

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HİDROKSİAPATİT KATKILI POLİ(GLİSEROL-SEBAKAT)/
POLİ(LAKTİKASİT) KARIŞIMINDAN ÜÇ BOYUTLU BASIM İLE
KEMİK DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ VE *IN VITRO*
KARAKTERİZASYONU**

KÜBRA KIRATLI

KOCAELİ 2022

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HİDROKSİAPATİT KATKILI POLİ(GLİSEROL-SEBAKAT)/
POLİ(LAKTİKASİT) KARIŞIMINDAN ÜÇ BOYUTLU BASIM İLE
KEMİK DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ VE *IN VITRO*
KARAKTERİZASYONU**

KÜBRA KIRATLI

Prof. Dr. Özcan GÜNDOĞDU

Danışman, Kocaeli Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Vasıf Nejat HASIRCI

Jüri Üyesi, Acıbadem Üniversitesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi Candan Yılmaz ÖZDOĞAN

Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Halime KENAR

Eş Danışman, Acıbadem Üniversitesi

Enstitü yönetim kurulunun 13/12/2019
tarih ve 2019/45 nolu toplantısında II. tez
danışmanı olarak atanmıştır.

Tezin Savunulduğu Tarih: 20.06.2022

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ

Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez/proje çalışmada,

Bu tezin/projenin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu,

- Çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı,
- Bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi,
- Bu çalışmanın Kocaeli Üniversitesi'nin abone olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun olduğunu,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Tezin/Projenin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez/proje çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

☐Bu tez/proje çalışmasının herhangi bir aşaması hiçbir kurum/kuruluş tarafından maddi/alt yapı desteği ile desteklenmemiştir.

☒Bu tez/proje çalışması kapsamında üretilen veri ve bilgiler Acıbadem Üniversitesi tarafından 2020/04/09 no'lu proje kapsamında maddi/alt yapı desteği alınarak gerçekleştirilmiştir.

Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Kübra KIRATLI

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI

Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/projemin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda belirtilen koşullarla kullanıma açma izninin Kocaeli Üniversitesi'ne verdiğimi beyan ederim. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin/projemin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanımı bana ait olacaktır.

Tezin/projenin kendi özgün çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin/projenin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim kurulu tarafından yayınlanan ***“Lisanüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”*** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi/ Kocaeli Üniversitesi Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

☐ Enstitü yönetim kurulu kararı ile tezimin/projemin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.

☐ Enstitü yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin/projemin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 6 ay ertelenmiştir.

☒ Tezim/projem ile ilgili gizlilik kararı verilmemiştir.

Kübra KIRATLI

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Prof. Dr. Özcan Gündoğdu'ya değerli tavsiyeleri ve yönlendirmeleri, sunduğu büyük destek için teşekkürlerimi sunarım.

Benim için çok değerli ve başarılı bir rol model olan eş danışmanım Prof. Dr. Halime Kenar'a tezim süresince bana göstermiş olduğu destek, motivasyon, önerileri, anlayışı ve bana olan inancı için özel teşekkürlerimi sunarım. Kocaeli Üniversitesi'nde başlayan yüksek lisans maceramda beni bırakmayıp Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Biyomalzeme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde çalışmalarımı özenle devam ettirmeme olanak sağladığı ve akademik deneyimimi geliştirmek üzere harcadığı zaman için minnettarım.

Tez sürecim boyunca bir yol gösterici olan, deneyimleriyle ilham veren ve bilimsel gereksinimlerim doğrultusunda Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Biyomalzeme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin ve Ortadoğu Teknik Üniversitesi Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin kapılarını sonuna kadar açan; tüm kaynaklardan yararlanmama ve cihazlarla değerli deneyimler edinmeme olanak sağlayan Prof. Dr. Vasıf Hasırcı'ya çok teşekkür ederim. Bana sağlamış olduğu destek için çok şanslıyım.

Deneylerimde ihtiyaç duyduğum elimde olmayan kimyasalları benimle paylaşan ve değerli önerileriyle çalışmalarına destek olan Dr. Öğr. Üyesi Deniz Yücel'e; taramalı elektron mikroskobu görüntülerimi almama yardımcı olan Senem Çitoğlu'na; zorda kalınca direkt kendisine koştuğumuz, her ihtiyacımızı hızla çözmemize yardımcı olan Biyomalzeme Uygulama ve Araştırma Merkezi teknikeri Hakan Yılmaz'a ve NMR analizlerimde bana yardımcı olan ve her ihtiyaç duyduğumda Acıbadem Üniversitesi Nanobiyoteknoloji Laboratuvarı'nın imkanlarından faydalanmama olanak sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Özgül Gök'e,

Bana TÜBİTAK'ta bilim dünyasının kapılarını aralayan, araştırma ve düşünmeyi, sorular sormayı sevmemde katkısı büyük olan, çok iyi bir araştırmacı ve öğretici olan Dr. Burhanettin Yalçınkaya'ya; çizimlerimde ve daha birçok konuda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Ahmet Burak Öztürk'e; dostluğu, tüm duygusal ve bilimsel desteği ile değerli tavsiyeleri için Dr. Öğr. Üyesi Candan Yılmaz Özdoğan'a, birçok konuda desteğini hep hissettiğim Emin Özdoğan'a çok teşekkür ederim.

Bu yolculuk boyunca sevgili arkadaşlarım Aslıhan Akalın ve sabahlara kadar benimle çalışan Nurdan Çam'a hep yanımda oldukları, her açıdan bana yardımcı oldukları için ne kadar teşekkür etsem az. Bu süreçte desteklerini eksik etmeyen Gizem Uslu, ACU-BIOMAT ekibindeki arkadaşlarım Şeyma Işık, Neval Sevinç Özdemir, Ege Kırbaş, bolca karnımı doyuran Gözde Köle, süreç yoldaşım Deniz Başöz ve proje partnerim Tuğçe Doğruel'e de teşekkürler.

Teşekkürlerin en büyüğünü her ihtiyacımda yanımda olan, desteklerini sonuna kadar hissettiğim, benim kendi çapında güçlü ve inançlı biri olmamı sağlayan annem Sevgi Kurtaran ve babam Murat Coşkun'a sunuyorum. Kuzen olsak da her zaman biricik küçük kardeşim olan canım Rabia Coşkun'a, bana en güzel örnekler olarak dünyaya bakışımı zenginleştiren ve hep arkamda olduğunu bildiğim ablalarım Nagehan Satılmış, Nazlıhan

Altuntaş ve Nihan Akuş ile hayatıma kattıkları abilerim Fatih Satılmış, Mevlüt Altuntaş ve Adem Akuş’a bütün destekleri ve sevgi dolu birbirinden güzel yeğenlere sahip olmama vesile oldukları için,

Sevgili eşim, en iyi arkadaşım, yapayalnız hissettiren gece ve haftasonu laboratuvar çalışmalarımın değerli eşlikçisi Beşir Nureddin Kıratlı’ya bana olan sonsuz sevgisi, desteği ve anlayışı için çok teşekkür ederim. Hayatın sık sık iyiki dedirttiği bir ütopyadaymışçasına hissettiren canım eşim, hayatın bana en özel hediyesi.

Abapko projesi kapsamında tezime destek sağlayan Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi’ne ve BİDEB 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK’a teşekkür ederim.

