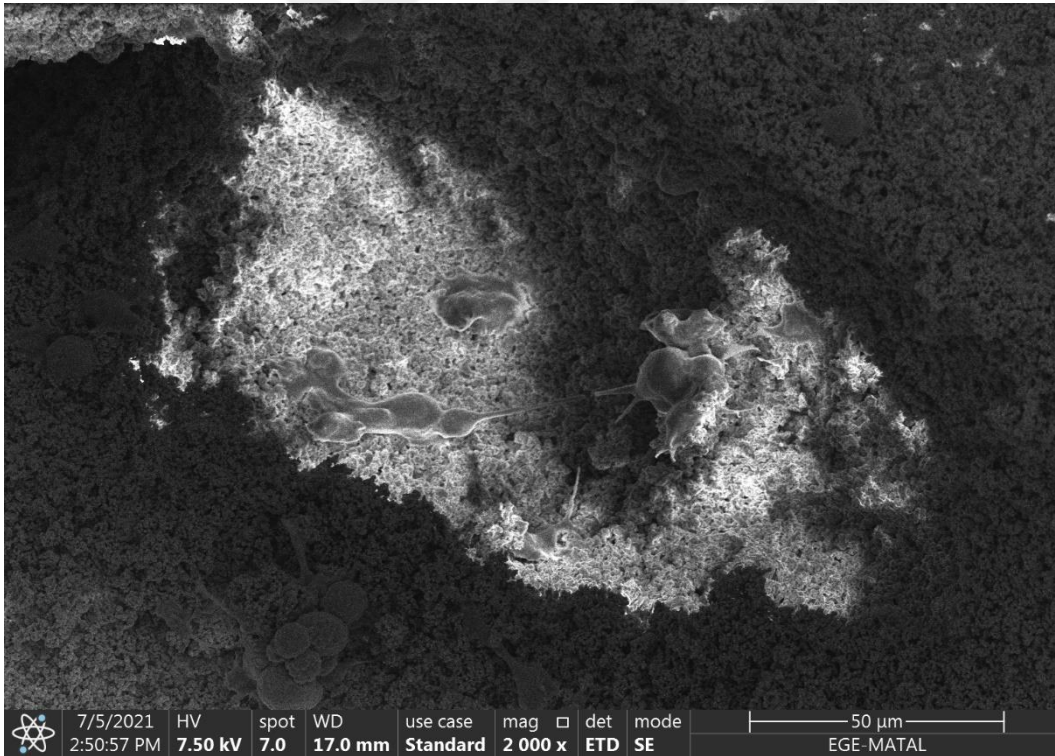
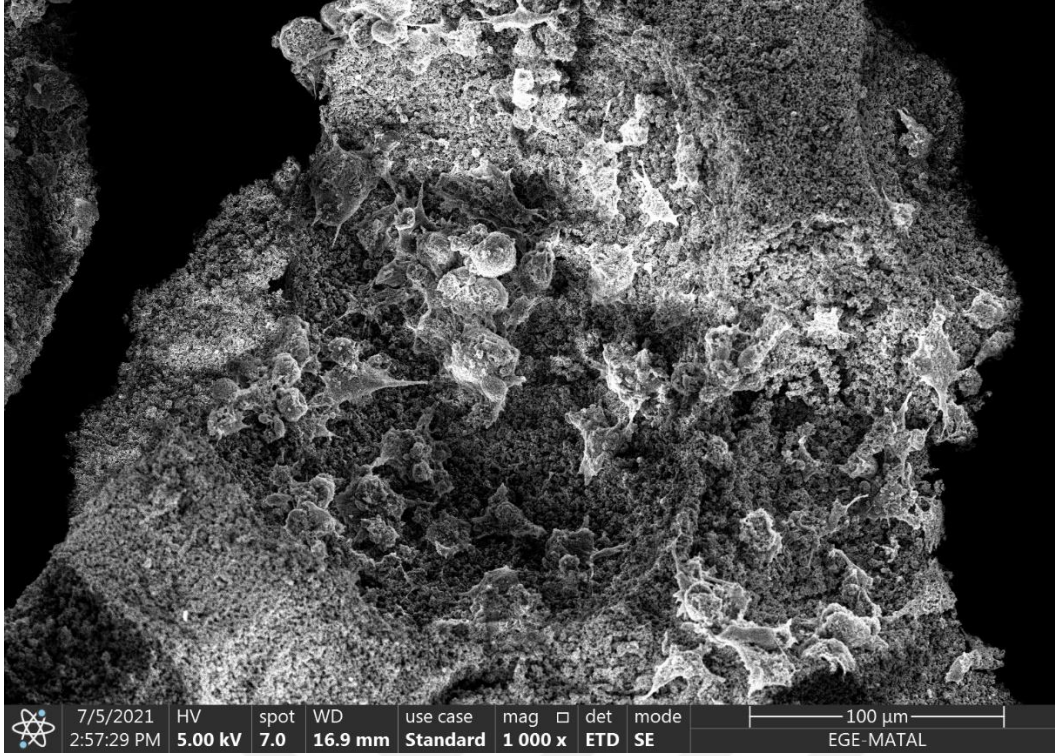
4.2.2 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Hücrelerin mikro taşıyıcı yüzeylerinde tutunmaları ve mikro taşıyıcı yüzey morfolojilerinin görüntülenmesi için elektron mikroskopisi ile yüzeyler görüntülenmiştir.



Şekil 4.5 Mikro taşıyıcı yüzeyi SEM görüntüleri (x10000)

Elde edilen SEM fotoğrafları malzeme yüzeyinin porlu ve hücre tutunmasına elverişli olduğunu göstermiştir. Ayrıca seramik kristalleri de belirgin şekilde gözükmektedir.



Şekil 4.6 Mikro taşıyıcı yüzeyine tutunmuş hücrelerin SEM görüntüleri (x1000 ve x2000)

Tutunma kinetiği belirlendikten sonra mikro taşıyıcı yüzeyine tutunan hücrelerin SEM fotoğrafları çekilmiş ve hücrelerin malzeme yüzeyine tutunup ayrıca birbirleriyle de etkileşime geçtikleri gözlenmiştir.

4.3 Spinner Flask Optimizasyonu

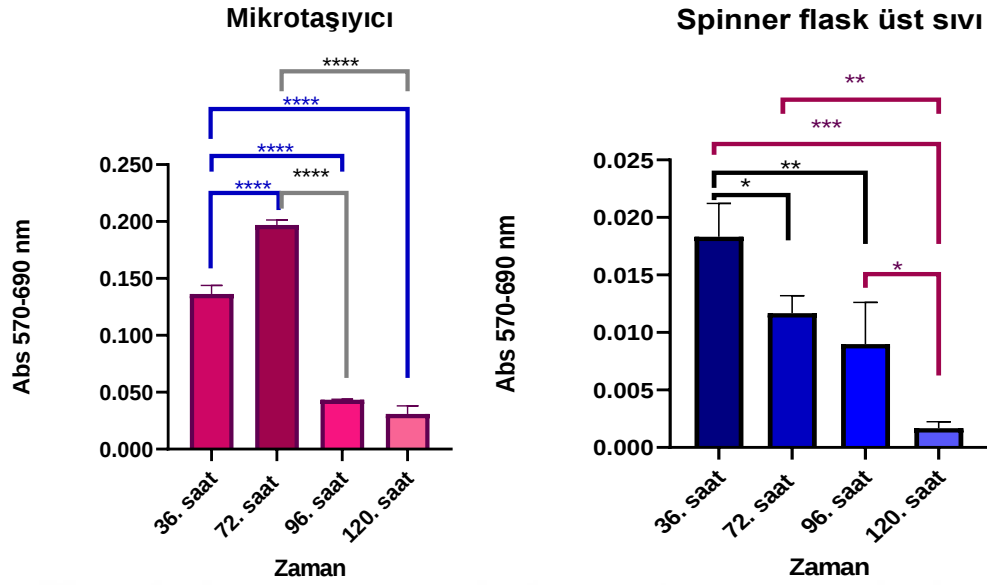
Mikro taşıyıcılar ve hücreler spinner flaskta bir araya getirilerek 5 gün boyunca karıştırılmışlardır. Literatür araştırması neticesinde 80 rpm karıştırma hızı ile başlanmış, ancak kullanılan mikro taşıyıcıların çökmesi sonucu karışma hızı 100 rpm' e çıkarılmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Spinner flaskın ideal karışma hızı

4.4 Hücre Canlılığı Analizi

Karıştırma hızı belirlendikten sonra 36., 72., 96. ve 120. saatlerde mikro taşıyıcılardan ve spinner içerisindeki sıvıdan (üst sıvı) örnek alınarak MTT ile canlılık analizi gerçekleştirilmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.8).

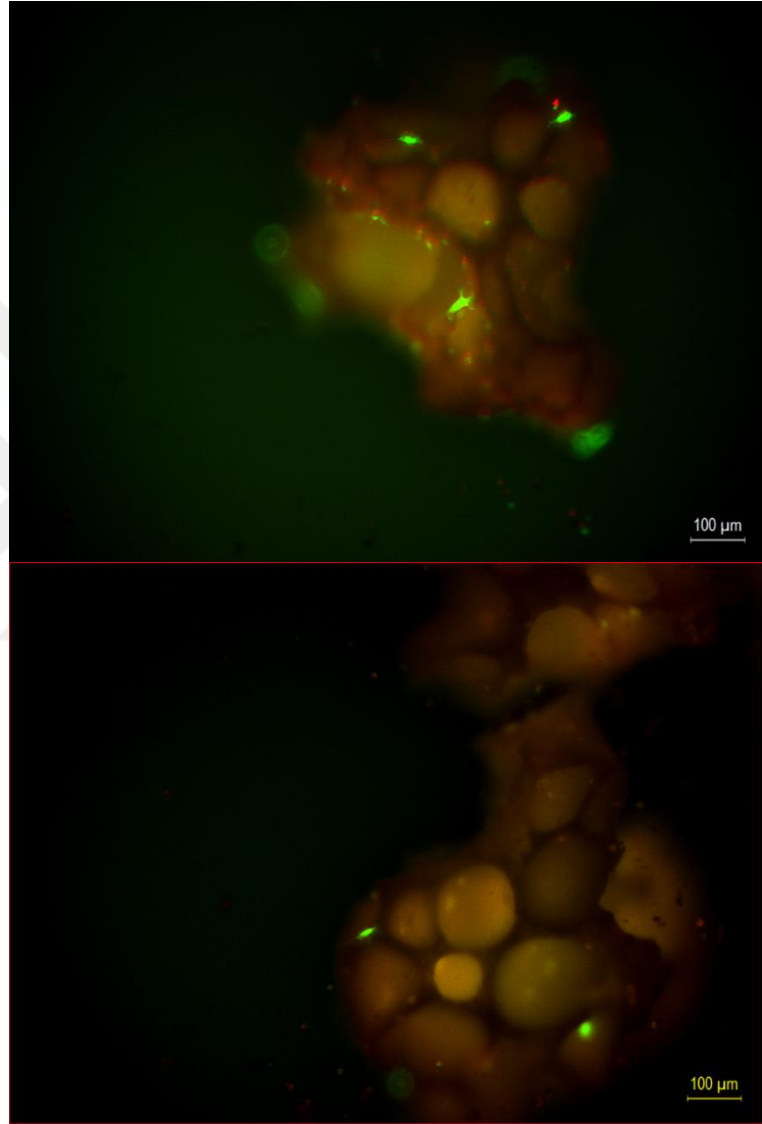


Şekil 4.8 Mikro taşıyıcı ve üst sıvıda yapılan MTT sonuçlarında elde edilen canlılık grafiği (Farklılıklar, $p^* < 0.05$, $p^{**} < 0.01$, $p^{***} < 0.001$ ve $p^{****} < 0.0001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.)

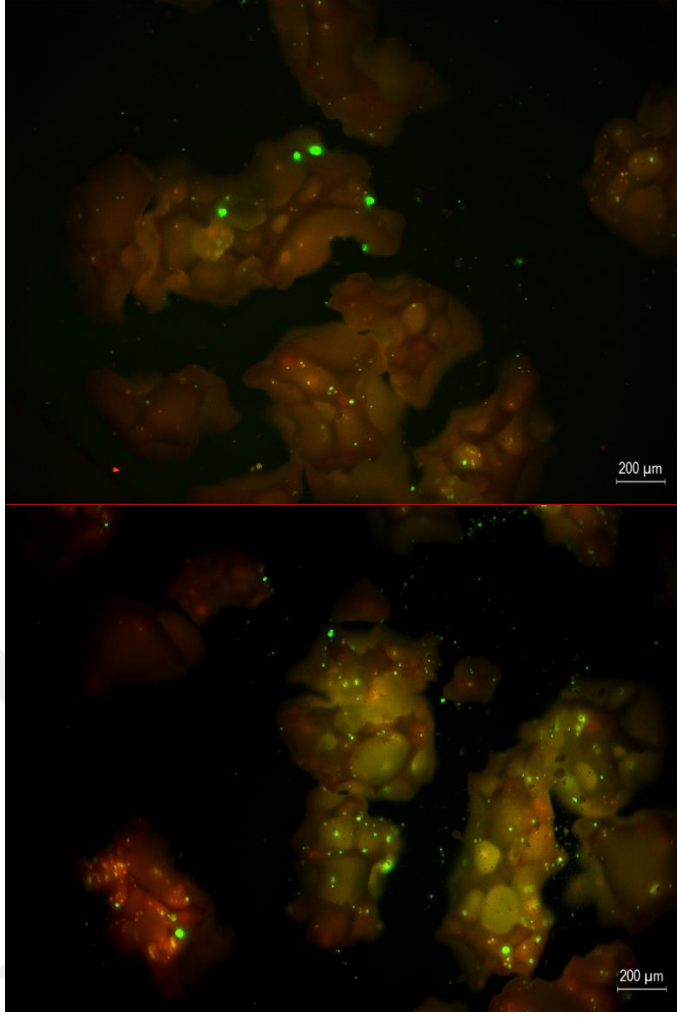
Elde edilen sonuçlar doğrultusunda oluşturulan grafiklerde de gösterildiği gibi 36. saatten 72. saate doğru canlılık artmıştır; daha sonrasında ise canlılık azalmıştır. Bu sonuç 100 rpm' lik karışma hızında 3 günlük spinner flask kültürünün yeterli olabileceğini, daha uzun süre ise mikro taşıyıcı yüzeyindeki hücrelerin de ölebileceğini göstermektedir.

4.5 Live & Dead Boyama

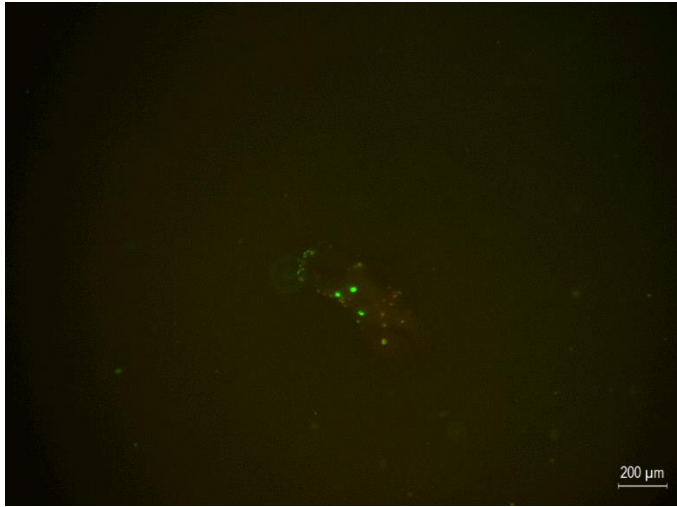
Live & Dead boyama 4 deney grubunda 5. ve 10. günlerde yapılmıştır, elde edilen görüntüler şekillerdeki gibidir (Şekil 4.9 – Şekil 4.16).