Haziran 2022

Kübra KIRATLI

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ.....	i
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kemik Doku.....	3
2.1.1. Kemik Doku ve Bileşenleri.....	3
2.1.2. Kemğin Biyomekanığı	5
2.1.3. Kemik Hasarının İyileşmesi	6
2.2. Doku Mühendisliği	9
2.3. Kemik Doku Mühendisliği	11
2.3.1. Kemik Doku Mühendisliğinde Doku İskeleleri	11
2.3.1.1. Kemik Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan	
Malzemeler	12
2.3.1.2. Kemik Doku İskelesi Üretim Yöntemleri.....	17
2.3.2. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler	21
2.3.3. Kemik Doku Mühendisliğinde Biyosinyal Molekülleri.....	22
3. MALZEME VE YÖNTEM	23
3.1. Poligliserolsebakat (PGS) Prepolimerinin Sentezlenmesi	23
3.2. PGS Prepolimerinin Karakterizasyonu	23
3.2.1. PGS Prepolimerinin FTIR Analizi	23
3.2.2. PGS Prepolimerlerinin NMR Analizi	24
3.2.3. GPC ile PGS Prepolimerinin Moleküler Ağırlık Tayini	24
3.3. PGS Prepolimerinin Metakrilatlanması	24
3.4. PGS-MA Prepolimerinin Karakterizasyonu	25
3.4.1. PGS-MA Prepolimerinin FTIR Analizi	25
3.4.2. PGS-MA Prepolimerinin NMR Analizi.....	25
3.5. Üç Boyutlu Doku İskelelerinin Üretimi.....	26
3.5.1. Üç Boyutlu Doku İskelesi Kalıplarının Üretimi	26
3.5.1.1. Polivinilalkol (PVA) İskele Kalıbının Tasarımı ve	
Üretimi	26
3.5.1.2. 15 Kuyucuklu Polidimetilsiloksan (PDMS) Plaka	27
3.5.2. Polimer ve Kompozit Çözeltilerinin Hazırlanması	27
3.5.3. Üç boyutlu Doku İskelelerinin Üretimi.....	28
3.5.4. Doku İskelesi Yapımında Kullanılacak PLA	
Konsantrasyonunun Belirlenmesi	29
3.6. Doku İskelelerinin Karakterizasyonu	29
3.6.1. Doku İskelelerinin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi	29
3.6.2. Doku İskelelerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile	
Analizi	30
3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	30

3.7.1. İnsan Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (ADMKH) İzolasyonu ve Kültürü	30
3.7.2. İnsan Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu.....	31
3.7.2.1. Hücre Morfolojisinin Mikroskopik Yöntemlerle Analizi	31
3.7.2.2. Hücrelerin İmmünojenotip Analizi	32
3.7.2.3. Hücrelerin Osteojenik Farklılaşma Kapasitesinin Belirlenmesi.....	32
3.7.2.4. Hücrelerin Adipojenik Farklılaşma Kapasitesinin Belirlenmesi.....	33
3.8. Doku İskelelerine Hücre Ekimi ve İskele Üzerindeki Hücre Davranışın Belirlenmesi	34
3.8.1. Doku İskelelerinin Hücre Ekimine Hazırlanması ve İskelelere Hücre Ekimi.....	34
3.8.2. İskelelerin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	34
3.8.3. Phalloidin Boyama	35
3.8.4. İskelelerin Hücre Çoğalmasına Etkisinin Belirlenmesi	35
3.8.5. İskelelerin Osteojenik Farklılaşmaya Etkisinin Belirlenmesi	36
3.8.5.1. Osteojenik Farklılaşmanın Alkalen Fosfataz Testi ile Belirlenmesi.....	36
3.8.5.2. Mineralizasyonun Alizarin Red Boyası ile Görüntülenmesi	37
3.8.5.3. Mineralizasyonun Floresan Görüntülenmesi.....	37
3.8.5.4. Mineralizasyonun Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analizi	38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	39
4.1. PGS ve PGS-MA Moleküllerinin Üretimi ve Karakterizasyonu.....	39
4.1.1. PGS Prepolimerinin Üretimi ve FTIR Analizi.....	39
4.1.2. GPC ile PGS Prepolimerinin Moleküler Ağırlık Tayini	41
4.1.3. PGS-MA'nın Üretimi ve FTIR Analizi.....	41
4.1.4. PGS ve PGS-MA moleküllerinin NMR analizi	42
4.2. Üç Boyutlu İskele Kalıbının ve Kuyucuklu Plakanın Üretimi	43
4.3. Üç Boyutlu PLA, PLA/PGS-MA, PLA/PGS-MA/HAp Doku İskeleleri.....	45
4.3.1. İskeleler için Uygun PLA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	45
4.3.2. Doku İskelelerinin Fiziksel Karakterizasyonu	45
4.3.3. Doku İskelelerinin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi	47
4.4. İnsan Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu	48
4.4.1. Hücrelerin Mikroskopik Yöntemlerle İncelenmesi.....	48
4.4.2. Hücrelerin Yüzey Antijeni Analizi	49
4.4.3. Hücrelerin Osteojenik Farklılaşma Kapasitesinin Belirlenmesi	50
4.4.4. Hücrelerin Adipojenik Farklılaşma Kapasitesinin Belirlenmesi	51
4.5. Doku İskelelerindeki Hücre Davranışın Değerlendirilmesi	51

4.5.1. İskeleler Üzerinde Hücre Canlılığı ve Çoğalmasının Belirlenmesi	51
4.5.1.1. Canlı-Ölü Hücre Boyaması	52
4.5.1.2. Phalloidin-DAPI Boyaması	57
4.5.1.3. Presto Blue Testi.....	58
4.5.2. İskele Üzerindeki Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasının İncelenmesi	59
4.5.2.1. Osteojenik Farklılaşmanın ALP Testi ile Belirlenmesi.....	59
4.5.2.2. Mineralizasyonun Stereomikroskop ile Görüntülenmesi	60
4.5.2.3. Mineralizasyonun Floresan Görüntülenmesi.....	60
4.5.2.4. Mineralizasyonun Taramalı Elektron Mikroskobu ile Görüntülenmesi.....	62
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR.....	65
EKLER....	72
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kemiğin yapısı	4
Şekil 2.2. Kemik hasarının iyileşmesi	7
Şekil 2.3. Doku mühendisliği	10
Şekil 2.4. Elektroeğirme düzeneği.....	19
Şekil 2.5. Üç boyutlu basım yöntemleri	20
Şekil 3.1. Poli(glisero-sebakat)'ın metakrilatlanması	25
Şekil 3.2. PVA Kalıp Tasarımı.....	26
Şekil 3.3. PDMS plaka kalıbı tasarımı	27
Şekil 3.4. 3 Boyutlu Doku İskelesi Üretim Süreci	29
Şekil 4.1. Gliserolün FTIR spektrumu	39
Şekil 4.2. Sebasik asitin FTIR spektrumu	40
Şekil 4.3. PGS prepolimerlerinin FTIR analizi.. ..	40
Şekil 4.4. pre-PGS ve pre-PGS-MA'nın karşılaştırmalı FTIR analizi	41
Şekil 4.5. PGS-MA molekülünün iskeleti ile PGS ve PGS-MA prepolimerlerinin NMR Spektrumu	42
Şekil 4.6. PVA Kalıbın mikroskop görüntüleri.	44
Şekil 4.7. PDMS 15 Kuyucuklu Plaka.	44
Şekil 4.8. Doku iskelelerinin kürlenmeden önceki ve sonraki stereomikroskop görüntüleri	46
Şekil 4.9. PLA, PLA/PGS-MA ve PLA/PGS-MA/HAP iskelelerin SEM görüntüleri.	47
Şekil 4.10. Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin mikroskop görüntüsü.....	49
Şekil 4.11. Hücrelerin akış sitometrisi ile karakterizasyon verileri.....	50
Şekil 4.12. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaştırma ile oluşturduğu kemik mineralinin Alizarin red boyaması sonrası ışık mikroskobu görüntüleri.	50
Şekil 4.13. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin adipojenik farklılaştırma ile oluşturduğu yağ damlacıklarının Oil Red O boyaması sonrası ışık mikroskobu görüntüleri..	51
Şekil 4.14. İskele üzerinde 24 saat sonunda canlı- ölü hücre boyaması ile elde edilmiş canlı hücre görüntüleri.....	53
Şekil 4.15. PLA iskele üzerinde 7. gün canlı-ölü hücre boyaması konfokal mikroskop görüntüleri.....	54
Şekil 4.16. PLA/PGS-MA iskele üzerinde 7. gün canlı-ölü hücre boyaması konfokal mikroskop görüntüleri.....	55
Şekil 4.17. PLA/PGS-MA/HAP iskele üzerinde 7. gün canlı-ölü hücre boyaması konfokal mikroskop görüntüleri	56
Şekil 4.18. İskeleler üzerindeki hücrelerin 7. gün ve 21. gün Phalloidin- DAPI boyaması konfokal mikroskop görüntüleri	57
Şekil 4.19. Presto Blue Testi ile belirlenmiş iskeleler üzerindeki canlı hücre sayıları.	58
Şekil 4.20. İskele üzerindeki hücrelerin ALP enzimi aktivitesi	59
Şekil 4.21. İskeleler üzerinde Alizarin Red boyaması ile görünür hale getirilmiş kemik mineralinin ışık mikroskobu görüntüleri.	60

Şekil 4.22. İskeleler üzerinde hücreler tarafından oluşturulan kemik mineralinin otofloresan tetrasiklin ile işaretlenmesi sonucu elde edilen konfokal mikroskopi görüntüleri.....	61
Şekil 4.23. Osteojenik farklılaşma protokolü uygulanan doku iskelelerinin SEM görüntüleri.....	62



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Kemik türlerinin mekanik özellikleri	5
Tablo 2.2. Kemik iyileşmesine etki eden biyokimyasal faktörler	8
Tablo 2.3. Biyomalzemeler ile avantajları ve dezavantajları	13
Tablo 2.4. İskele üretim teknikleri ile avantajları ve dezavantajları	18
Tablo 3.1. Prepolimer karışımı monomer oranları	23
Tablo 3.2. Polimer çözelti kompozisyonları.....	28
Tablo 4.1. Farklı PLA konsantrasyonlarıyla üretilen iskelelerin elastiklik modülü değerleri	45



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ca	: Kalsiyum
gr	: Gram
mg	: miligram
Mg	: Magnezyum
ml	: Mililitre
MPa	: Megapaskal
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
µl	: Mikrolitre
µm	: mikrometre
µM	: Mikromolar
°C	: Santigrat derece

Kısaltmalar

ADMKH	: İnsan Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücre
ALP	: Alkalen Fosfataz
BCA	: Bikinkoninik asit
BMP	: Bone Morphogenic Protein(Kemik Morfojenik Proteini)
BSA	: Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albümini)
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco'nun Besiyeri)
DNAase	: Deoxyribonuclease (Deoksiriboükleaz)
DPBS	: Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salini
ECM	: Extracellular Matrix (Ekstrasellüler Matriks)
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
FACS	: Fluorescence-activated cell sorting (Floresan Aktif Hücre Sıralaması)
FBS	: Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumu)
FDA	: Food and Drug Administration (Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi)
FDM	: Fused Deposition Modelling (Eriyik Yığınlıyarak Modelleme)
FGF	: Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)
FTIR	: Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)
GPC	: Jel geçirgenlik kromatografisi
HAP	: Hidroksiapatit
HBSS	: Hank's Balanced Salt Solution (Hank'in Tampon Tuz Çözeltisi)
IGF	: Insuline-like Growth Factor (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü)
IPSC	: Induced Pluripotent Stem Cell (İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre)
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PBS	: Phosphate Buffered Salline (Fosfat Tamponlu Salin)
PCL	: Polikaprolakton

PDGF	: Platelet-derived growth factor (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü)
PDMS	: Polidimetilsiloksan
PEEK	: Polieter Eter Keton
PFA	: Paraformaldehit
PGA	: Poliglikolik asit
PGS	: Poligliserolsebakat
PGS-MA	: Poligliserolsebakat metakrilat
PLA	: Polilaktik Asit
PLGA	: Polylaktik-ko-glikolik asit
PS	: Polistiren
PSA	: Penisilin-strepromisin-amfoterisin
PVA	: Polivinil Alkol
SEM	: Scanning Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskobu)
SLA	: Stereolitografi
SLS	: Selective Laser Sintering (Seçici Lazer Sinterleme)
TGF- β	: Transforming Growth Factor (Transforme Edici Büyüme Faktörü)
THF	: Tetrahidrofolik Asit
TIPS	: Thermally Induced Phase Separation (İndüklenmiş Faz Ayrımı Yöntemi)
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)

HİDROKSİAPATİT KATKILI POLİ(GLİSEROL-SEBAKAT)/POLİ(LAKTİK ASİT) KARIŞIMINDAN ÜÇ BOYUTLU BASIM İLE KEMİK DOKU İSKELESİ ÜRETİMİ VE *IN VITRO* KARAKTERİZASYONU

ÖZET

Kemik doku mühendisliği, kemik hasarının mekanik stabilite içinde ve doğal doku oluşumu yolu ile yenilenmesini amaçlayan, üzerine çalışmaların gün geçtikçe arttığı bir tedavi yaklaşımıdır. Biyobenzer ve biyobozunur bir kemik doku iskelesi üretmeyi hedeflediğimiz bu çalışmada polilaktik asit (PLA) tabanlı üç boyutlu kompozit iskeleler üç boyutlu basım yöntemi ile basılan kalıplar yardımıyla üretilerek iskelelerin hücre canlılığına ve osteojenik farklılaşmasına etkisi incelenmiştir. PLA tabanlı polimer karışımında kullanılmak üzere poli(gliserol sebakat) metakrilat (PGS-MA) sentezlenmiş ve kimyasal olarak karakterizasyonu yapılmıştır. İskelelere osteoindüktif özellik kazandırmak amacıyla hidroksiapatit (HAP) katkılanmıştır. PLA, PLA/PGS-MA ve PLA/PGS-MA/HAP iskelelerin biyouyumluluğu ve osteojenik farklılaşmaya etkisinin incelenmesinde kullanılmak üzere ATADEK-2020/12 sayılı etik kurul izni ile insan adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücreler (AD MKH) izole edilmiş ve hücre karakterizasyon testleri gerçekleştirilerek hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğu kanıtlanmıştır. İskelelerin fiziksel ve mekanik özellikleri sırası ile taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve mekanik test ile belirlenmiştir. PGS-MA katkısının PLA iskelenin mekanik dayanımını arttırdığı gösterilmiştir.

PLA/PGS-MA iskelelerin hücre tutunmasına olumlu etkisinin saf PLA iskeleye göre daha iyi olduğu, hücre çoğalma hızına olumlu etkisinin ise PLA/PGS-MA/HAP katkılı kompozit iskeleye göre daha iyi olduğu hücre çoğalma testi ile belirlenmiştir. Canlı-ölü hücre boyaması hiçbir iskele türünün hücre canlılığına olumsuz etkisinin olmadığını göstermiştir; hücre ölümü genel olarak PLA/PGS-MA/HAP iskelelerde gözlemlenen hücre kümelerinin iç kısmında tespit edilmiştir. PLA/PGS-MA iskele yüzeyinde hücre uzanması (yayılması) diğer iki iskele yüzeyine kıyasla daha başarılı gerçekleşmiştir. Osteojenik farklılaşmanın erken belirteci olan alkalın fosfataz enzim aktivitesi PLA/PGS-MA/HAP iskelesinde en düşük seviyede belirlenmesine rağmen kemik minerali oluşumu en yüksek seviyede yine bu iskele üzerinde tespit edilmiştir. PLA'nın %1 oranında PGS-MA ile katkılanmasının mekanik dayanımını, yüzeyinde hücre tutunması ve çoğalmasını arttırdığı ve kemik oluşumuna olumlu etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu iki bileşene HAP eklenmesi ile de doku iskelesi üzerinde kemik dokusu oluşumu hızlandırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyomalzemeler, Kemik, Kök Hücre, Poli(laktik asit), Poli(gliserol sebakat).