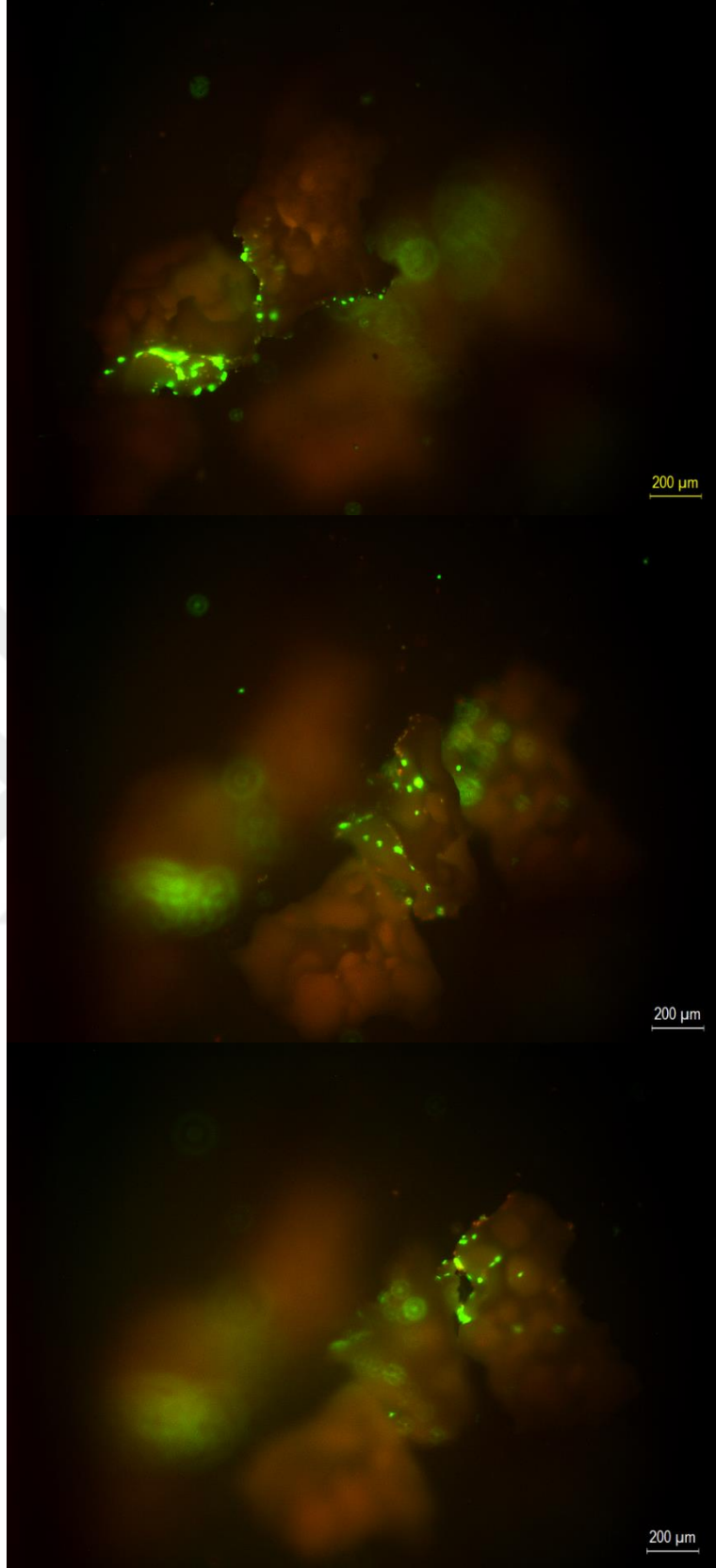
Şekil 4.9 MC üzerinde hücrelerin farklılaşma ortamı olmadan beş günlük inkübasyonu sonrası L&D boyama görüntüleri (x10)



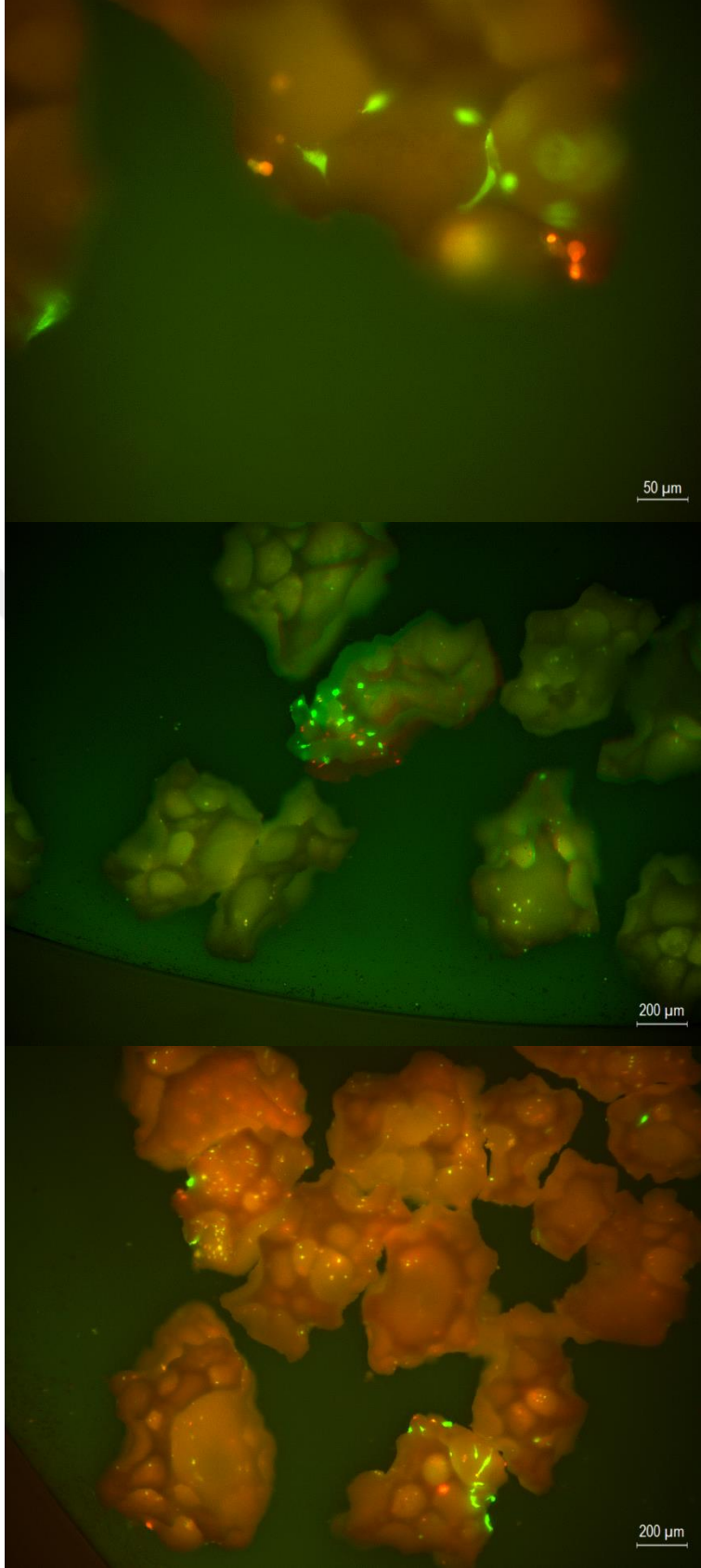
Şekil 4.10 MC üzerinde hücrelerin farklılaşma ortamı ile beş günlük inkübasyonu sonrası L&D boyama görüntüleri (x5)



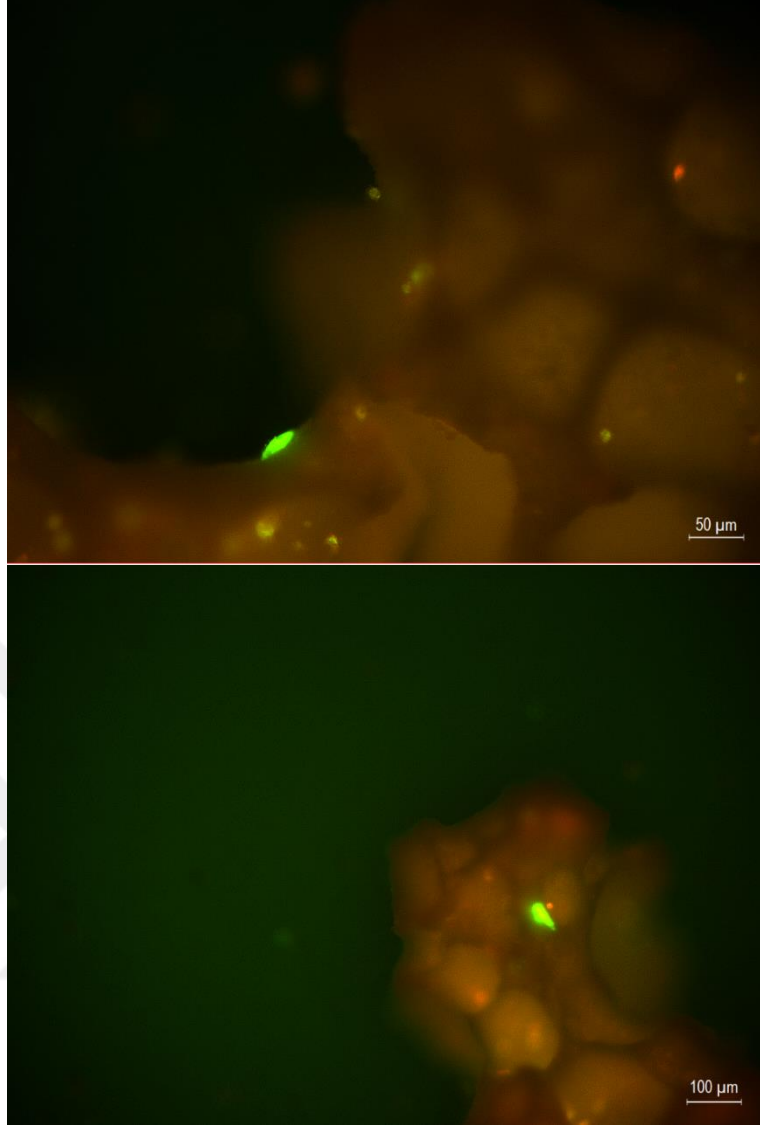
Şekil 4.11 MC üzerindeki hücrelerin jelle karıştırılarak farklılaşma ortamı olmadan beş günlük inkübasyonu sonrası L&D boyama görüntüsü (x5)



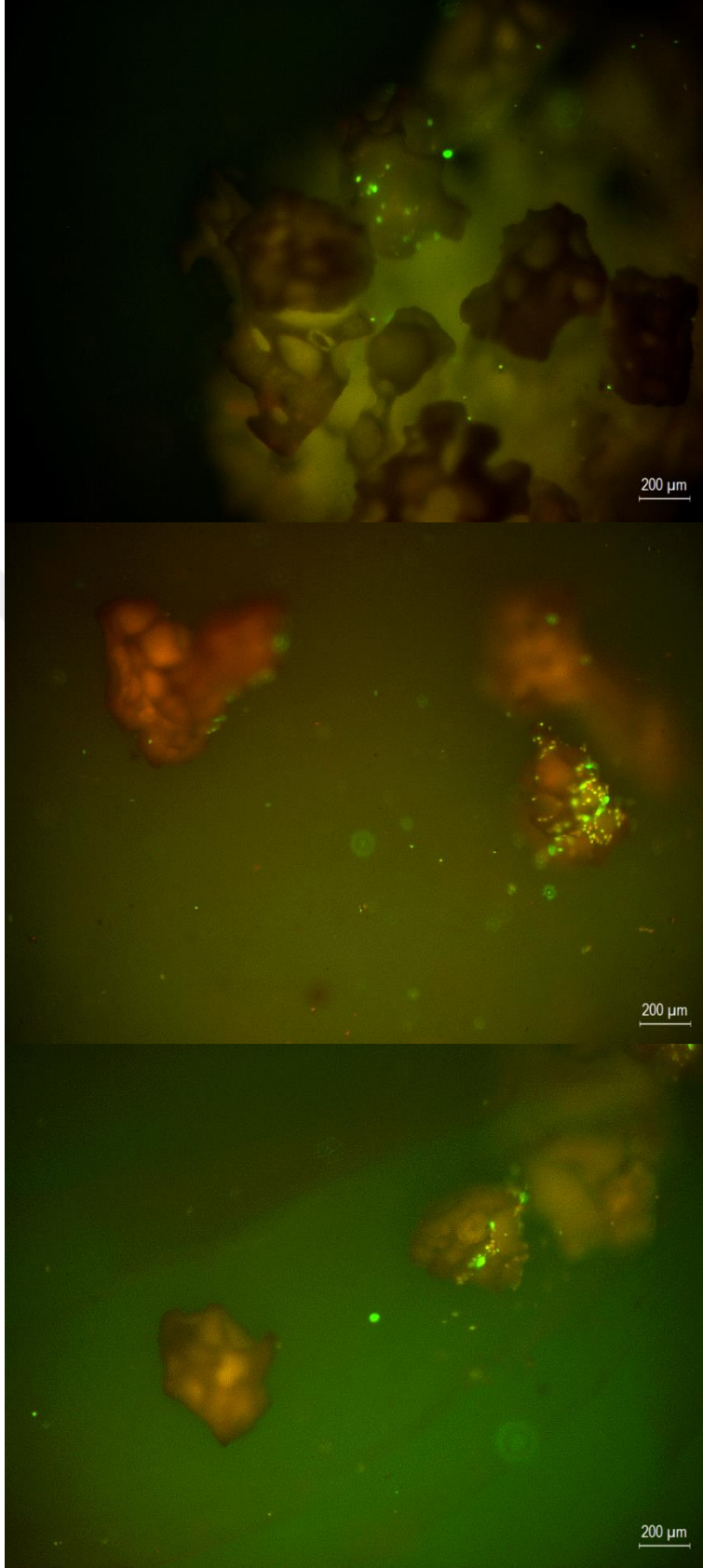
Şekil 4.12 MC üzerindeki hücrelerin jelle karıştırılarak farklılaşma ortamı ile beş günlük inkübasyonu sonrası L&D boyama görüntüleri (x5)



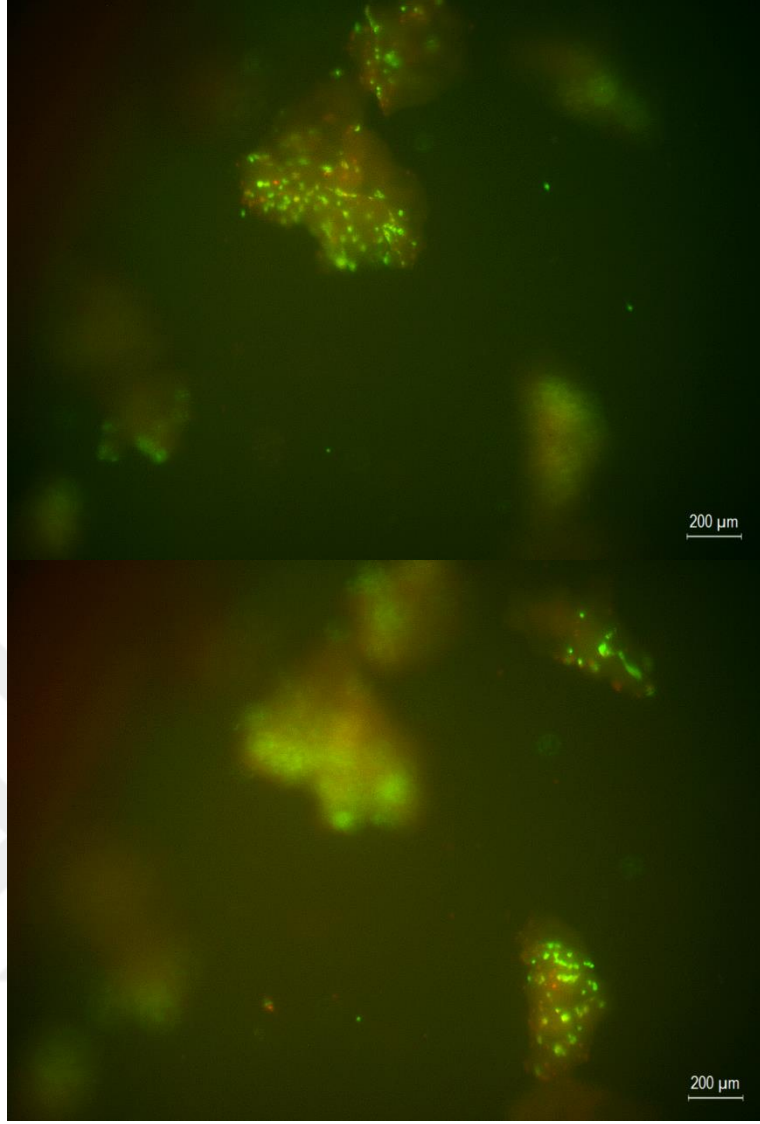
Şekil 4.13 MC üzerinde hücrelerin farklılaşma ortamı olmadan on günlük inkübasyonu sonrası L&D boyama görüntüleri (x20, x5 ve x5)