CONSTRUCTION AND *IN VITRO* CHARACTERISATION OF HYDROXYAPATITE/POLY(GLYCEROL-SEBACATE)/POLY(LACTIC ACID) BASED BONE TISSUE SCAFFOLDS VIA THREE-DIMENSIONAL PRINTING

ABSTRACT

Bone tissue engineering is a treatment approach that aims to regenerate bone damage in mechanical stability and through natural tissue formation, on which studies are increasing day by day. In this study, where we aimed to produce a biosimilar and biodegradable bone tissue scaffold, three-dimensional composite scaffolds based on polylactic acid (PLA) were produced with the help of molds printed with the three-dimensional printing method and the effect of the scaffolds on cell viability and osteogenic differentiation was investigated. Poly(glycerol sebacate) methacrylate (PGS-MA), to be used in PLA-based polymer mixture, was synthesized and chemically characterized. Hydroxyapatite (HAP) was added to the scaffolds to give osteoinductive properties. With the permission of the ethics committee numbered ATADEK-2020/12; human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AT MSCs), to be used in the biocompatibility studies of PLA, PLA/PGS-MA and PLA/PGS-MA/HAP scaffolds and their effect on osteogenic differentiation, were isolated and cell characterization tests were performed to prove that these cells are mesenchymal stem cells. The physical and mechanical properties of the scaffolds were determined by scanning electron microscopy (SEM) and mechanical testing, respectively. It has been shown that PGS-MA addition increases the mechanical strength of the PLA scaffolds.

It was determined by the cell proliferation test that the positive effect of PLA/PGS-MA scaffolds on cell adhesion was better than the pure PLA scaffold, and the positive effect on cell proliferation rate was better than PLA/PGS-MA/HAP composite scaffolds. Live-dead cell staining showed that neither of the scaffolds had an adverse effect on cell viability; cell death was detected in the interior of the cell clusters generally observed on the PLA/PGS-MA/HAP scaffolds. Cell spreading on the PLA/PGS-MA scaffold surface was more successful than on the other two scaffold surfaces. Although alkaline phosphatase enzyme activity, which is an early marker of osteogenic differentiation, was determined at the lowest level in PLA/PGS-MA/HAP scaffolds, bone mineral formation on this scaffold was determined at the highest level. It was determined that the addition of 1% PGS-MA to PLA increased its mechanical strength, cell adhesion and proliferation on its surface, and had a positive effect on bone formation. With the addition of HAP to these two components, bone tissue formation on the tissue scaffold was accelerated.

Keywords: Biomaterials, Bone, Stem Cells, Poly(lactic acid), Poly(glycerol sebacate).

1. GİRİŞ

Kemik doku, kendi kendini yenileyebilme yeteneğine sahip olsa da yüksek hasar gören bölgelerde bu yetenek yetersiz kalabilmektedir. Hasarın tamiri için geleneksel olarak kullanılan greftleme yöntemleri immün yanıt oluşumu ve fazladan ameliyat yarası gibi olumsuzluklara yol açabilmektedir. Doku mühendisliği yöntemiyle çeşitli biyouyumlu malzemelerden dokuya uygun mekanik mukavemet ve bozunabilme özelliklerine sahip olarak üretilen doku iskeleleri bu olumsuzlukları önlemek için geleceğin tedavi yöntemi olarak bizlere umut vermektedir.

Kemik doku mühendisliği için iskele malzemeleri osteoprogenitör hücrelerin tutunup göç edebilmeleri, farklılaşabilmeleri ve sonunda yeni kemik oluşturabilmeleri için osteokondüktif (osteiletken) olmalıdır. Özellikle polilaktik asit (PLA) gibi biyobozunur polimerler ve bunların kopolimer ve kompozitleri çeşitli üretim teknikleri ile yapı iskeleleri geliştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Davashi ve Kaffashi, 2015; Senatov ve diğ., 2016). Kemik onarımı için diğer bir ana biyomalzeme sınıfı, doğal kemiğin mineral bileşenine benzer olarak, iyi osteoletkenlik ve kemik bağlama yeteneği gösteren hidroksiapatit (HAP) seramiklerdir. İki malzeme türünün de olumlu özelliklerini birleştirmek için geliştirilen kompozit iskele türlerinin hücre çoğalmasını ve doku oluşumunu desteklediği literatürde belirtilmiştir (Wei ve MA 2003). Yapısı itibarıyla organik ve inorganik bileşenlere sahip, kompozit özellik gösteren kemik dokunun tedavisinde kullanılacak malzemenin kompozit oluşunun biyomimetik yaklaşımla değerlendirildiğinde olumlu özellik göstereceği tahmin edilebilir. Kullanılacak mineralin boyutunun da doğal dokuya benzer seçilmesi mekanik ve osteokondüktif özellikleri etkilemektedir, nanoboyutlu seramiklerin kemik hücresi tutunmasında artış sağladığı bilinmektedir (Webster ve diğ., 1999).

Bu çalışmada günümüzde kendi kendine iyileşemeyecek durumda olan kemik hasarlarının tedavisinde kullanılabilecek kemik doku mühendisliği yaklaşımında kullanılmak üzere kemiğin doğal yapısına ve hasara uygun şekilde üç boyutlu olarak üretilmiş kompozit doku iskelesi geliştirerek malzemenin hücre ile etkileşimi ve osteojenik farklılaşmaya etkisi incelenmiştir. Kırılganlığı sebebiyle tek başına kemik doku mühendisliğinde kullanılması mümkün olmayan HAP seramiği, halihazırda kemik doku mühendisliğinde kullanılmakta olan PLA ve biyouyumluluğu ve hücre tutunmasına

olumlu etkileri bilinen PGS ile harmanlanarak hem biyouyumlu hem de osteokondüktif özelliklere sahip, mekanik olarak doğal dokuya uygun bir iskele üretmek amaçlanmıştır. Mikrodalga fırın ile üretilen PGS prepolimeri metakrilatlanarak karışıma daha iyi nüfuz etmesi ve molekülün çapraz bağlanma aşamasının kolaylaştırılması sağlanmıştır.

İskele gruplarının *in-vitro* testleri için adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre izole edilmiş, karakterizasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Çalışılan iskele gruplarının fiziksel ve mekanik özellikleri ile hücre tutunmasına etkisi, proliferatif ve osteoindüktif özellikleri araştırılarak kıyaslanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Doku

2.1.1. Kemik Doku ve Bileşenleri

Kemik, organlarımıza destek ve koruma sağlayan iskelet sisteminin bir elemanı olmanın yanı sıra kan hücrelerini oluşturan kemik iliğinin üretilip saklandığı dokudur. Ayrıca kas kasılması, pıhtılaşma, hücre zarından madde geçişi ve nöronlar arası aksiyon potansiyeli sağlanması gibi biyolojik olaylarda hayati önem taşıyan kalsiyum gibi minerallerin depolanıp salımının gerçekleştiği bir organ olması açısından da organizma için önemlidir. Hücre dışı bileşenlerinin mineralleşerek dokuya sertlik kazandırması onu diğer bağ dokulardan ayırır ve mekanik rolünü yerine getirebilmesini sağlar (Topaloğlu ve diğ., 2017; Fuchs ve diğ. 2019).