Şekil 4.14 MC üzerinde hücrelerin farklılaşma ortamı ile on günlük inkübasyonu sonrası L&D boyama görüntüleri (x20 ve x10)



Şekil 4.15 MC üzerindeki hücrelerin jelle karıştınlararak farklılaşma ortamı olmadan on günlük inkübas-
yonu sonrası L&D boyama görüntüsü (x5)

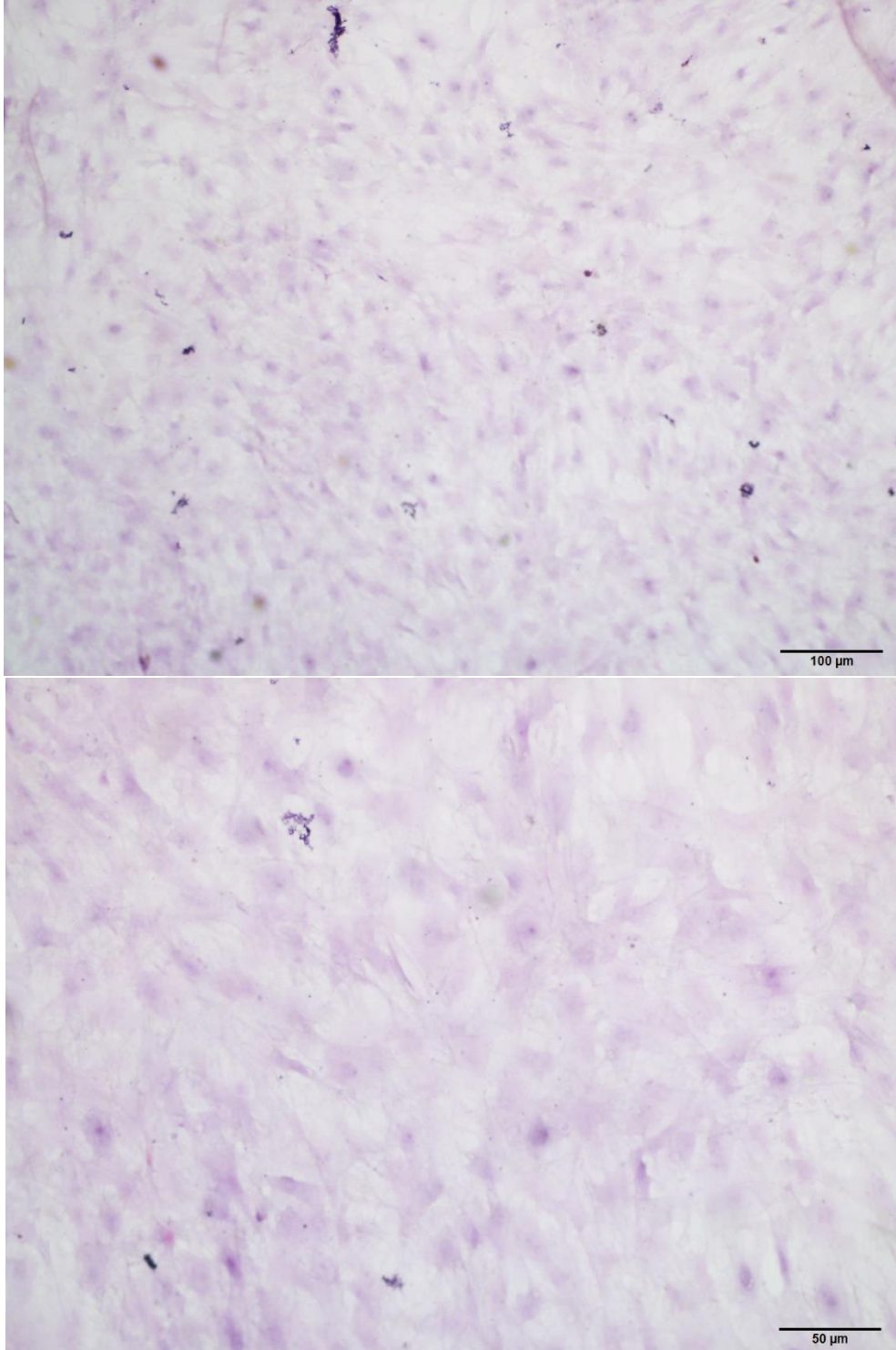


Şekil 4.16 MC üzerindeki hücrelerin jelle karıştırılarak farklılaşma ortamı ile on günlük inkübasyonu sonrası L&D boyama görüntüleri (x5)

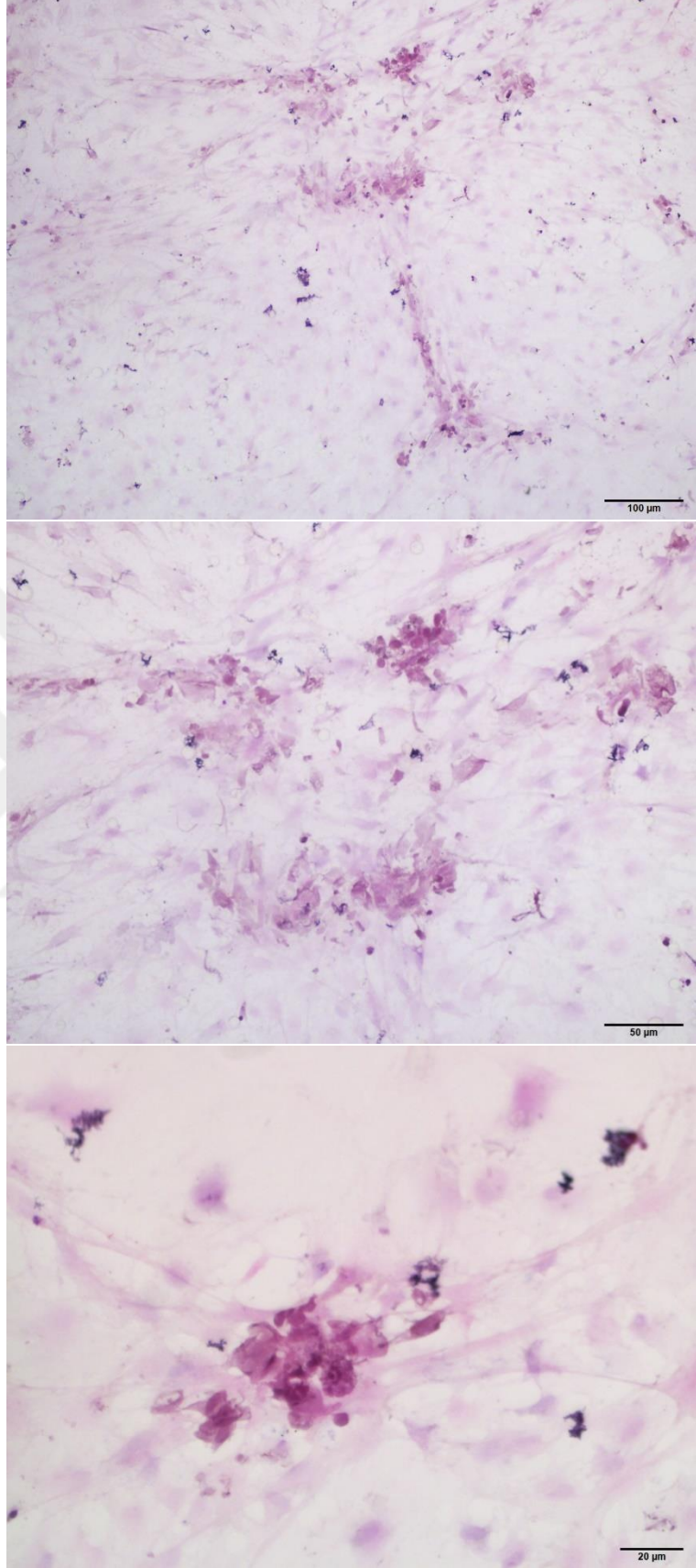
Elde edilen Live & Dead boyama görüntüleri hücrelerin mikro taşıyıcı yüzeyinde 5. ve 10. günlerde canlı kaldıklarını ayrıca hidrojelin canlılığı olumsuz yönde etkilemediğini göstermektedir.

4.6 Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Boyamalar

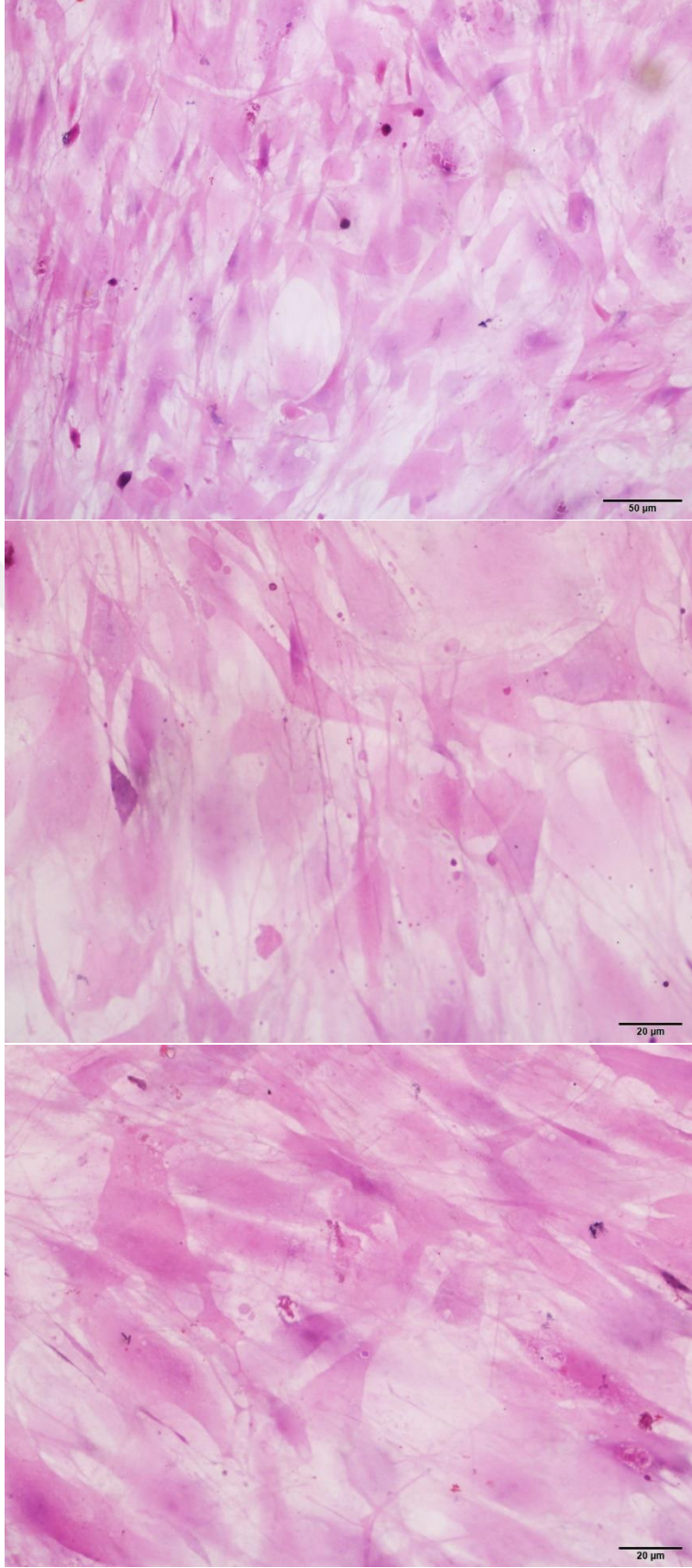
Deney gruplarına 21. ve 28. günlerde hematoksilin-eozin ve anti-bone sialoprotein (BSP) boyamaları yapılmıştır.



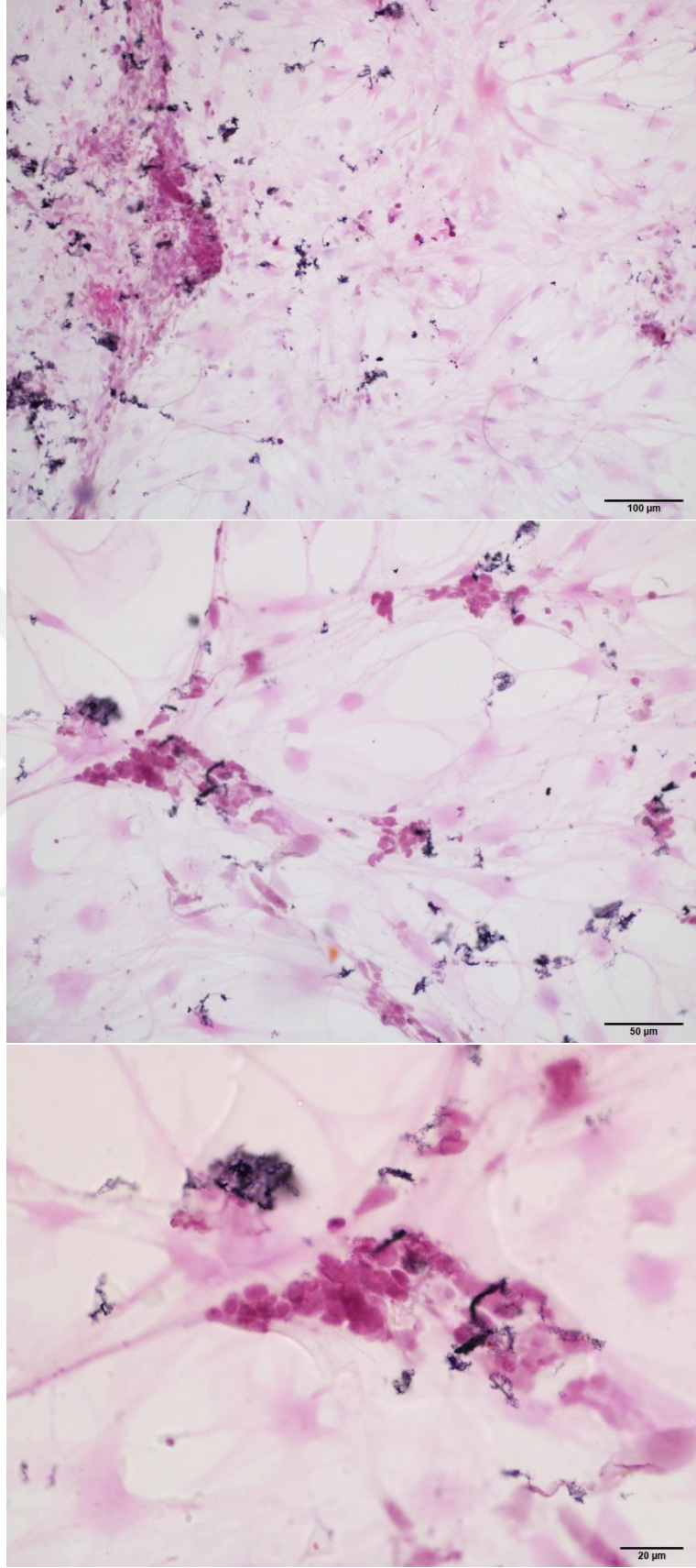
Şekil 4.17: Lam üzerinde 21. günde farklılaşma ortamı olmadan kültüre edilen hücrelerin hematoksilin-eozin boyamaları (10x ve 20x)



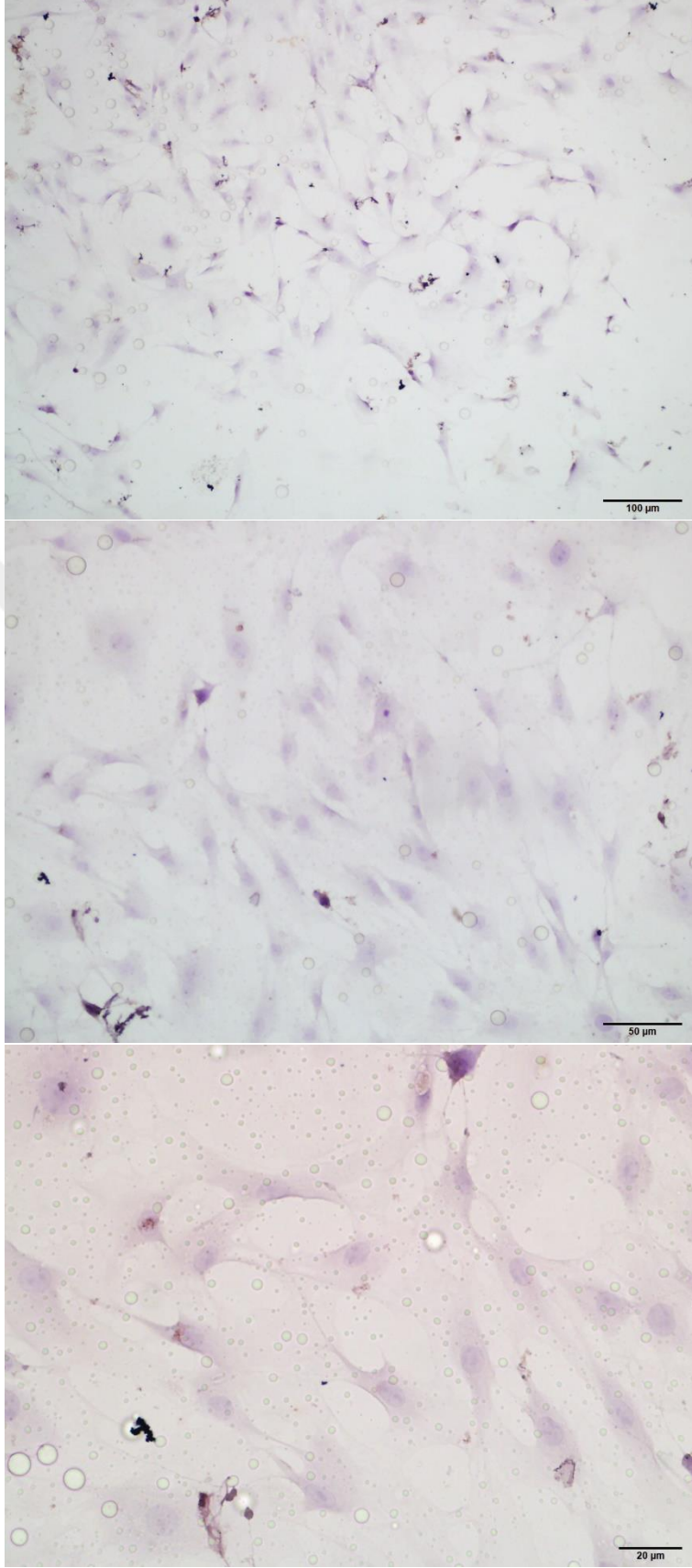
Şekil 4.18: Lam üzerinde 21.günde farklılaşma ortamı ile kültüre edilen hücrelerin hematoksilen-eozin boyamaları (10x, 20x, 40x)



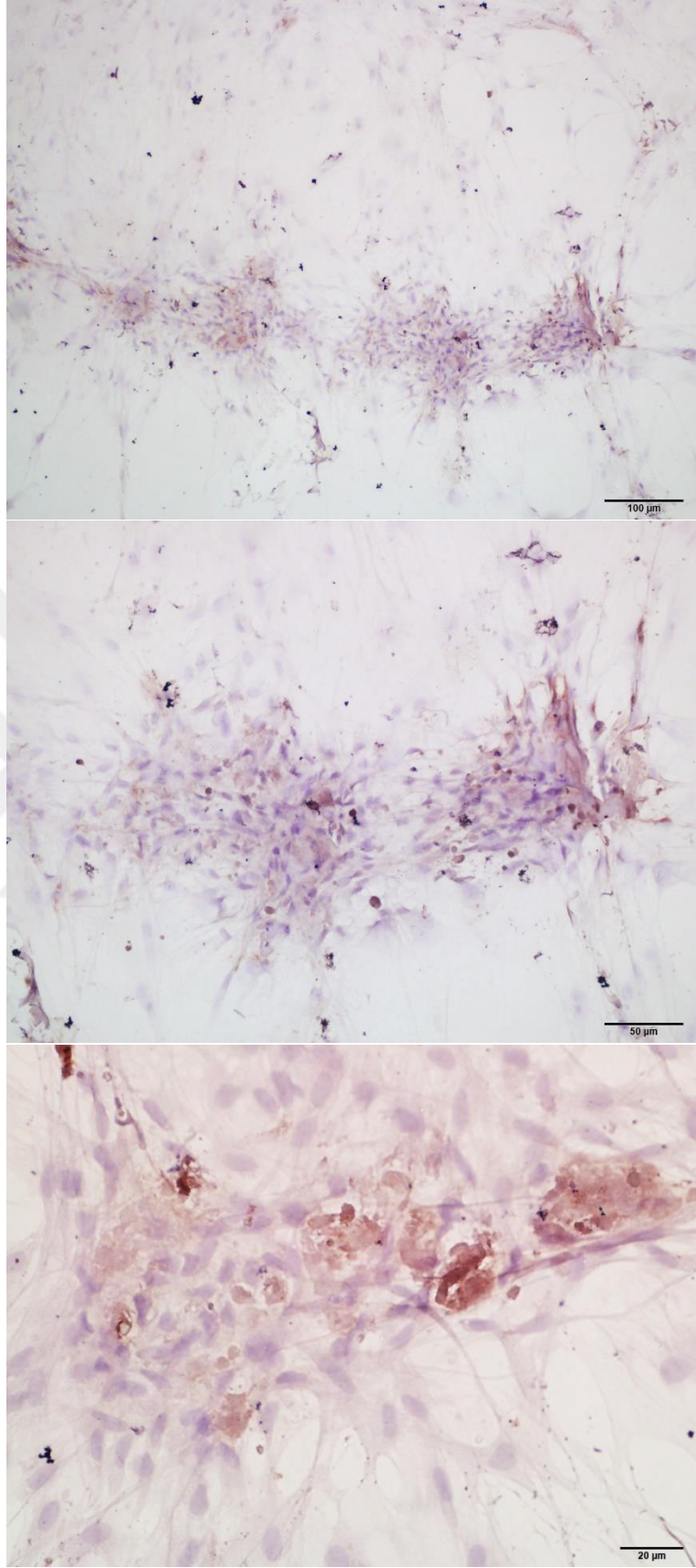
Şekil 4.19: Lam üzerinde 28. günde farklılaşma ortamı olmadan kùltive edilen hücrelerin hematoksilin-eozin boyamaları (20x, 40x, 40x)



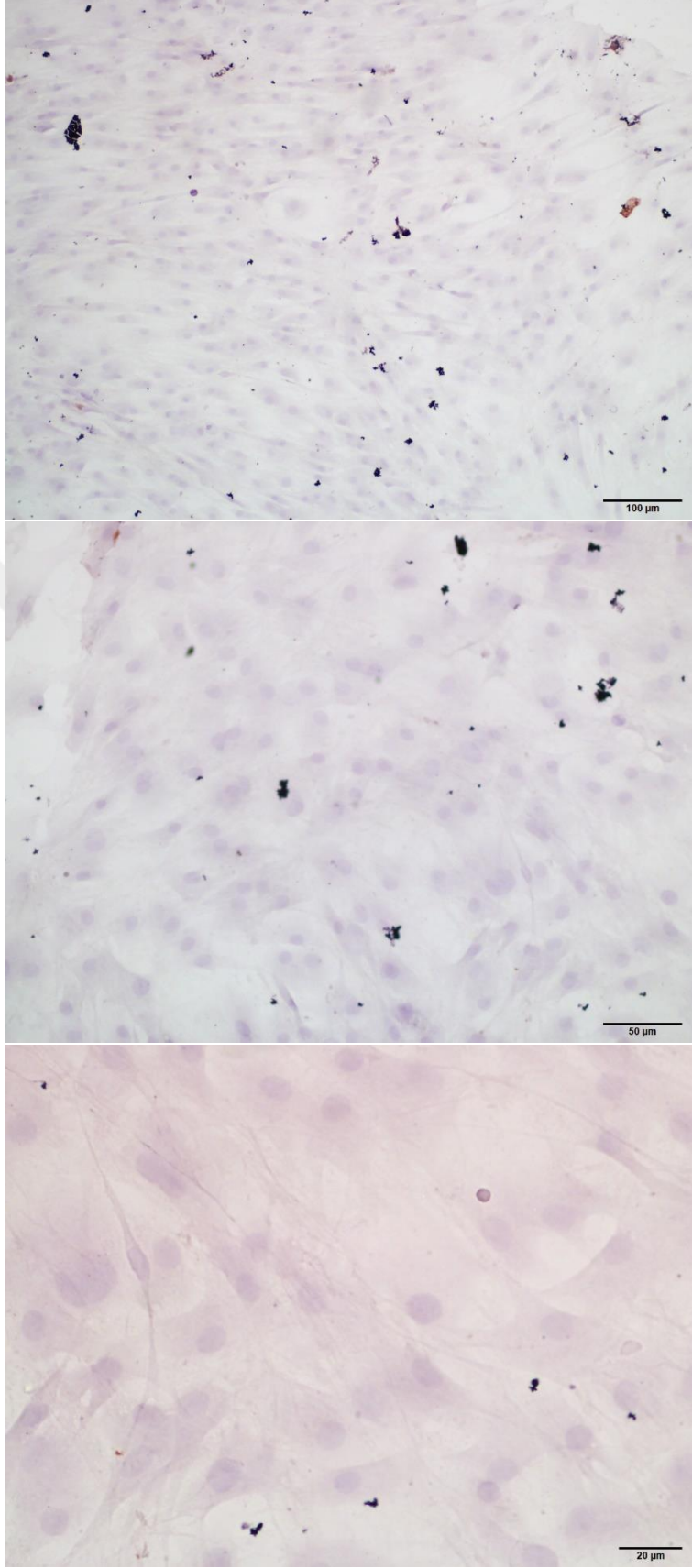
Şekil 4.20: Lam üzerinde 28. günde farklılaşma ortamı ile kültüre edilen hücrelerin hematoksilen-eozin boyamaları (10x, 20x, 40x)



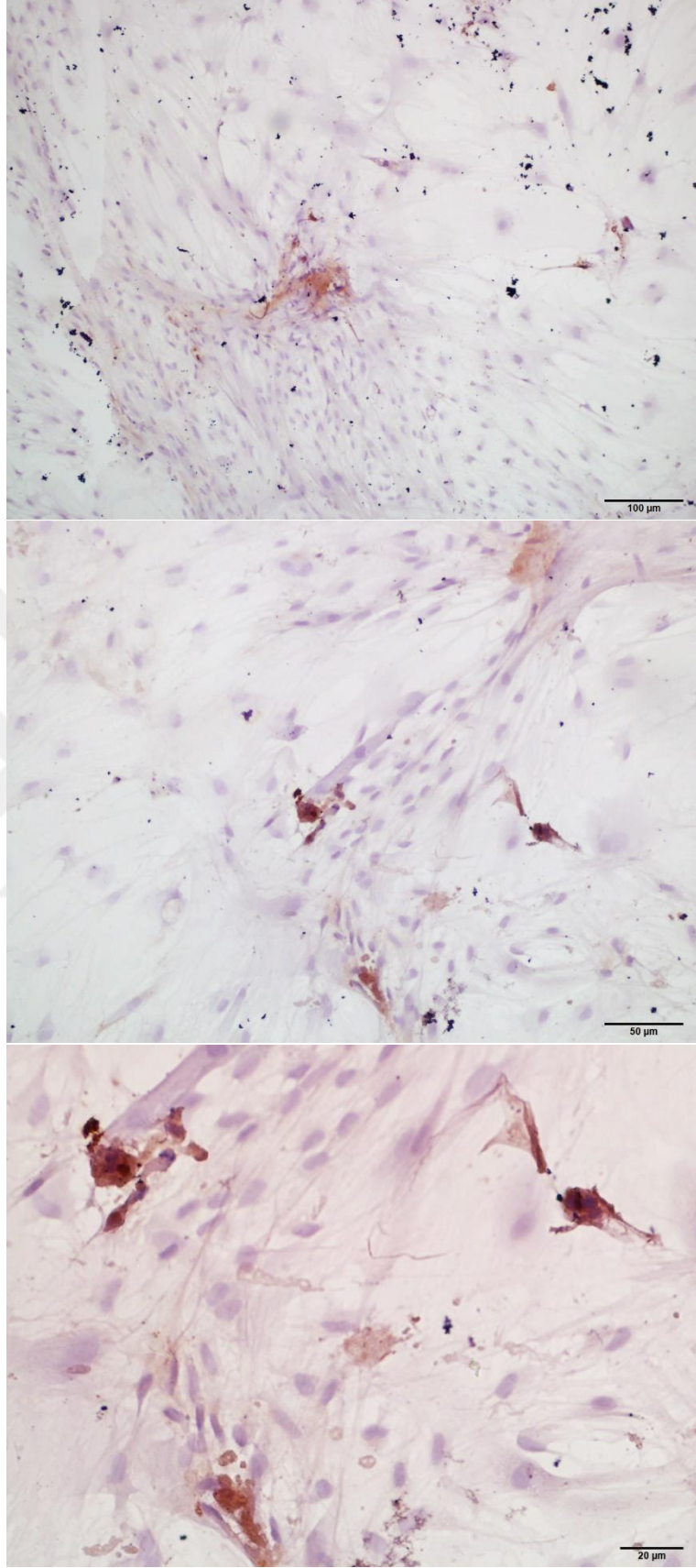
Şekil 4.21: Lam üzerinde 21. günde farklılaşma ortamı olmadan kùltive edilen hücrelerin anti-bone sialoprotein boyamaları (10x, 20x, 40x)



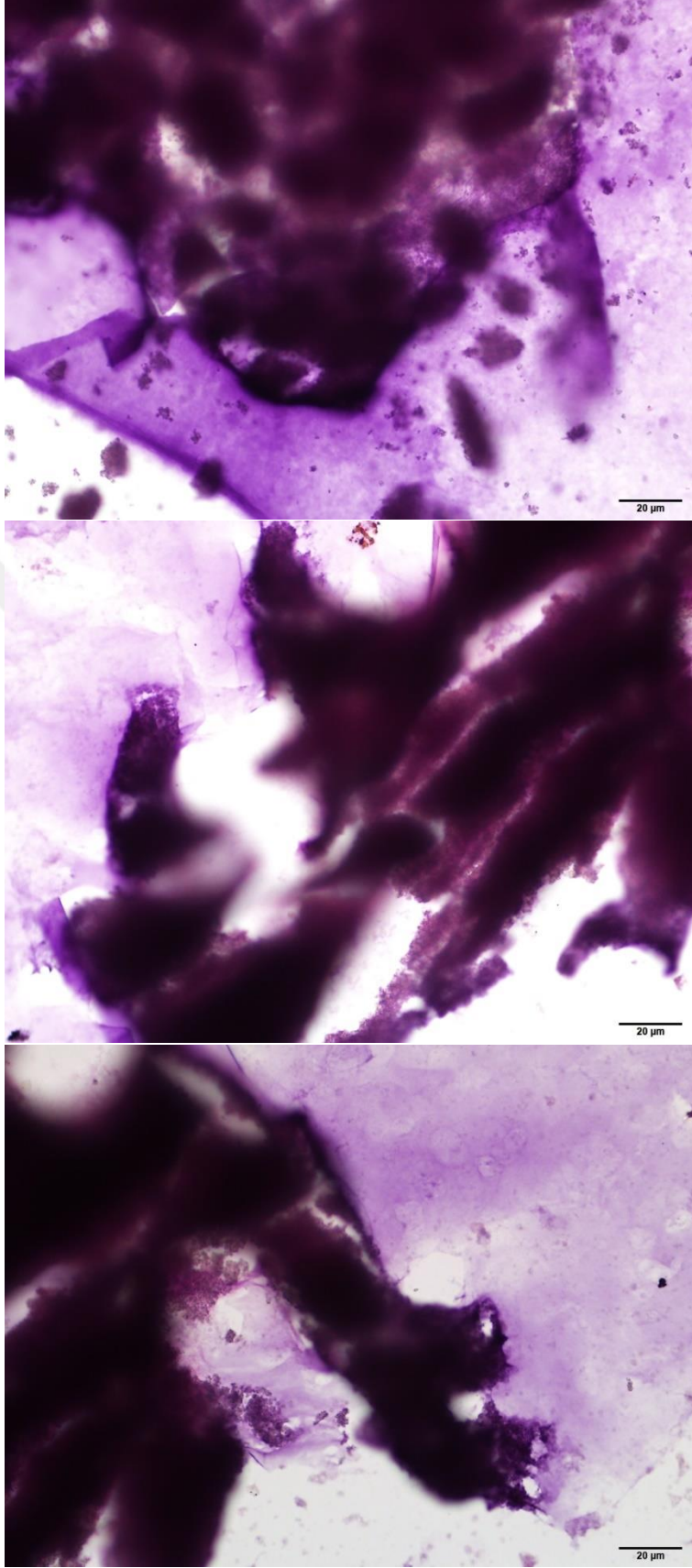
Şekil 4.22: Lam üzerinde 21. günde farklılaşma ortamı ile kültüre edilen hücrelerin anti-bone sialoprotein boyamaları (10x, 20x, 40x)