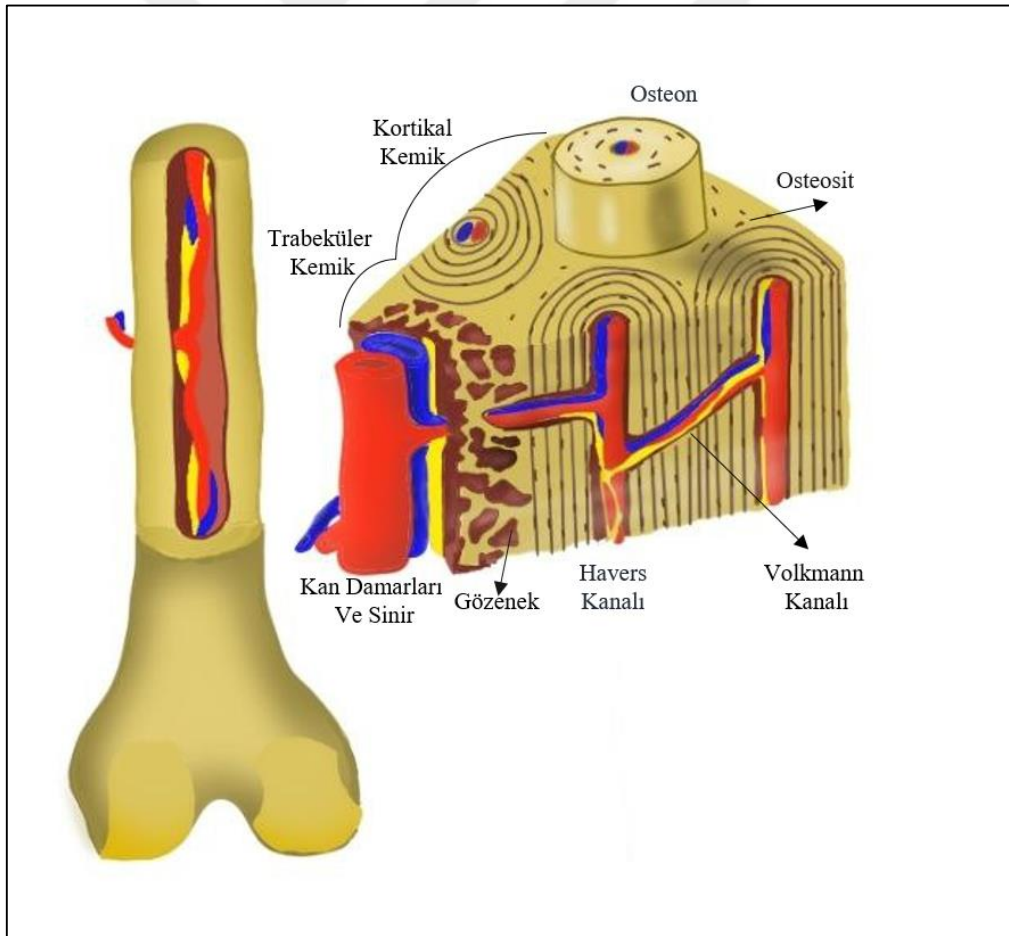
Organik ve inorganik fazları ve hücrelerle sürekli yenilenen bir doğal kompozit niteliğinde olan kemik doku; yaklaşık %90'ını oluşturan inorganik fazında hidroksiapatit kristalleri yanında kolajen ve proteoglikanlar gibi organik bileşenleri de barındırır (Lin ve diğ., 2020). Dokuda kemik iliği harici dört hücre çeşidi daha bulunur. Bunlar osteoprogenitör hücreler, osteoblast, osteosit ve osteoklastlardır.

Osteoprogenitör (osteoblast öncülü) hücreler, doku yenilenmesi söz konusu olduğunda osteoblastlara farklılaşmak üzere Havers kanalları ve periosteumda hazır halde bulunurlar. Osteoblastlar ekstraselüler matriksin organik bileşenlerini sentezler ve kemik yapımı ardından olgunlaşarak osteositlere dönüşürler. Osteositler Havers kanallarındaki boşluklarda bulunur ve sitoplazmik yolla birbirleri ve dokudaki diğer hücrelerle iletişim sağlayarak sinyal ve besin alışverişinde rol oynar. Osteoklastlar ise hematopoetik hücrelerden farklılaşarak oluşur ve doku yıkımında rol alır. Dokunun yenilenebilirliğinde tüm hücreler çok önemli rol oynar (Oyar, 2015).

Kemik doku, türüne, konumuna ve baskın doku bileşimine göre sınıflandırılabilir. Makroskopik olarak (baskın doku bileşimine göre) kortikal ve trabeküler kemik olmak üzere iki sınıfta incelenebilir. Embriyonik dönemde, iyileşme evresinde ve bazı patolojik süreçlerde gözlenen nonlameller kemik ise rastgele kolajen lifler, düzensiz boşluklar ve

kemik hücrelerinden oluşur. Sonradan yeniden yapılanma yoluyla kortikal ve trabeküler kemiğe dönüşür.

İskelet sisteminin büyük kısmını oluşturan kortikal (kompakt, sert) kemik; yüksek hücreler arası bileşen yoğunluğuna ve düşük gözenekliliğe sahiptir. Kemiğin kemik iliğini çevreleyen dış kabuğunu oluşturan bu kemik sınıfı bol mineralizasyon gösterir. Bu özellikleri ile kemiğin mekanik dayanımına katkı sağlar. Kemik hiyerarşisinde (Şekil 2.1) kemiğin en küçük birimine “osteon” denir. Osteonlar, 1 µm çapında mineralize kolajen fibrillerinin bir araya gelmesiyle meydana gelen lamel halkalarına sahiptir ve Havers kanalını çevrelerler. Lamel halkaları arasında olgun kemik hücrelerini barındıran boşluklara “lakün” adı verilir. Havers kanallarının içinde bulunan damarlarca beslenen osteositler birbirleriyle ve süngerimsi kemikteki osteojenik hücrelerle etkileşim içindedirler. Besin ve atıkların taşınması “kanaliküller” aracılığıyla sağlanır.



Şekil 2.1. Kemiğin yapısı

Trabeküler kemik (süngerimsi, kanselöz), aralarında kemik iliği içeren boşluklar barındıran trabeküllerden oluşur. Bu sebeple %90'lara kadar çıkabilen yüksek gözeneklilik gösterir. Bu gözenekler, mekanik dayanımının kortikal kemikten 10 kat daha düşük olmasına yol açsa da kemikte yükün eşit olarak dağıtılması ve eklem bölgelerinde enerjinin emilebilmesi gibi faydalar sağlar. Ayrıca kemik iliği, kan damarları ve bağ dokuların kemikle temas halinde olmasını sağlayarak doku canlılığının korunmasının yanı sıra mineral salımı ve kan hücresi üretimi gibi olaylarda kemiğin rolünü kolaylaştırır. (Safadi ve diğ., 2009; Korkusuz ve diğ.,2011).

2.1.2. Kemiğin Biyomekaniği

İnsan vücudunda bulunan 206 adet kemiğin morfoloji ve bileşimleri birbirinden farklıdır çünkü kemik doku, karşılaştığı yüke göre adaptasyon gösterir. Dokudaki mineralizasyon kemiğe sertlik ve uygulanan kuvveti taşıma kapasitesi sağlarken, kolajen lifler elastikiyet ve dayanıklılık katar. Bunda biyomekaniğin rolü mekanik gerilmenin fazla olduğu bölgelerdeki trabeküllerin daha kalın olup gözenekliliğin düşüklüğü ile örneklenebilir, sadece gözeneklilik değil trabekül mimarisi de mekanik mukavemeti etkiler (Oyar,2015).

Tablo 2.1. Kemik türlerinin mekanik özellikleri (Wang ve diğ., 2016)

	Gözeneklilik	Modül (GPa)	Kuvvet (MPa)
Kortikal Kemik	%3-5	Uzunlamasına 17.9±3.9	Çekme 135± 15.6
			Basma 205± 17.3
		Enine 10.1±2.4	Çekme 53±10.7
		Kesme 3.3±0.4	Basma 131±20.7
Trabeküler Kemik	%85-90	Omur 0.067±0.045	Kesme 65±4.0
		Kaval Kemiği 0.445±0.257	Omur 2.4±1.6
		Femur 0.441±0.271	Kaval Kemiği 5.3±2.9
			Femur 6.8±4.8

Temelde osteonlardan oluşan kortikal kemik trabeküler kemiğe göre sert ve dayanıklıdır (Tablo 2.1). Osteonlar dikey ekseninde kemiğe maksimum dayanıklılık katar.