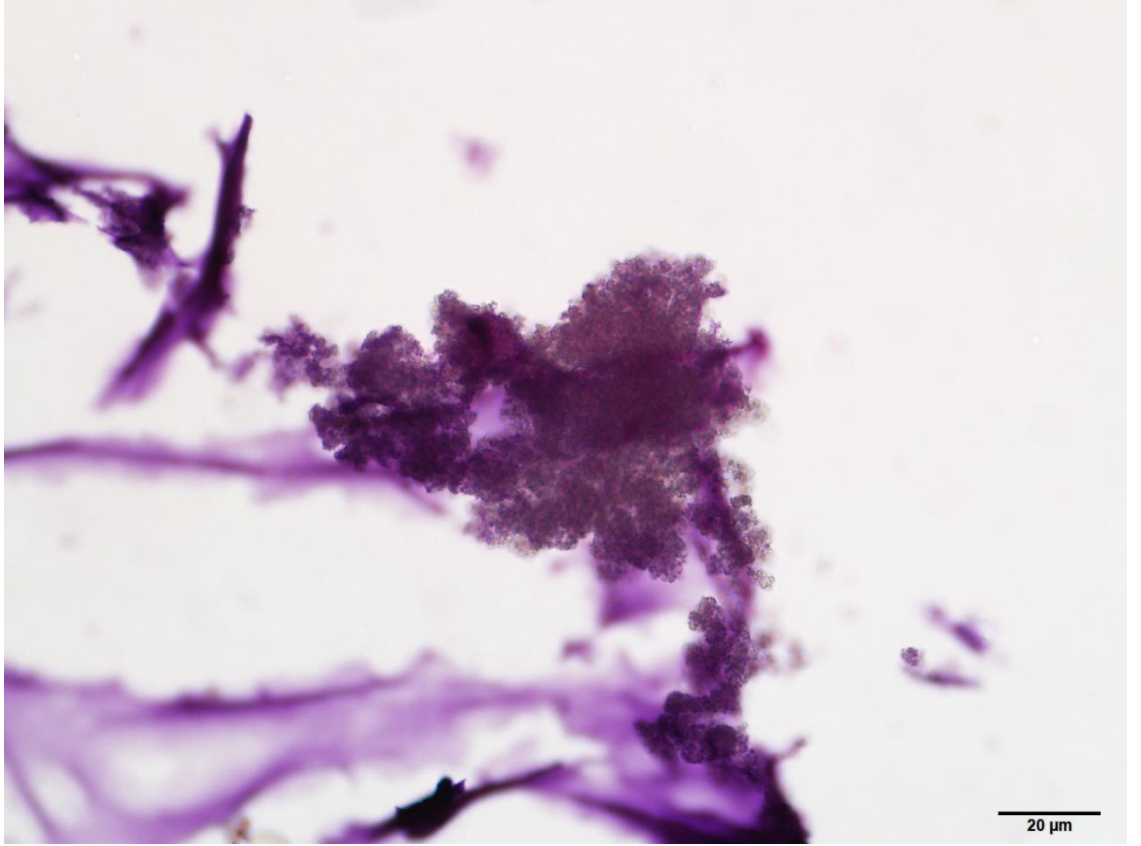
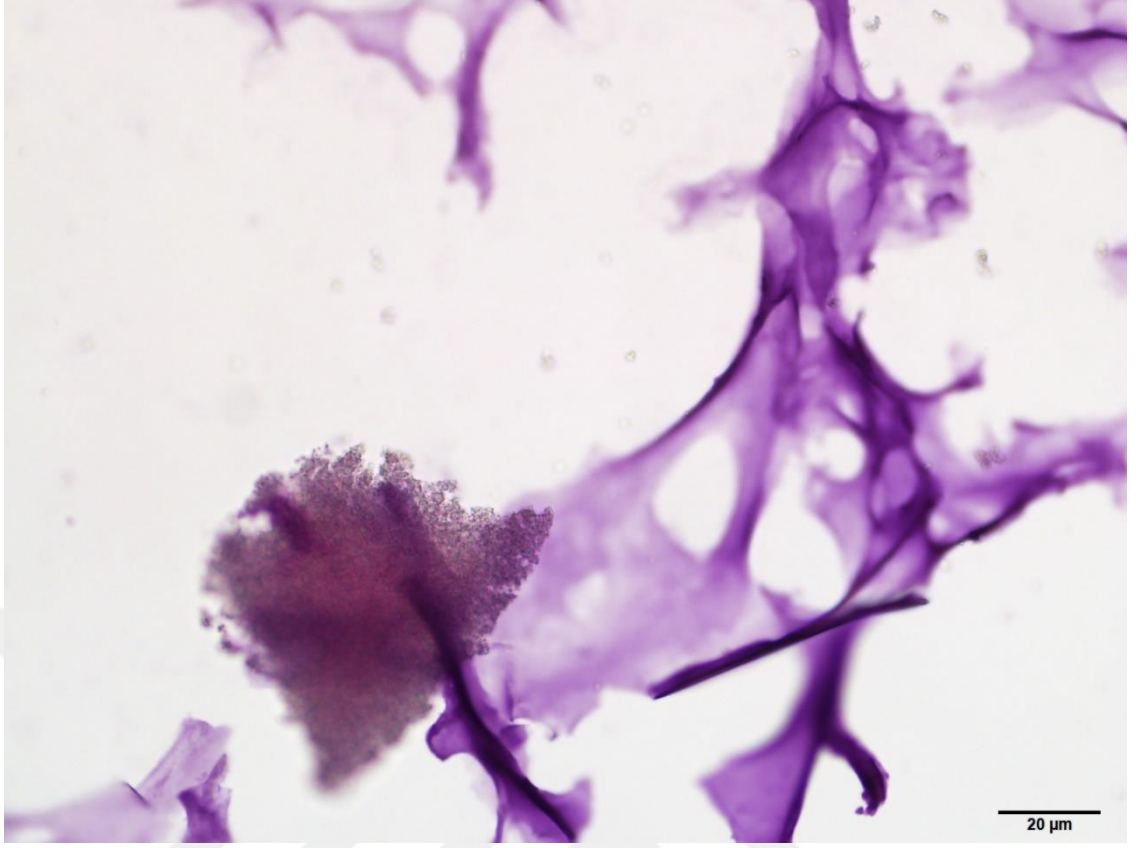
Şekil 4.23: Lam üzerinde 28. günde farklılaşma ortamı olmadan kùltive edilen hücrelerin anti-bone sialoprotein boyamaları (10x, 20x, 40x)



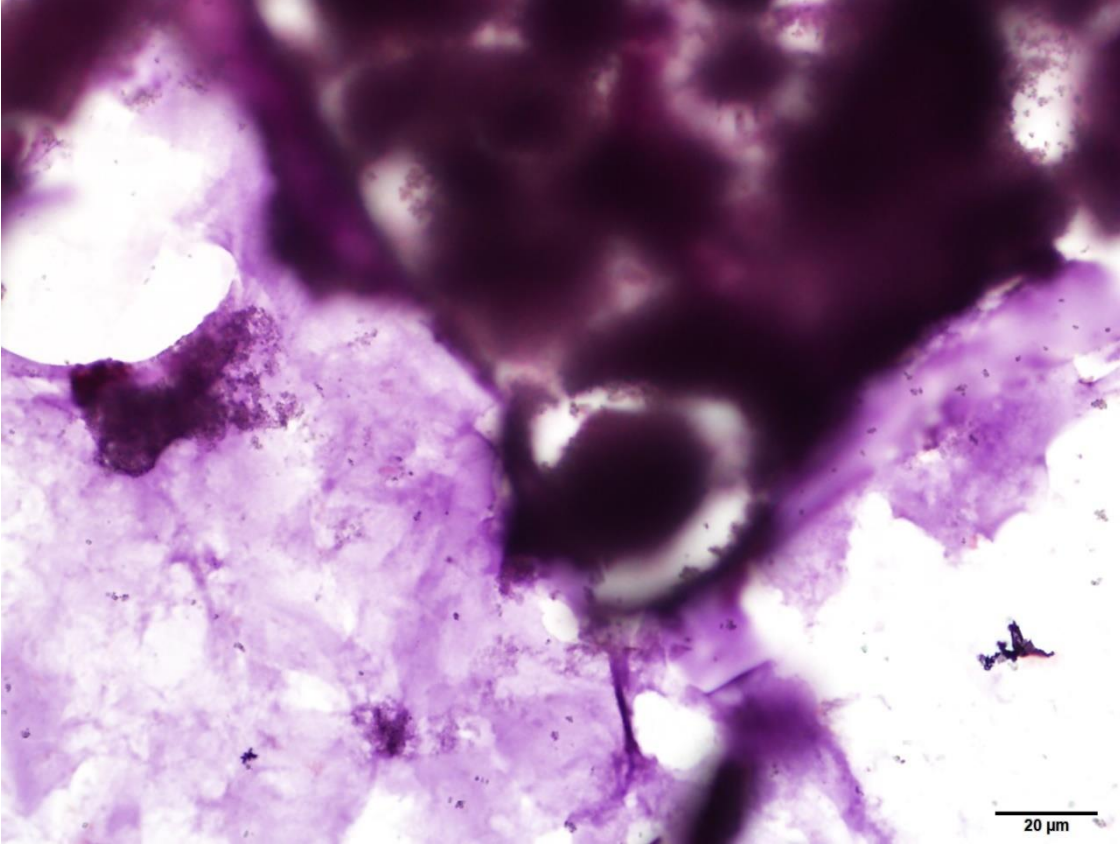
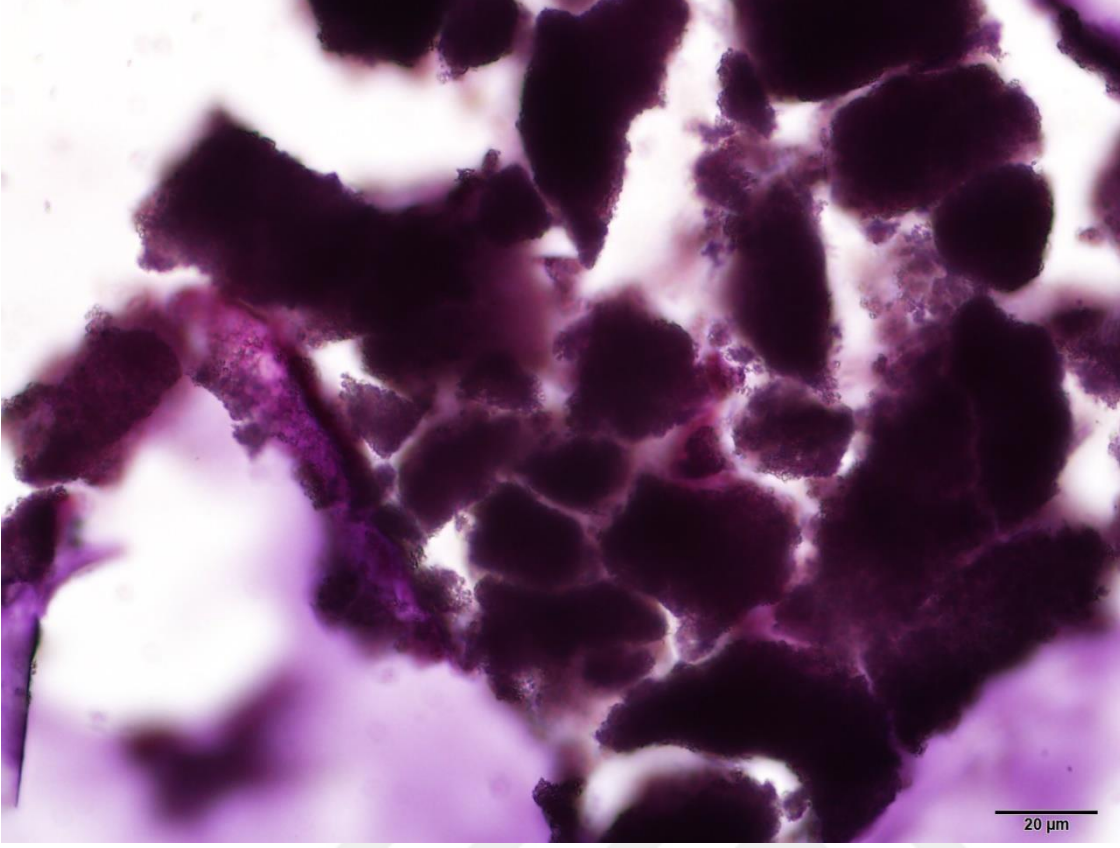
Şekil 4.24: Lam üzerinde 28. günde farklılaşma ortamı ile kültüre edilen hücrelerin anti-bone sialoprotein boyamaları (10x, 20x, 40x)



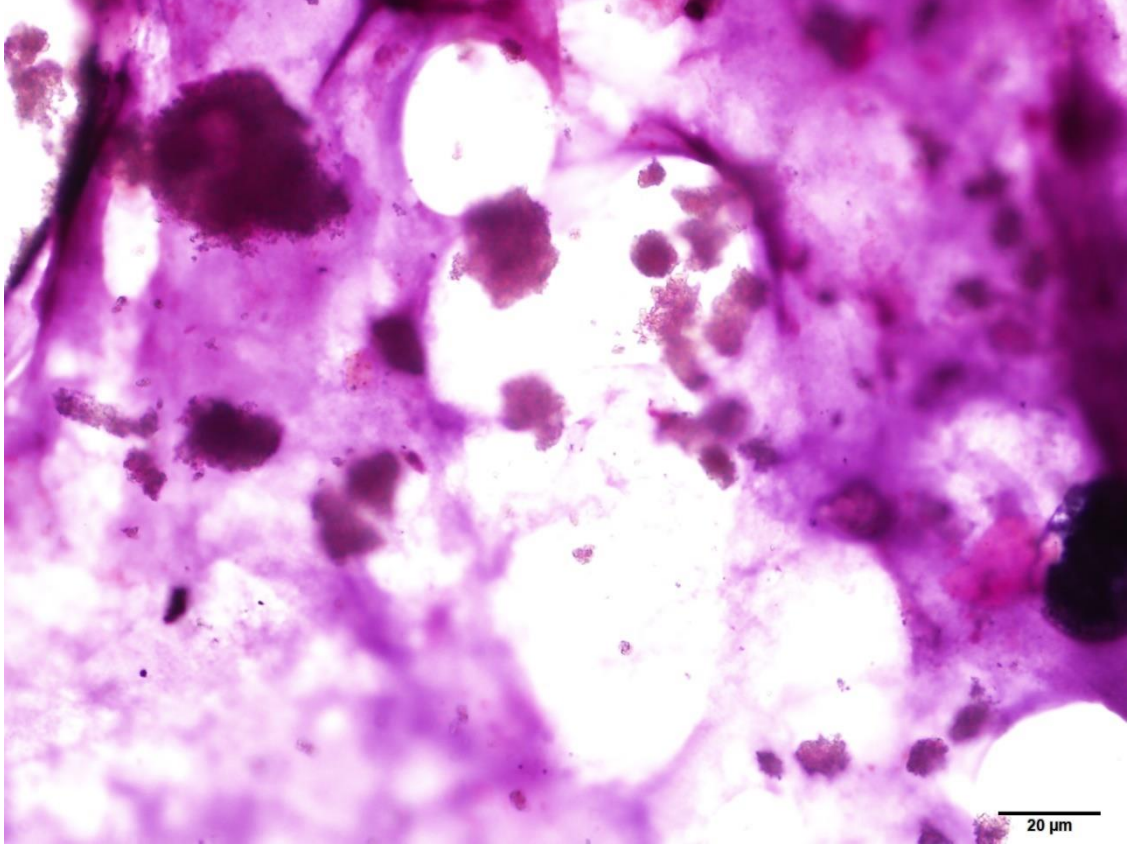
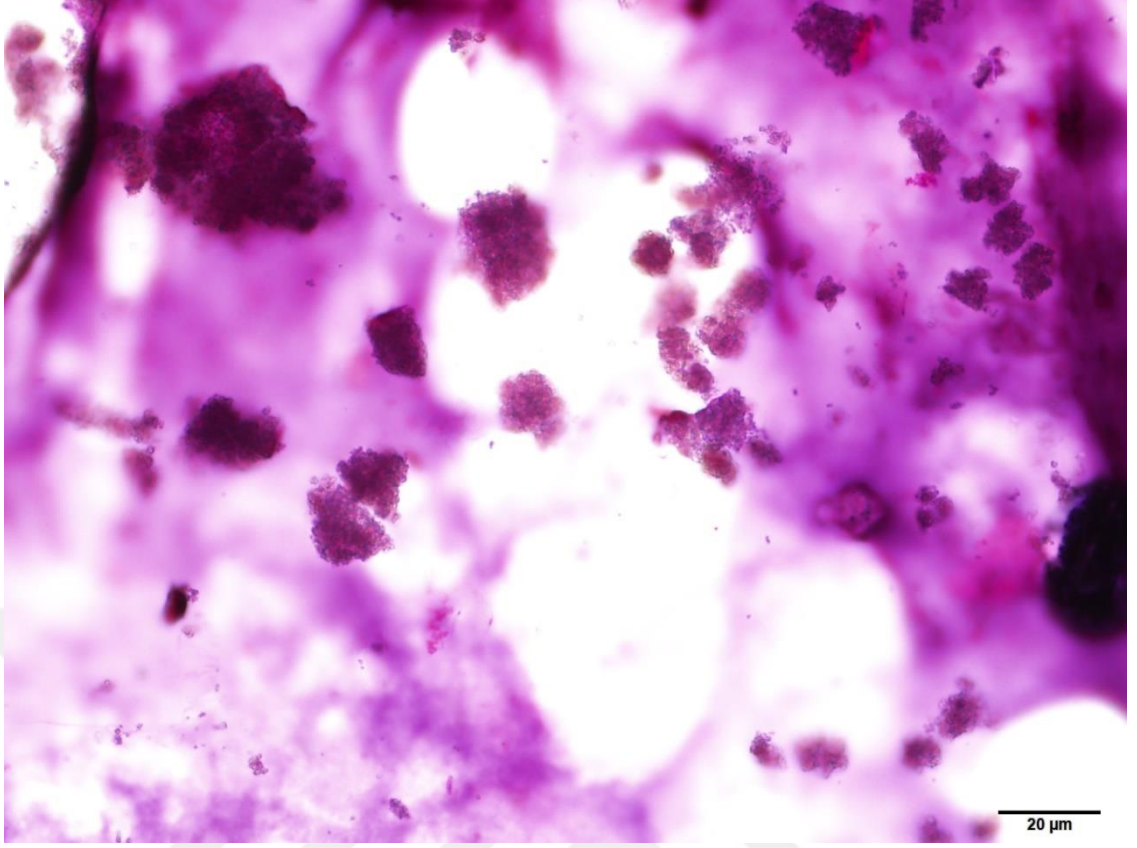
Şekil 4.25: 21. günde farklılaşma ortamı olmadan kültüre edilen greft yapılarında hematoksilen -eozin boyamaları (40x)



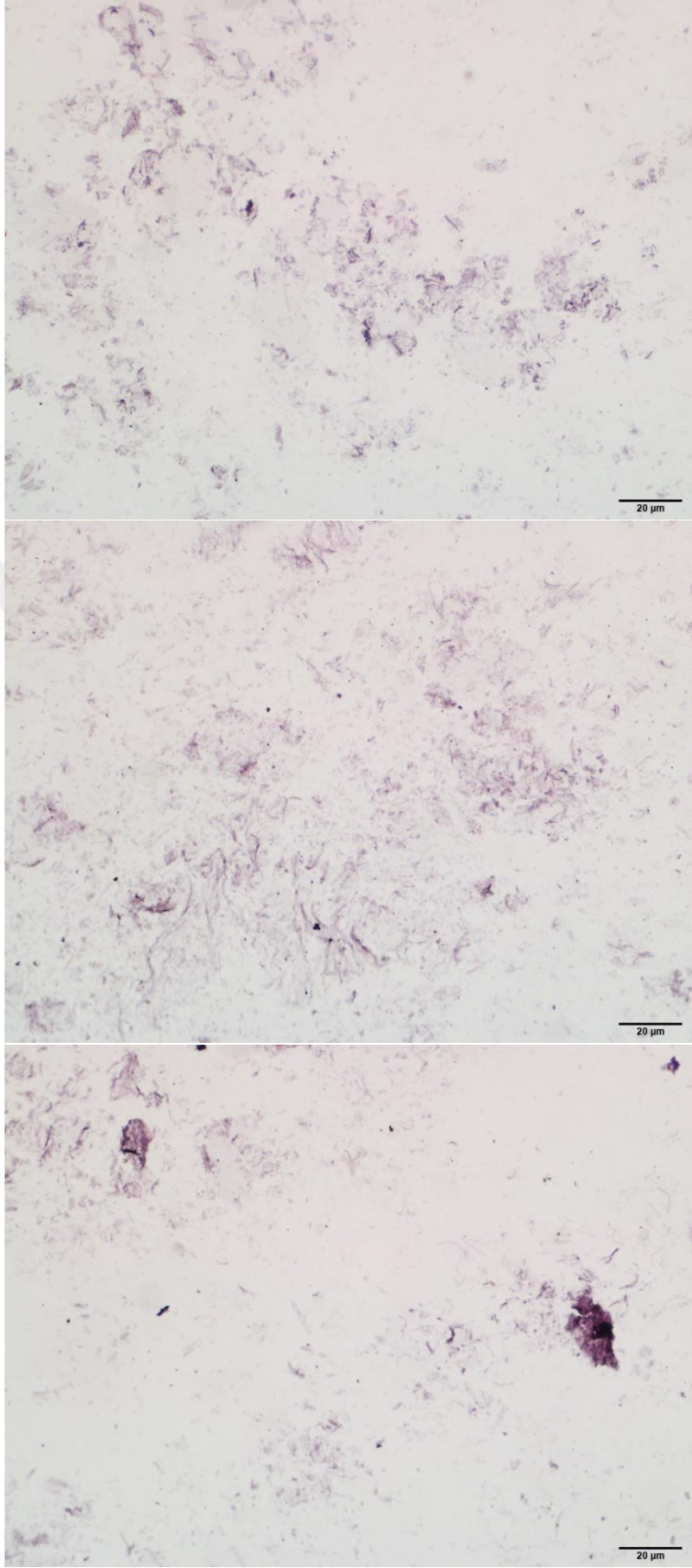
Şekil 4.26: 21. günde farklılaşma ortamı ile kültüre edilen greft yapılarında hematoksilen-eozin boyamaları (40x)



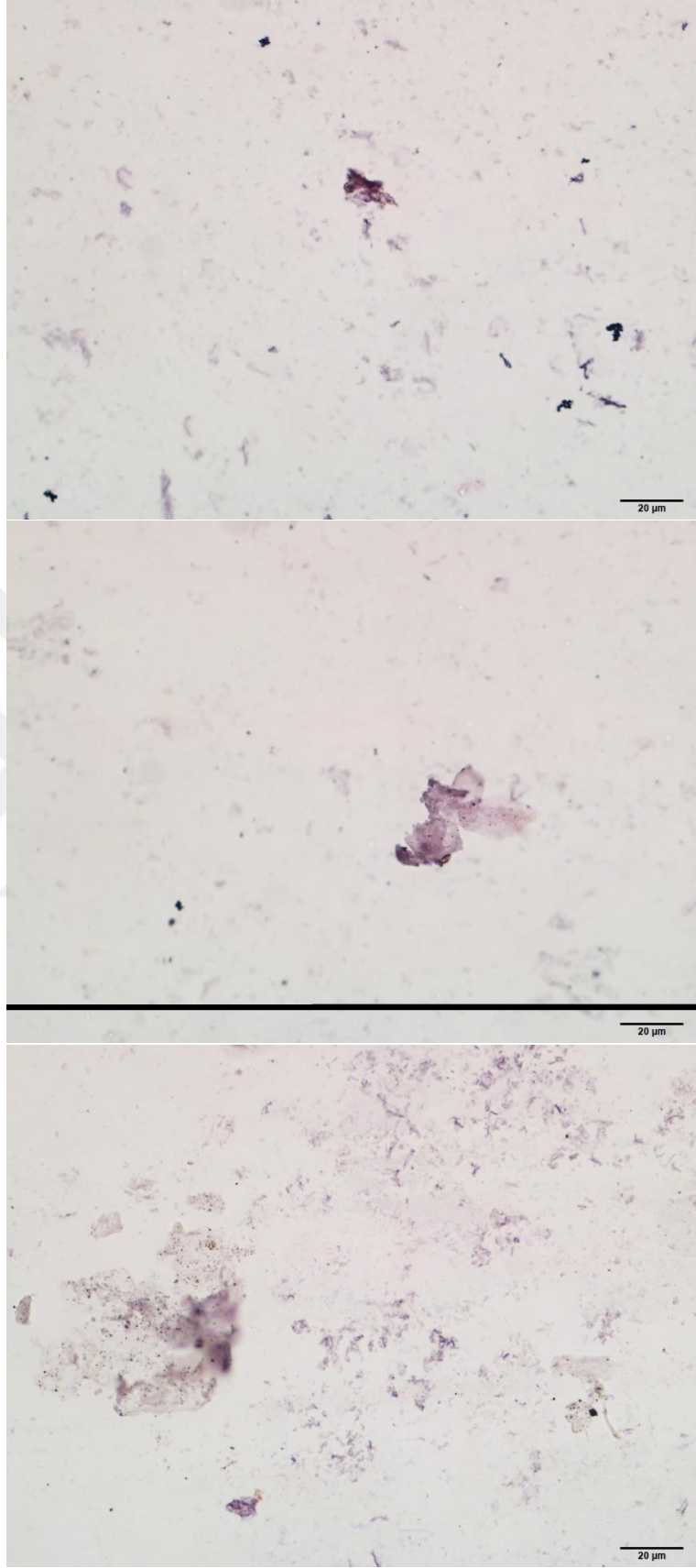
Şekil 4.27: 28. günde farklılaşma ortamı olmadan kültüre edilen greft yapılarında hematoksilen-eozin boyamaları (40x)



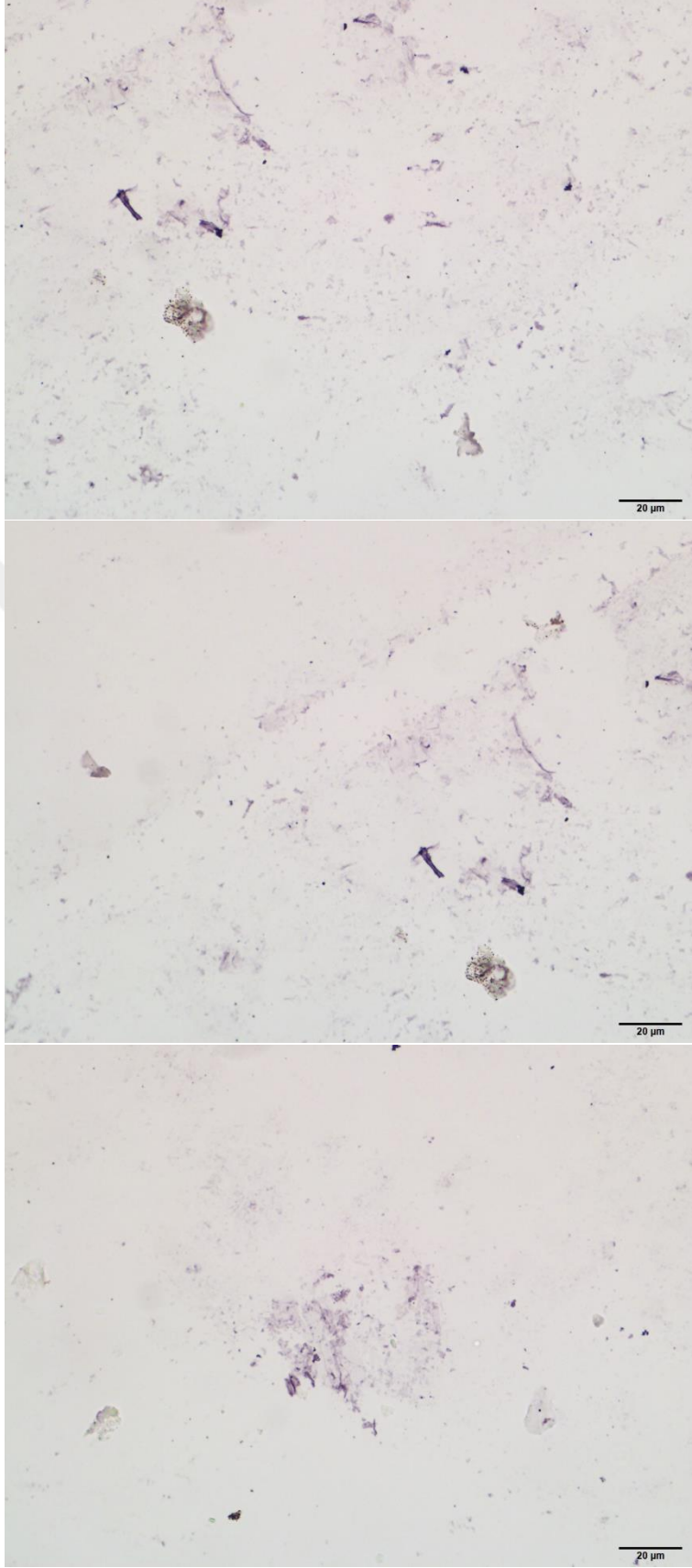
Şekil 4.28: 28. günde farklılaşma ortamı ile kültüre edilen greft yapılarında hematoksilen-eozin boyamaları (40x)



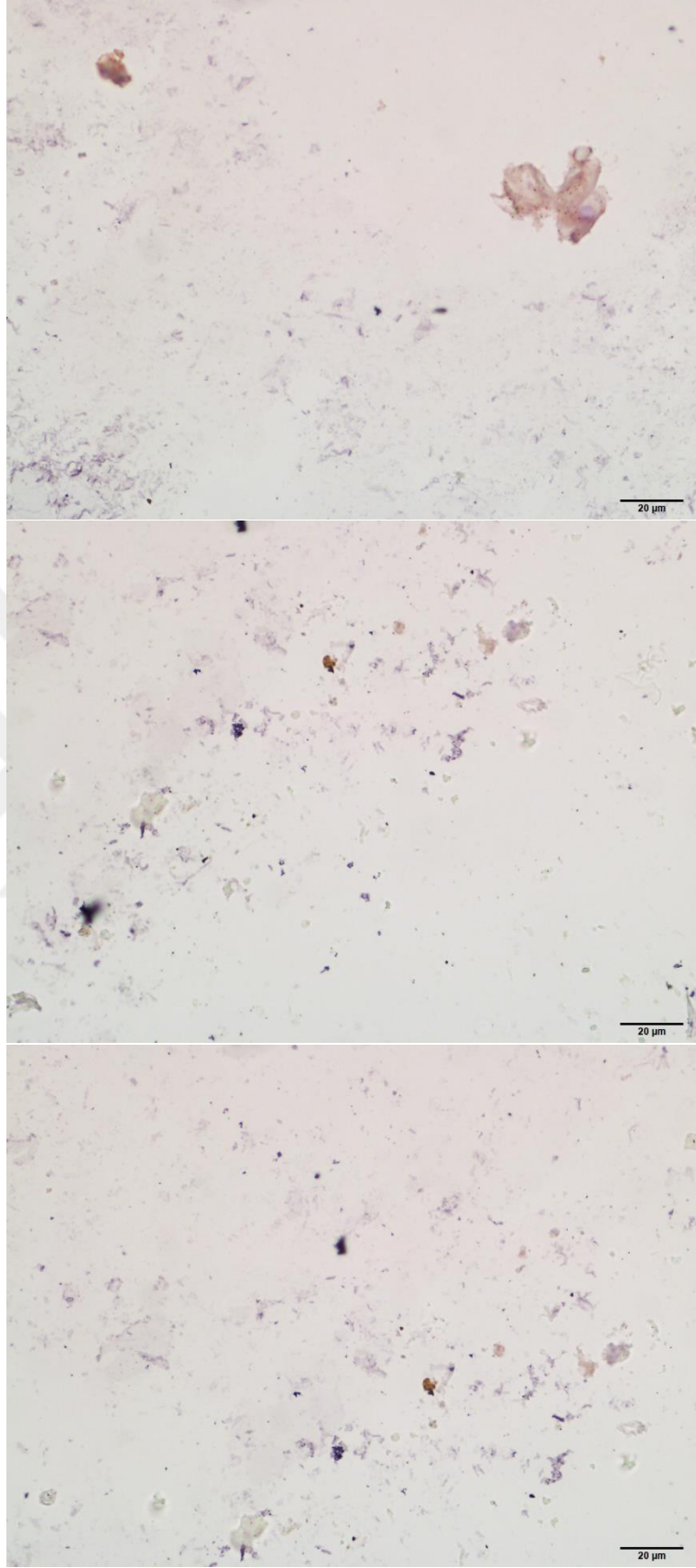
Şekil 4.29: 21. günde farklılaşma ortamı olmadan k lt ve edilen greft yapılarında anti-bone sialoprotein boyamaları (40x)