Trabeküler kemikte ise trabekül mimarisinin de etkisiyle her trabekül ayrı ayrı dayanım gösterir. Kortikal kemik sıkıştırma kuvvetlerine; trabeküler kemik ise germe kuvvetlerine karşı daha dirençlidir. Trabeküler kemik kortikal kemikten yaklaşık beş yüz kat sünek ve neredeyse on kat yumuşaktır (Lacroix, 2019)

Mekanik olarak anizotropik bir malzeme olan kemik farklı yönlü yüklere farklı mekanik özellikler gösterir. Uzun kemikte elastiklik modülü ile mekanik dayanım, yükleme eksenı boyunca yanal yöne göre daha yüksektir. Aynı zamanda normal yaşantıda daha çok basma kuvvetine maruz kalan kemiklerimizin basma dayanımı çekme dayanımına göre daha yüksektir (Ün ve diğ., 2014)

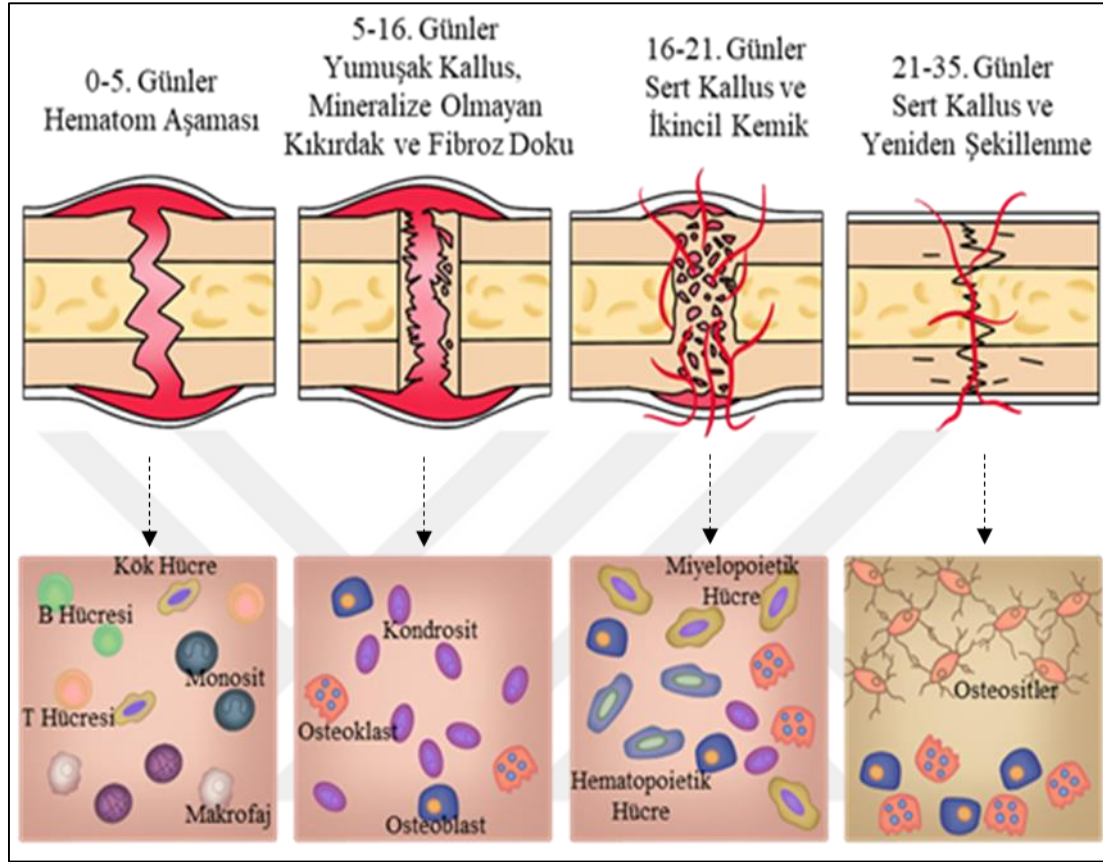
Kemiğin mekanik davranışına etki eden faktörler; porozite, kemik kütlesi, kemik mikromimarisı, yükün uygulandığı bölgedeki kesit alanı gibi geometrik özellikler, yaş, cinsiyet ve doku metabolizmasını etkileyen hastalıklar olarak sınıflandırılabilir. Yapısal özellikler maksimum kırılma kuvveti, total deformasyon ve tokluk parametreleri ile değerlendirilirken; materyal özellikleri maksimum dayanım, maksimum gerinim ve elastiklik modülü ile incelenir (Gürgöl ve diğ.,2016).

Kemiğin mekanik davranışının incelenmesinde geleneksel olarak basma, çekme, burma ve eğme testleri uygulanmaktadır. Geleneksel testlere ek olarak daha özelleşmiş olan indentasyon testi, saf makaslama testi, yorgunluk testi ve akustik testler de tercih edilebilmektedir. Bu biyomekanik testlerin uygulanmasında önemli kriterler; doku hidrasyonu, ortam sıcaklığı ve yükleme hızıdır. Ayrıca doku izolasyonu sonrası geçen sürede otolize bağlı olarak da biyomekanik özelliklerde değişiklik olacağı mutlaka göz önüne alınmalıdır (Lacroix, 2019).

2.1.3. Kemik Hasarının İyileşmesi

Osteoblast ve osteoklastların sürekli etkileşimleriyle kendini sürekli yenileyebilme kapasitesine sahip olan kemik doku, hasar durumunda da skar doku oluşturmada iyileşebilme yeteneğine sahiptir. Bağ doku iyileşmesinden temel olarak kalsifiye doku oluşumu ile ayrılan kemik iyileşmesi iki biçimde meydana gelir. Birincil iyileşmede (direkt) kırıldak oluşumu yoktur, kemik parçaları birbirine sıkıca sabitlenebildiğinde osteoklast ve osteoblast aktiviteleri ile iyileşir. İkincil iyileşme (dolaylı) ise kemik

parçaları sabit durmadığı durumlarda görülür, bu süreç daha yaygın olarak meydana gelmektedir.



Şekil 2.2. Kemik hasarının iyileşmesi

İkincil iyileşme “ hematoma, yumuşak kallus oluşumu, sert kallus oluşumu ve yeniden şekillenme” olmak üzere dört fazda incelenebilir (Şekil 2.2). Doku travmalarının tümünde görüldüğü üzere hasar sonrası oluşan ilk yanıt yangı’dır. Travmanın şiddetine bağlı olarak doku ve çevre dokularda bütünlüğün bozulmasıyla oluşan kanama durdurulmak üzere pıhtılaşma meydana gelir ve hematoma oluşur. İlk aşamada oluşan hematoma içerisindeki trombosit ve kemik iliği kök hücrelerinden sentezlenen büyüme faktörleri ve diğer proteinler osteoprogenitör hücrelerin defekt bölgesine göç etmesini ve osteoblastlar, osteoklastlar ile kondroblastlara farklılaşmalarını sağlayarak kemik rejenerasyon sürecini düzenlemektedir. Ayrıca hematoma, kırık bölgesinin boşluklarını doldurarak kısmen de olsa mekanik olarak stabil kalmasını sağlar. Bu ilk enflamasyon sürecinde olduğu gibi takip eden onarım ve şekillenme süreçlerinde de çeşitli büyüme faktörleri sentezlenerek farklı basamaklarda birçok işlevi kontrol etmektedir. Ayrıca kırık iyileşmesinde

salgılanan biyokimyasal faktörlerin (Tablo 2.2) yanısıra nörolojik mekanizmalardaki değişimler, hormonların dengeli salımı ve mekanik faktörlerin herbirinin rolü ayrı ayrı çok önemlidir (Ghiasi ve diğ.,2017; Tanrıkulu ve Gönen, 2017).

Tablo 2.2. Kemik iyileşmesine etki eden biyokimyasal faktörler (Tanrıkulu S, 2017)

Biyokimyasal Sinyal	Etkileri	Hormon	Etkileri
Bone Morfojenik Proteini (BMP)	Ekstraselüler matriks (ECM) sentezi, MZKH farklılaşması ve hücre göçünü uyarır.	Büyüme hormonu	Pozitif kalsiyum dengesini sağlar.
Transforming Büyüme Faktörü Beta (TGF-B)	ECM oluşumu,damarlanma, kalsifikasyon ve kemik oluşumunu uyarır	Kalsitonin	Osteoklastların çözücü aktivitesini inhibe eder.
Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	MZKH çoğalması, damarlanma ve kırık oluşturmada etkilidir.	Östrojen	Kemik çözünmesini engeller.
Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	Hücrelerin kırık bölgesine göçünü sağlar ve damarlanmayı uyarır.	Kortikosteroidler	Kollajen sentezini inhibe ederek kemik çözünmesini arttırır.
İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2 (IGF 2)	Osteoprojenitör hücre çoğalmasını, ECM sentezini uyarır.	Tiroid	Kemik çözünmesini tetikler.
Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	Damarlanma, osteoblast çoğalması ve farklılaşmasını uyarır.	Paratiroid hormon	Mineral dengesinde rol alarak kemik iyileşmesini tetikler.