Şekil 4.30: 21. günde farklılaşma ortamı ile kültüre edilen greft yapılarında anti-bone sialoprotein boyamaları (40x)



Şekil 4.31: 28. günde farklılaşma ortamı olmadan kültüre edilen greft yapılarında anti-bone sialoprotein boyamaları (40x)



Şekil 4.32: 28. günde farklılaşma ortamı ile kültive edilen greft yapılarında anti-bone sialoprotein boyamaları (40x)

Elde edilen görüntülerde lam üzerinde ve greft yapısı içinde kültive edilen hücrelerin hematoksil n-eozin boyama sonucunda, greft yapısında mikro taşıyıcı yüzeyinde ve lam yüzeyinde hücre sitoplazması ve çekirdekleri pembe/mor renklerde belirgin bir şekilde görülmektedir. Farklılaşma ortamı kullanılan kültürlerde yer yer hücre  beklenmeleri ve osteoid benzeri birikimler gözlenirken, farklılaşma ortamı kullanılmamış kültürlerde bu oluşumlara rastlanmamıştır ( ekil 4.17-  ekil 4.20 ve  ekil 4.25-  ekil4.28). Yapılan anti-bone sialoprotein immünohistokimyasal boyamalarında alınan kesitlerde ve lam üzerinde hücreler arasında kahverengi/turuncu renklerde boyanma görülmektedir ayrıca 28. gündeki kahverengi/turuncu rengin 21. gün boyamasından daha belirgin olduğu görülmüştür. Farklıla tırma ortamı kullanılmamış olan kültürlerde BSP boyanması görülmemiştir ( ekil 4.21-  ekil 4.24 ve  ekil 4.29-  ekil 4.32).



5. TARTIŞMA

Geliştirilmekte olan biyomateryallerin, doku rejenerasyonunun *in vivo* mekanizmasını aktive etmek, vücudu kendi kendini iyileştirmeye teşvik etmek ve iskelenin yenilenen doku tarafından değiştirilmesini kolaylaştırmak için biyoaktif ve biyobozunur özellikleri bir arada barındırması hedeflenmektedir (Costa et al., 2007). Apatitik çimentoların kullanımında birçok cerrah, kemiğe implantasyondan sonra mümkün olan en kısa sürede tamamen emilen bir materyal istemektedir.

Kalsiyum fosfat bazlı seramikler (HAp, α -TCP ve β -TCP gibi) ortopedik ve çene cerrahisinde greft olarak sıklıkla kullanılan malzemelerdir. Kemik ekstraselüler matriksinde bulunan minerallere çok benzerler; bu nedenle osteoindüktif ve osteokondüktif olmaları hasarlı kemik dokusunun rejenerasyonunu olumlu yönde etkilemektedir (Rajzer et al., 2010).

β -TCP granüllerinin BMSC'lerin osteojenik farklılaşmasını stimule ettiği fikri Frost tarafından 1991 yılında düşünülmüştür (Frost, 1991). Frostun bu fikrinde haklı olduğu β -TCP'nin BMSC proliferasyonunu, metabolik aktivitesini ve alkalin fosfataz aktivitesini arttırdığı Gao tarafından da kanıtlanmıştır (Gao et al., 2016). Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında geliştirilmek istenen enjekte edilebilir kemik greftinde kullanılan kemik iliği mezenşimal kök hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını hızlandırmak amacıyla hücrelerin tutunduğu mikro taşıyıcıların HAp- β -TCP yapılı olması osteojenik farklılaşmanın greft içerisinde hızlıca gerçekleşmesini sağlamıştır.

Dinamik hücre kültürü çalışmaları sıklıkla yüksek hücre miktarı elde etmek istenen MAb (monoklonal antikor) ve aşı çalışmalarında tercih edilen bir kültür metodudur; buradaki esas amaç 2D hücre kültüründe geçirilen zamanda mümkün olduğunca fazla sayıda hücre elde etmektir (Wu et al, 1998). Bu nedenle çalışmada mikro taşıyıcılar üzerine kemik iliği mezenşimal kök hücreleri oldukça yüksek miktarda üretilmek istemiştir; ancak spinner flask içerisindeki pH ve karıştırma hızının yüksekliğinden meydana gelen kayma gerilimi gibi fiziksel etmenlerin hücreleri strese sokarak 72. saatten sonra ölümlerine neden olduğu düşünülmektedir.

μ -CT ile yapılan porozite ölçümünde çapraz bağlanmış haldeki hidrojinin porozite değeri %1,06 olarak saptanmıştır; ancak hidrojel liyofilize edilerek kurutulduğunda porozitesinin %59 olduğu belirlenmiştir. Aradaki bu farkın hibrid hidrojinin yüksek su tutma kapasitesi olduğu ve ortamdaki sıvıyı kolaylıkla emerek hücrelerin *in vitro* da besi ortamını olabildiğince çok tutarak *in vivo* da kan ve vücut sıvılarının kolaylıkla hücrelere geçişini sağlayarak beslenmelerini kolaylaştıracağı düşünülmektedir.

Hibrid hidrojinin viskozitesi biyobaskı için kullanılan hidrojinlerin viskozite aralığındadır (Khalil et al., 2009; He et al., 2016); bu da enjekte edilebilir forma geldiğinde kemik greftinin içerisindeki hücrelerin canlılıklarını uzun süre devam ettirebileceğini göstermektedir. Yapılan tez çalışması içeriğinde hazırlanan L&D floresan boyama deney seti de hücrelerin *in vitro* şartlarda hidrojel içinde 10. günde de canlılıklarını koruduğunu göstererek hidrojel viskozitesinin ve porozitesinin hücre canlılığına olumsuz bir etkisinin olmadığına dair delil oluşturmaktadır.

Yapılan çalışma sırasında mikro taşıyıcılar ile hücrelerin bir araya getirilmesi aşamasında kontaminasyonun önüne geçmek adına spinner flaskın her boynu kapatılmıştır; bu da kültür ortamında gaz alışverişinin yeterli düzeyde olmasının önüne geçmiştir. Bu durumun da hücrelerin 72. saate ölmeye başlamasının bir diğer etkeni olduğu düşünülebilir.

Kemik dokusu oldukça damarlı bir dokudur; bunun yanında kıkırdak doku ise damar bulunmayan bir dokudur; bu da iki doku arasında oksijen ihtiyacı yönünden fark olduğunu göstermektedir. Hipoksik şartların mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasına etkisi olduğu görülmüştür (Shang et al., 2014). Bu çalışma sırasında kontaminasyonu engellemek adına spinner flaskın boyunlarının kapatılmış olmasının O₂ ve CO₂ gaz transferinin önüne geçerek ortamın hipoksik olmasına neden olabileceği, bu nedenle spinnerden çıkarılan hücrelerin kondrojenik farklılaşma yönünden de incelenmesi gerekmektedir.

Elde edilen greft yapısı farklılaşma yönünden yalnızca anti-bone sialoprotein boyama ile incelenebilmiştir. Bone sialoprotein erken dönemde kemikleşmenin göstergelerinden biri olup “Küçük integrin bağlayıcı ligand, N-bağlı glikoprotein (SBLING)” ailesine mensuptur, kollajenöz olmayan kemik proteinlerinin %12’sini oluşturmaktadır, kemik dokudaki görevi ise ekstraselüler matrikste bulunan kalsiyum fosfat yapılarının matriksin ana bileşeni olan tip-I kollajen ve hücre yüzeyine bağlanmasını sağlamaktır (Cole, 2003). Tez çalışması kapsamında yapılan anti-bone sialoprotein immüno-histokimyasal boyaması ile 21. günden önce sentezlenmeye başladığı ve 28. günde de 21. güne nazaran daha fazla sentezlendiği gösterilmiştir. İleri dönemde ise yani kalsiyum ve fosfat iyonlarından oluşturulan minerallerin hidroksiapatite dönüşerek kemik mineralizasyonu esnasında asıl görev alan protein osteokalsindir. Bu nedenle greft içinde farklı dönemlerde kemikleşmenin belirteci olan osteonektin, osteokalsin ve osteopontin proteinlerinin de incelenmesi, ayrıca alkalen fosfataz aktivitesinin de incelenmesi daha doğru bir değerlendirme sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada elde edilen greft yapısı, ortopedik uygulamalarda kullanım potansiyeline sahiptir. İmplantların sabitlenmesi için kullanılan mevcut kemik çimentolarının çevre dokularda oluşturduğu tahribatı yaratmayarak hastaların daha hızlı iyileşmesini sağlayacak, kişinin kendi kök hücreleri kullanıldığı için kişiye özel tedavi sağlayarak vücudun oluşturduğu “Yabancı cisim reaksiyonu (Foreign body reaction)” nu engelleyebilecek, potansiyele sahiptir.

Yapılan tez çalışmasında ticari olarak satın alınan %60 HAp/%40 β -TCP yapılı 0,3-04 mm boyutlarındaki kemik greftleri spinner flask içerisinde mikro taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Kullanılan mikro taşıyıcının yoğunluğu spinner flask kültüründe kullanılan standart mikro taşıyıcıların yoğunluğundan oldukça fazladır (Nilsson, 1988); bu nedenle literatürde belirtilen 40-80 rpm’ lik karışma hızlarında (Perez et al., 2014) kullanılan mikro taşıyıcılar askıda kalmak yerine spinner flask tabanına çökmüşlerdir; optimizasyon çalışmaları sonucunda ideal karıştırma hızı 100 rpm olarak belirlenmiştir.

Yapılan hücre canlılığı analizinde 36. saatten 72. saate hücre canlılığında anlamlı bir artış görülmektedir; ancak 72. saatten sonra hücre canlılığı MC’ lerden ve spinner flask içerisinde bulunan besi ortamından alınan örneklerde azalmıştır; bu da karıştırma hızının yüksek olduğu ve hücrelerin kayma gerilimine maruz kalarak öldüğünü düşündürmektedir. Bunun önüne geçmek adına kullanılan mikro taşıyıcıların yoğunluğu azaltılarak besi ortamı içerisinde daha düşük karıştırma hızlarında askıda kalması sağlanabilir.

Spinner flask kültüründe dikkat edilmesi gereken bir diğer husus da ortam pH’ sın kontrolüdür. Örnek alımları sırasında besi ortamının pH’ sı da kontrol edilmiş ve pH değerinin 8,2 olduğu görülmüştür. Literatür incelendiğinde mikro taşıyıcının yapısında bulunan β -TCP yapılı greftlerin diğer kalsiyum fosfat yapılı materyallere göre bulunduğu ortama daha fazla Ca^{+2} ve $(\text{PO}_4)^{-3}$ iyonları salımı yaparak osseointegrasyon ve osteoindüksiyonu artırdığı görülmüştür (Frost, 1991). Ortama salınan Ca^{+2} iyonlarının ortamın pH’ sın artmasına etken olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle benzeri mikro taşıyıcı yapılmak istenirse β -TCP oranı olabildiğince az olması, ya da spinner flask kültürasyonunun 72 saatten fazla olmaması önerilmektedir. Bir alternatif de besiyeri pH’ sının stabil tutulması için farklı iyonik eklentilerle tamponlanması denenebilir.

Hipoksik ortamın kondrojenik farklılaşmaya etkisi olduğu düşünülmektedir; bu nedenle spinner flask içerisinde yapılan dinamik hücre kültürü çalışmasının CO_2 ’ li inkübatörde, filtreli spinner flask ile yapılması elzemdir.

In vitro olarak değerlendirilen greft yapısının *in vivo* deneyler ve klinik araştırma yapılarak da incelenmesi ve potansiyelin değerlendirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alford, A. I., Kozloff, K. M., & Hankenson, K. D.** (2015). Extracellular matrix networks in bone remodeling. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 65, 20-31.
- Baghaei, K., Hashemi, S. M., Tokhanbigli, S., Rad, A. A., Assadzadeh-Aghdaei, H., Sharifian, A., & Zali, M. R.** (2017). Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 10(3), 208.
- Baino F, Novajra G, Vitale-Brovarone C.** (2015). Bioceramics and scaffolds: a winning combination for tissue engineering. *Front Bioeng Biotechnol* 2015; 3: 202.
- Bauer, T. W., Muschler, G. F.** (2000). Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 371, 10-27.
- Betz RR.** (2002). Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. *Orthopedics*, 25(5), S561-S570.
- Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A.,** (2002) *Principles of Bone Biology* (2nd ed.), Academic Press, San Diego, CA
- Black, C.R.M., Goriainov, V., Gibbs, D. et al.** (2015). Bone Tissue Engineering. *Curr Mol Bio Rep* 1, 132–140
- Blank, M., & Sims, N. A.** (2019). Cellular processes by which osteoblasts and osteocytes control bone mineral deposition and maturation revealed by stage-specific ephrinb2 knockdown. *Current osteoporosis reports*, 17(5), 270-280.
- Castell, J. V., & Gmez-Lechn, M. J. (Eds.).** (1996). *In vitro methods in pharmaceutical research*. Elsevier.
- Ceccarelli, J., & Putnam, A. J.** (2014). Sculpting the blank slate: how fibrin's support of vascularization can inspire biomaterial design. *Acta biomaterialia*, 10(4), 1515-1523.
- Chung, E., Rytlewski, J. A., Merchant, A. G., Dhada, K. S., Lewis, E. W., & Suggs, L. J.** (2015). Fibrin-based 3D matrices induce angiogenic behavior of adipose-derived stem cells. *Acta biomaterialia*, 17, 78-88.
- COLE, W. G.** (2003). Structure of growth plate and bone matrix. In *Pediatric Bone* (pp. 1-41). Academic Press.
- Costa, V. C., Costa, H. S., Vasconcelos, W. L., Pereira, M. D. M., Oréfice, R. L., & Mansur, H. S.** (2007). Preparation of hybrid biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Research*, 10(1), 21-26.
- Farley JR, Hall SL, Tanner MA, Wergedal JE.** Specific activity of skeletal alkaline phosphatase in human osteoblast-line cells regulated by phosphate, phosphate esters, and phosphate analogs and release of alkaline phosphatase activity inversely regulated by calcium. *J Bone Miner Res* 1994;9(4):497–508.
- Florencio-Silva R., Sasso G. R., Sasso-Cerri E., Simões M. J., Cerri P. S.,** Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 421746.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Friedenstein, A. J.** (1976). Precursor cells of mechanocytes. *International review of cytology*, 47, 327-359.
- Frost, H. M.** (1991). A new direction for osteoporosis research: a review and proposal. *Bone*, 12(6), 429-437.
- Gaetani R., Doevendans P.A., Metz C.H., Alblas J., Messina E., Giacomello A., Sluijter J.P.,** Cardiac tissue engineering using tissue printing technology and human cardiac progenitor cells. *Biomaterials* 2012, 33, 1782–1790.
- Gao, P., Zhang, H., Liu, Y., Fan, B., Li, X., Xiao, X., ... & Wang, Z.** (2016). Beta-tricalcium phosphate granules improve osteogenesis in vitro and establish innovative osteo-regenerators for bone tissue engineering in vivo. *Scientific reports*, 6(1), 1-14.
- Garrett, Q., Simmons, P. A., Xu, S., Vehige, J., Zhao, Z., Ehrmann, K., & Willcox, M.** (2007). Carboxymethylcellulose binds to human corneal epithelial cells and is a modulator of corneal epithelial wound healing. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(4), 1559-1567.
- Gasparotto, V. P., Landim-Alvarenga, F. C., Oliveira, A. L., Simões, G. F., Lima-Neto, J. F., Barraviera, B., & Ferreira, R. S.** (2014). A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*, 5(3), 1-10.
- Goshima, J., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I.** (1991). The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clinical orthopaedics and related research*, (262), 298-311.
- Ghayor, C., Chen, T. H., Bhattacharya, I., Özcan, M., & Weber, F. E.** (2020). Microporosities in 3D-Printed Tricalcium-Phosphate-Based Bone Substitutes Enhance Osteoconduction and Affect Osteoclastic Resorption. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9270.
- Habib, A., Sathish, V., Mallik, S., & Khoda, B.** (2018). 3D printability of alginate-carboxymethyl cellulose hydrogel. *Materials*, 11(3), 454.
- He, Y., Yang, F., Zhao, H., Gao, Q., Xia, B., & Fu, J.** (2016). Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- Hench, L. L., & Polak, J. M.** (2002). Third-generation biomedical materials. *Science*, 295(5557), 1014-1017.
- Hudecki, A., Kiryczyński, G., & Łos, M. J.** (2019). Biomaterials, definition, overview. In *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine* (pp. 85-98). Academic Press.
- Hollinger, J.O. and Battistone, G.C.** (1986). Biodegradable bone repair materials. *Clin. Orthop.* 207, 290.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lin, H. R., & Yeh, Y. J.** (2004). Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 71(1), 52-65.
- Ibrahim, A., Bulstrode, N. W., Whitaker, I. S., Eastwood, D. M., Dunaway, D., & Ferretti, P.** (2016). Suppl-3, M5: nanotechnology for stimulating osteoprogenitor differentiation. *The open orthopaedics journal*, 10, 849.
- Ibrahim, A.** (2018). 3D bioprinting bone. In *3D Bioprinting for Reconstructive Surgery* (pp. 245-275). Woodhead Publishing.
- Karsdal, M. A., Larsen, L., Engsig, M. T., Lou, H., Ferreras, M., Lochter, A., Foged, N. T.** (2002). Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor- β controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 44061-44067.
- Khalil, S., & Sun, W.** (2009). Bioprinting endothelial cells with alginate for 3D tissue constructs. *Journal of biomechanical engineering*, 131(11).
- Khosla, S., Westendorf, J. J., & Oursler, M. J.** (2008). Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), 421-428.
- Kretlow, J. D., & Mikos, A. G.** (2007). Mineralization of synthetic polymer scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue engineering*, 13(5), 927-938.
- Lalwani, G., D'Agati, M., Farshid, B., & Sitharaman, B.** (2016). Carbon and inorganic nanomaterial-reinforced polymeric nanocomposites for bone tissue engineering. *Nanocomposites for Musculoskeletal Tissue Regeneration*, 31-66.
- Lee, S. K., Goldring, S. R., & Lorenzo, J. A.** (1995). Expression of the calcitonin receptor in bone marrow cell cultures and in bone: a specific marker of the differentiated osteoclast that is regulated by calcitonin. *Endocrinology*, 136(10), 4572-4581.
- Lee, Y. S., & Chuong, C. M.** (1992). Adhesion molecules in skeletogenesis: I. Transient expression of neural cell adhesion molecules (NCAM) in osteoblasts during endochondral and intramembranous ossification. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7(12), 1435-1446.
- LeGeros, R. Z.** (2008). Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chemical reviews*, 108(11), 4742-4753.
- Liu, C. Z., & Czernuszka, J. T.** (2007). Development of biodegradable scaffolds for tissue engineering: a perspective on emerging technology. *Materials science and technology*, 23(4), 379-391.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, H., Xue, K., Kong, N., Liu, K., & Chang, J.** (2014). Silicate bioceramics enhanced vascularization and osteogenesis through stimulating interactions between endothelial cells and bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 35(12), 3803-3818.
- Liu, Y., Luo, D., & Wang, T.** (2016). Hierarchical structures of bone and bioinspired bone tissue engineering. *Small*, 12(34), 4611-4632.
- Lohse, N., Schulz, J., & Schliephake, H.** (2012). Effect of fibrin on osteogenic differentiation and VEGF expression of bone marrow stromal cells in mineralised scaffolds: a three-dimensional analysis. *European Cells and Materials*, 23, 413-424.
- Lu, Z., Roohani-Esfahani, S. I., Wang, G., & Zreiqat, H.** (2012). Bone biomimetic microenvironment induces osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(4), 507-515.
- Machado, E. G., Issa, J. P. M., de Figueiredo, F. A. T., Dos Santos, G. R., Galdeano, E. A., Alves, M. C., da Cunha, M. R.** (2015). A new heterologous fibrin sealant as scaffold to recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and natural latex proteins for the repair of tibial bone defects. *Acta histochemica*, 117(3), 288-296.
- Mamalis, A. A., & Cochran, D. L.** (2011). The therapeutic potential of oxygen tension manipulation via hypoxia inducible factors and mimicking agents in guided bone regeneration. A review. *Archives of oral biology*, 56(12), 1466-1475.
- Miller, S. C., de Saint-Georges, L., Bowman, B. M., & Jee, W. S.** (1989). Bone lining cells: structure and function. *Scanning microscopy*, 3(3), 27.
- Miron, R. J., & Zhang, Y. F.** (2012). Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *Journal of dental research*, 91(8), 736-744.
- Minardi, S., Corradetti, B., Taraballi, F., Sandri, M., Van Eps, J., Cabrera, F. J., Tasciotti, E.** (2015). Evaluation of the osteoinductive potential of a bio-inspired scaffold mimicking the osteogenic niche for bone augmentation. *Biomaterials*, 62, 128-137.
- Nilsson, K.** (1988). Microcarrier cell culture. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 6(1), 404-439.
- Nii, M., Lai, J. H., Keeney, M., Han, L. H., Behn, A., Imanbayev, G., & Yang, F.** (2013). The effects of interactive mechanical and biochemical niche signaling on osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells using combinatorial hydrogels. *Acta biomaterialia*, 9(3), 5475-5483.
- Ohgushi, H., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I.** (1989). Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 7(4), 568-578.
- Parikh, S. N.** (2002). Bone graft substitutes: past, present, future. *Journal of postgraduate medicine*, 48(2), 142.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Perez, R. A., Riccardi, K., Altankov, G., & Ginebra, M. P.** (2014). Dynamic cell culture on calcium phosphate microcarriers for bone tissue engineering applications. *Journal of tissue engineering*, 5, 2041731414543965.
- Puleo, D. A., & Nanci, A.** (1999). Understanding and controlling the bone–implant interface. *Biomaterials*, 20(23-24), 2311-2321.
- Rajzer, I., Castano, O., Engel, E., & Planell, J. A.** (2010). Injectable and fast resorbable calcium phosphate cement for body-setting bone grafts. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(7), 2049-2056.
- Rao, R. R., & Stegemann, J. P.** (2013). Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue. *Cytotherapy*, 15(11), 1309-1322.
- Ripamonti, U.** (1996). Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials*, 17(1), 31-35.
- Roohani-Esfahani, S. I., No, Y. J., Lu, Z., Ng, P. Y., Chen, Y., Shi, J., Zreiqat, H.** (2016). A bioceramic with enhanced osteogenic properties to regulate the function of osteoblastic and osteoclastic cells for bone tissue regeneration. *Biomedical Materials*, 11(3), 035018.
- Rossi, F., Santoro, M., & Perale, G.** (2015). Polymeric scaffolds as stem cell carriers in bone repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(10), 1093-1119.
- Shang, J., Liu, H., Li, J., & Zhou, Y.** (2014). Roles of hypoxia during the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Current stem cell research & therapy*, 9(2), 141-147.
- Stegen, S., van Gastel, N., & Carmeliet, G.** (2015). Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone*, 70, 19-27.
- Stein, G. S., & Lian, J. B.** (1993). Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine reviews*, 14(4), 424-442.
- Stevens, M. M.** (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials today*, 11(5), 18-25.
- Swetha, M., Sahithi, K., Moorthi, A., Srinivasan, N., Ramasamy, K., & Selvamurugan, N.** (2010). Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 47(1), 1-4.
- Tanrıkulu, S., & Gönen, E.** (2017). Kırık iyileşmesi. *TOTBID Dergisi*, 16(6).
- Terheyden, H., Knak, C., Jepsen, S., Palmie, S., & Rueger, D. R.** (2001). Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 30(5), 373-379.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Terheyden, H., Warnke, P., Dunsche, A., Jepsen, S., Brenner, W., Palmie, S., & Rueger, D. R.** (2001). Mandibular reconstruction with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part II: transplantation. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 30(6), 469-478.
- Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD.** The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int* 2006;17(3):319–36.
- Wang L., Xu M.-E., Luo L., Zhou Y., Si P.,** Iterative feedback bio-printing-derived cell-laden hydrogel scaffolds with optimal geometrical fidelity and cellular controllability. *Sci. Rep.* 2018, 8, 2802.
- Weisgerber DW, Caliarì SR, Harley BA.** Mineralized collagen scaffolds induce hMSC osteogenesis and matrix remodeling. *Biomater Sci* 2015;3(3):533–42.
- Weber, F. E.** "Reconsidering osteoconduction in the era of additive manufacturing." *Tissue Engineering Part B: Reviews* 25.5 (2019): 375-386.
- Wu, S. C., Hsieh, W. C., & Liao, M. Y.** (1998). Comparisons of microcarrier cell culture processes in one hundred mini-liter spinner flask and fifteen-liter bioreactor cultures. *Bioprocess Engineering*, 19(6), 431-434.
- Zimmermann G, Moghaddam A.** Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury* 2011;42: S16–21

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tezim süresince, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan danışmanım 5 yıldır laboratuvarında çalıştığım sayın Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR'e, bana güvenen, hiçbir zaman yardımını ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL'e ve çalışma ekibine, fikren ve manen her zaman yanımda olan, Yük. Biyomühendis Umut Doğu SEÇKİN'e ve Yük. Biyomühendis Ecem SAYGILI' ya, Yük. Biyomühendis Ilgın KIMIZ GEBOLOĞLU' ya, Biyomalzemeler ve 3 Boyutlu Biyoarafazlar Araştırma Grubu, (EBioPhase) laboratuvarı ekip arkadaşlarım; Biyomühendis Dilara Lâl LAL, Pelin ÇORUK İLHAN' a, çalışmamda kullandığım hücreleri izole eden Yük. Biyomüh Zehra Gül MORÇİMEN ve kıymetli arkadaşım Yüksek Biyomühendis Yonca ERDAL'a analiz süreçlerimde bana yardımcı olan Araş. Gör. Dr. Ece BAYIR ve Araş. Gör. Dr. Raif İLKTAÇ' a ve laboratuvar imkanlarından yararlandığım Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Medikal Biyoteknoloji Laboratuvarı sorumlusu sayın Prof. Dr. E.Esin TUNA' ya Biyomimetik Mikrosistemler Laboratuvarı sorumlusu sayın Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ' a, Hayvan Hücre Mühendisliği ve Biyoproses Laboratuvarı sorumlusu sayın Doç. Dr. Suphi ÖNCEL'e , Biyomühendislik Bölümü arkadaşlarım doktora öğrencisi Yük. Biyomühendis Yunus Emre ÖZ' e, Biyomühendis Utku DEVAMOĞLU' ya, Biyomühendis Bilgesu KAYA' ya ve hayatım boyunca her zaman yanımda olan aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

ÖZGEÇMİŞ

EĞİTİM

Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ABD., İzmir/Türkiye Eylül 2018- Ekim 2021

Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir/Türkiye Eylül 2012- Temmuz 2018

Bandırma Anadolu Lisesi, Balıkesir/Türkiye Eylül 2007- Haziran 2011

LABORATUVAR DENEYİMİ

Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Ege Biyomalzemeler ve 3-Boyutlu Biyoarafazlar Laboratuvarı (Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıp Laboratuvarı), İzmir/Türkiye, Eylül 2016- Halen

STAJ DENEYİMİ

Hipokrat Tıbbi Malzemeler İmalat ve Pazarlama A.Ş., Türkiye, İşyeri Stajı, Ağustos- Eylül 2016

İŞ DENEYİMİ

Soranus Ar-Ge ve Danışmanlık Hizmetleri Sanayi Ticaret A.Ş., Bornova/ İZMİR, Kalite Yönetim Sorumlusu & Ar.-Ge. Mühendisi, Satış Müdürü, Haziran 2020- Halen

KATILIM

1. 14. Biyomühendislik Günleri 5-6 Mayıs, 2017, İzmir/ Türkiye
2. Biyomühendislik Öğrenci Kongresi 17-18 Mart, 2017, İstanbul/ Türkiye
3. Hayvan Hücre Kültürü Eğitimi 19-20 Mart, 2016, İzmir/ Türkiye
4. Biyomühendislik Öğrenci Kongresi 15-16 Mart, 2014, İzmir/ Türkiye
5. Ege Üniversitesi Deney Hayvanı Kullanım Kursu Ekim 2019, İzmir Türkiye
6. Doku Mühendisliği ve Uygulamaları Kursu 29 Şubat 2020, İzmir/Türkiye

İLGİ ve YETENEKLER

Diller: Türkçe, İngilizce

Kullanabildiği Program ve Yazılımlar: Arduino, Excel Visual Basics Programlama, Mat-Lab, MS Office, AutoDesk Fusion360, AutoCAD 3Ds Max, Simplyfy3D Software, Microsoft 3D Builder, Image-J, Dassault Systemes SolidWorks.

İlgi Alanları: 3-Boyutlu Yazıcılar ve 3-Boyutlu Baskı (3D Printing and 3D Printers), 3-Boyutlu Biyobaskı ve 3-Boyutlu Biyoyazıcılar (3D-Bioprinting and 3D Bioprinters), Doku Mühendisliği (Tissue Engineering), Rejenatif Tıp (Regenerative Medicine), Biyomalzemeler (Biomaterials), 2 ve 3 Boyutlu Hücre Kültürü (2D & 3D Cell Culture), Hücre Yüzey Etkileşimleri (Cell- Surface Interactions), ISO 10993 Standartları, ISO 13485 Standartları

Laboratuvar Yetkinlikleri: Viskozimetre, Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM), 3-Boyutlu Yazıcı, 3-Boyutlu Biyoyazıcı, Hücre Kültürü, Sterilizasyon Teknikleri, Histolojik Boyama ve Görüntüleme, Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Termogravimetrik Analiz.

ÇALIŞTIĞI PROJELER

1. “Kemik Doku Mühendisliği Amaçlı Fare Femur Modelinin 3B Biyoyazıcı ile Biyobaskısı” TÜBİTAK 2209/B SANAYİ ODAKLI LİSANS BİTİRME TEZİ DESTEKLEME PROGRAMI Eylül 2016 – Ağustos 2017
2. “Hipertansiyonun Kan Beyin Bariyeri Üzerine Etkilerinin *In Vitro* Modelde İncelenmesi” 2515 COST Programı Mayıs 2019- Haziran 2020

YAYINLAR

1. **GERMİYAN, Ö., S., SEÇKİN, U., D., ŞENDEMİR, A.,** (2017) “Kemik Doku Mühendisliği Amaçlı Fare Femur Modelinin 3D Biyoyazıcı ile Biyobaskısı” 14. Biyomühendislik Günleri, Bornova, İzmir, Türkiye (Poster Sunumu)
2. **GERMİYAN, O., S., SECKIN, U., D., SENDEMİR, A.,** (2018) “Designing a New Biomaterial: Alginate and Diatom Composite Bioink” 2nd International Biomedical Engineering Congress, Nicosia, North Cyprus Turkish Republic (Poster Sunumu)
3. **GERMİYAN, O., S., SECKIN, U., D., SENDEMİR, A.,** (2018) “Investigation of Diatom and Alginate Composites as a Bioink for 3D Bioprinting” KOMPEGE’IV- International Ege Composite Materials Symposium, 6 - 8 September 2018, Ege University (Poster Sunumu)

REFERANSLAR**Yiğit UYANIKGİL**, Prof. Dr.

Histoloji ve Embriyoloji ABD. Tıp Fakültesi, Ege Üniversitesi

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD. 1. Kat 35100 Bornova-İzmir/ Türkiye

Ahmet Özgür YENİEL, Doç. Dr.

Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD. Tıp Fakültesi, Ege Üniversitesi

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD. 2. Kat 35100 Bornova- İzmir/ Türkiye

Serdal TEMEL, Doç. Dr.

Kimya Mühendisliği, Ege Üniversitesi

Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 2. Kat 35100 Bornova- İzmir/Türkiye

Aylin ŞENDEMİR, Doç. Dr.

Biyomühendislik Bölümü, Ege Üniversitesi

Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü A-Blok Zemin Kat 35040 Bornova-İzmir/Türkiye