Hematom aşamasında bölgedeki makrofajlar patojenleri fagosite eder. Bu sırada bölgede geçici damarlanma oluşur ve fibroblastlar kolajen üretirken osteoklastlar hasara uğramış dokunun uzaklaştırılması için nekrozdan sorumludur. Osteoblast ve kondroblastların hızla çoğalmasıyla yumuşak kallus oluşumu başlar. Daha sonra ortamda meydana gelen mineralizasyon sonucu, hala yeterince dayanıklı olmayan kallus meydana gelir ve bölgede sağlanan mekanik stabilizasyon ile kan damarları yeniden şekillenmeye başlar. Aynı zamanda osteoblastlar osteoid oluşturmaya başlar ve onarım sürecinde meydana gelen non-lamellar kemiğin lamellar kemiğe (trabeküler yahut kortikal) yapılanmasıyla süreç sonlandırılır, yeniden modelleme fazı yıllarca sürebilir (Altunatmaz, 2004).

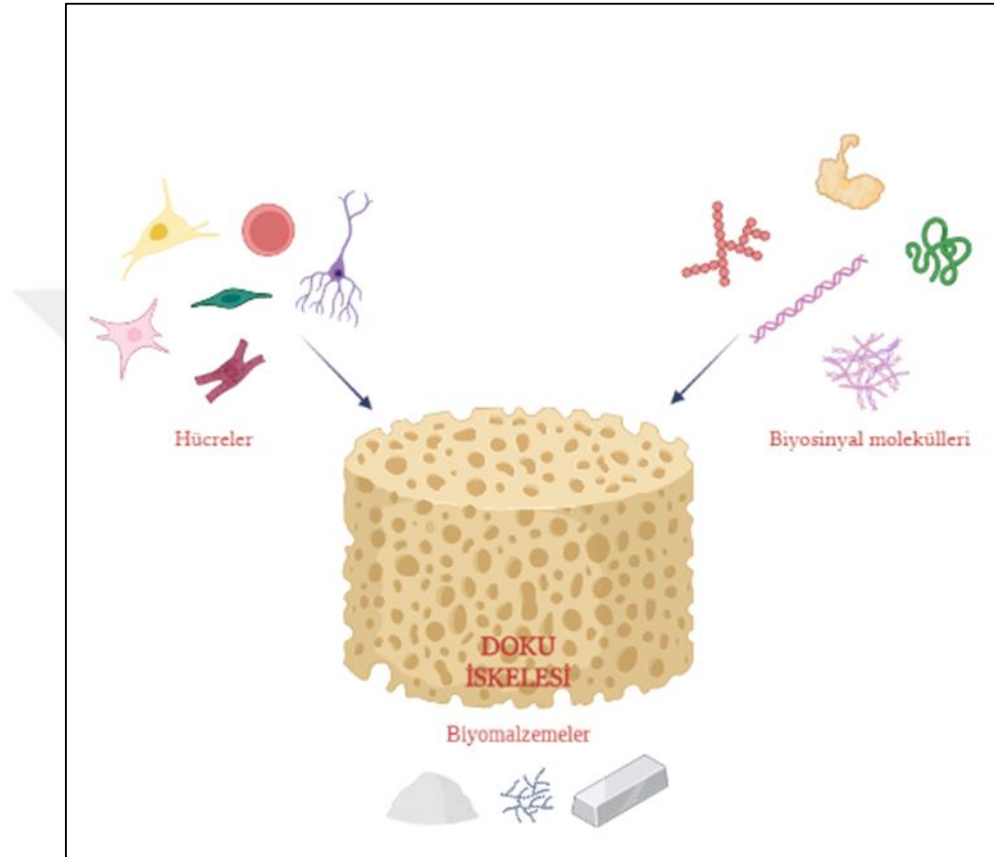
Yeniden modelleme aşamasında kemiğin hizalanmasının baskın mekanik yükleme yönünde oluşu, mekanik uyaranların kemik oluşumu üzerindeki etkisine örnek verilebilir. Son çalışmalar, osteositlerin mekanosensör hücreler olduğunu ve kanaliküler gözenekliliğin buna aracılık ettiğini göstermektedir. Mekanik yük kanaliküllerde sıvı akışını indükleyerek etkinin osteositlerce algılanmasını sağlar. Osteositler ise mekanik etkiye tepki vererek osteoblastlar ile osteoklastların aktivitelerini düzenleyen sinyal moleküllerini üretir ve yeniden modellenme gerçekleşir (Klein- Nulend ve diğ., 2005).

2.2. Doku Mühendisliği

Çeşitli sebeplerle işlevini tam olarak yerine getiremeyen ve hasar almış dokuların tedavisinde geleneksel olarak greftleme yöntemleri kullanılmaktadır. Otogreftleme, hastanın hasarlı dokudan bağımsız bir bölgesinden doku alınıp hasarlı bölgenin tedavi edilmesi; allogreftleme aynı türden başka bir bireyden doku alınarak tedavi gerçekleştirilmesi, ksenogreftleme ise bir türden farklı bir türe doku nakledilmesidir. Bu tedavi yöntemlerinin kullanımı; nakledilen bölgede immün yanıt oluşturma, farklı bireyden gelen greftte hastalık taşıma gibi riskler ile greftin alındığı bölgede yeni yara oluşumu ve sınırlı verici sayısı gibi sebeplerle kısıtlıdır. Bu gibi dezavantajlara bir umut olarak gelişen doku mühendisliğinin tanımı ilk kez 1993 yılında Langer ve Vacanti tarafından ortaya atılmıştır. Doku mühendisliği; mühendislik, tıp ve fen bilimleri prensiplerini harmanlayarak laboratuvar ortamında doku ve organların yerine geçebilecek, işlevlerini iyileştirebilecek, koruyabilecek yahut bunlara destek olabilecek biyolojik olarak uyumlu malzeme veya sistemler geliştirilmesini amaçlar. Son yirmi beş yılda özellikle biyomalzemeler ve hücre kültürü alanlarının gelişmesiyle hızlanarak

çeşitli dokular için üretilen ürünler klinik uygulamaya geçmiştir (Langer ve Vacanti, 1993; Karakeçili ve diğ., 2014; Karakeçili ve Demirtaş, 2015).

Yeni dokuyu oluşturmak için tasarlanan doku mühendisliği ürününü üretirken gerekli olan bileşenler şöyledir (Şekil 2.3):



Şekil 2.3. Doku mühendisliği (Şekil biorender.com kullanılarak oluşturulmuştur)

- 1) Hasarlı bölgeyi doldurmak, bu bölgede yeni doku oluşumu sağlayabilmek için hücreleri barındırabilecek ve ihtiyaç duyacakları mikro-çevreyi sağlayacak doğal biyomalzemeler veya yapay polimerlerden oluşturulan doku iskelesi,
 - 2) İskele üzerindeki veya çevre dokudan gelen hücrelerin iskele üzerinde hedef dokuya farklılaşmasını yönlendiren büyüme faktörleri (biyosinyal molekülleri),
 - 3) Doku oluşumunu hızlandırmak için iskeleye ekilecek hücreler. Otolog (bireyin kendine ait) hücreler özellikle immün yanıt oluşumunu önlemede de büyük rol oynar.
- Hazırlanan yapı direkt olarak yahut *in-vitro* ortamda olgunlaşma sağlandıktan sonra implante edilebilir (Langer ve Vacanti, 1993; Hasırcı ve Hasırcı, 2018).

2.3. Kemik Doku Mühendisliği

Şiddetli travma, konjenital eksiklik, osteoporoz ve tümör rezeksiyonu gibi durumlardan kaynaklanan kritik boyuttaki kırıklar dünya çapında önemli tıbbi zorluklardır. Kemik dokusu kendi kendini iyileştirme potansiyeline sahip olsa da hasar boyutu belli bir sınırı aştığında genellikle cerrahi işlem gerekir. Kemik onarımı için doku mühendisliği, kırığın cerrahi müdahale gerektirdiği durumlarda geleneksel greft tedavilerine bir alternatiftir. Kemik rejenerasyonu için kullanılan bu yaklaşımla, doku donörlerine olan ihtiyacı azaltmanın yanı sıra hasar bölgesine özgü implant üretimi ile ikincil ameliyat ve doku reddi gibi olumsuzluklar da ortadan kaldırılabilir (Manzini ve diğ., 2021).

2.3.1. Kemik Doku Mühendisliğinde Doku İskeleleri

Kemik doku mühendisliği için birçok çeşitte iskele üretilse de, bunların kemik dokuya uygun ve doğru çalışması için bazı gereklilikleri yerine getirmesi gerekir. İskelelerin sahip olması gereken özellikler biyolojik ve yapısal gereklilikler olarak sınıflandırılabilir.

Biyolojik Gereklilikler:

- İskele hücrelerin tutunması, çoğalması, farklılaşması ve yeni matriks üretmesi için uygun olmalıdır.
- Ortamda bir komplikasyon oluşmaması ve doku bütünlüğünün korunabilmesi için immün reaksiyona yol açmamalıdır.
- Biyobozunur olmalı, çünkü doku oluşumunun yapı iskelesinin bozulmasıyla eşzamanlı olarak gerçekleşmesi doğal dokunun implantın yerini almasına önayak olacaktır. Bozunma sürecinde ortaya çıkan bileşikler toksik olmamalı ve sorunsuzca metabolize edilebilmelidir.
- Biyoaktif olmalı, çevre dokuyla etkileşime girerek iskelede hücre göçünü ve osteogenezisi indüklemelidir. Örneğin doğal kemik rejenerasyonu sürecini düzenleyen ve kolaylaştıran kemik morfogenetik proteinleri (BMP) gibi büyüme faktörleri ve fosfat iyonları salımını sağlayan kalsiyum fosfat bazlı bileşikler içermesi, konakta bulunan kök hücrelere ek olarak implanttan gelen kök hücrelerin de farklılaşmasına yardımcı olarak doku yenilenmesini hızlandırır (Motamedian ve diğ., 2016 ; Tariverdian ve diğ.,2019).

Yapısal Gereklilikler:

-Kemik iskelelerinin yapımında mekanik mukavemet benzerliğinin hedeflenmesi çok önemlidir; hem iyileşme sürecinde çevre dokuya mekanik destek sağlanması, hem de kemik üretiminde osteositlerin mekanik etkiye tepki yoluyla hücre aktivitelerini düzenleyişinde etkili olacaktır.

-Hücre tutunması, göçü, dokuda damarlanma, besin difüzyonu ve atık uzaklaştırılması için yüksek oranda birbirine bağlı gözeneklerden oluşmalıdır.

-İskele şekli ve boyutu hasarlı bölgeye uygun mikromimaride üretilmelidir.

-Çevre dokular ve hücrelerle doğrudan temas halinde olması sebebiyle iskele yüzey topografisi de iskelelerin en önemli özelliklerinden biridir (Tariverdian ve diğ.,2019).

Biyolojik gerekliliklerin de yapısal gerekliliklerin de en doğru şekilde sağlanabilmesi için hasarlı bölgeye uygun biyomalzeme ve iskele üretim tekniğinin seçilmesi önemlidir.

2.3.1.1. Kemik Doku İskelesi Üretiminde Kullanılan Malzemeler

Biyomalzeme, bir organın eksikliğini gidermek veya işlevine destek olmak için vücuda implante edilen yahut vücutla etkileşim halinde olan, yapay olarak üretilebilen veya doğal yollarla elde edilebilen, ilgili bölgeyle oldukça iyi uyum sağlayabilecek şekilde tasarlanmış, dokuya uygun biyoaktiviteye sahip ve amacını yerine getirmek için yeterince kararlı malzemelerdir (Hasırcı ve Hasırcı, 2018). Temelde kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler polimer, seramik, kompozit ve metaller olarak sınıflandırılabilir.

Bir malzemenin tercihinde biyolojik ortamda bozunması, elektrik iletkenliği, termal özellikler, kimyasal özelliklerine bağlı olarak dokuyla etkileşimi ve mekanik özellikleri hasarlı bölgeye özgü olarak değerlendirilir. Malzemenin bozunma özelliğinin dokunun iyileşme sürecine uyum sağlaması açısından; termal özellikler işleme, şekillendirme, sterilizasyon aşamalarında malzemenin stabilizasyonu için önemliyken, elektrik iletkenliği elektrikle hücresel aktivitelerin stimüle edilebileceği bölgelerde malzemenin tercih edilmesinde etken olacaktır (Hasırcı ve Hasırcı, 2018).

Tablo 2.2. Biyomalzemeler ile avantajları ve dezavantajları

Biyomalzeme türü		Avantajları	Dezavantajları
Doğal polimerler	Kolajen	Biyouyumlu ve biyobozunur, doğal dokuda da mevcut.	Düşük mekanik kararlılığa sahiptir.
	Jelatin	Kolayca jelleşir, yüksek oranda biyouyumlu kolajen türevidir.	Zayıf mekanik özellik gösterir.
	Kitosan	Hücre tutunmasını ve göçünü destekler ve toksik değildir.	Mekanik kararlılığını artırmak için biyoseramik gibi dolgu maddeleri gerekir.
	Aljinat	Yüksek saflıkta, farklı moleküler ağırlıklarda bulunabilir, biyolojik olarak parçalanabilir.	Isıtma veya radyasyon yoluyla sterilizasyon sonucu bozulabilir.
Sentetik polimerler	PLA, PGA	FDA onaylı biyomalzemelerdir, kolayca yönetilebilir mekanik ve yapısal özelliklere sahiptirler.	İskele bozunması asidik bir ortama yol açabilir. Hücre tutunması düşüktür. İşlenebilirliği sınıtlı olabilir.
	PCL, PEEK	Mekanik dayanımları iyi ve malzemenin temini kolaydır.	Biyobozunurluğu düşük ve hidrofilitesi azdır.
Biyoseramikler	Beta-trikalsiyum fosfat	MZKH'lerin farklılaşmasını destekler.	Yavaş bozunma gösterir.
	Hidroksiapatit	Doğal kemiğin önemli bir bileşeni, yüksek osteokondüktivite ve biyoaktivite gösterir.	Hidrofobik olması sebebiyle düşük hücre tutunması gösterir.
	Biyoaktif cam (kalsiyum ve fosfat içeren silika cam)	Kemik oluşum sürecini hızlandırır, kemik benzeri apatit tabakasının oluşumuna yardımcı olur.	Kırılgandır. Düşük mukavemet ve yüksek kırılganlık
Metalik iskeleler	Titanyum, tantal veya diğer metal alaşımları	Korozyona karşı dirençlidirler, önemli mekanik dayanıma sahiptirler.	Biyoinerttirler ve yüksek sertlikleri stres koruması gibi sorunlara yol açabilir.

Tablo 2.3'te sıklıkla kullanılan biyomalzemeler avantajları ve dezavantajlarıyla birlikte verilmiştir.

Kovalent bağlarla birbirine bağlanmış tekrarlayan ünitelerden meydana gelen yüksek moleküler ağırlıklı uzun moleküller olan polimerler doğal (kolajen, kitosan, hyaluronik asit, deselülerize doku gibi) ve yapay (Polilaktik asit, Polikaprolakton, Poliglikolik asit vb) olmak üzere iki çeşitte incelenebilir. Doğal polimerler hücre çoğalması ve doku oluşumunda indükleyiciliği ile ön plana çıkarken yapay polimerler özellikle mekanik mukavemeti ve işlenebilme kolaylığıyla tercih edilmektedir (Hasırcı ve diğ., 2022).

Geçmişte, polilaktik asit (PLA) gibi laktik ve glikolik asitlere dayanan polimerler, insan vücudunda ester omurgasının basit hidrolizi ile parçalanırken zararsız ve toksik olmayan bileşikler ürettiği için çok dikkat çekmiştir. Bozunma ürünleri biyokimyasal olarak karbondioksit ve suya ayrılır ve böbrekler tarafından atılımı sağlanır (Davashi ve Kaffashi, 2015). Fiksasyon uygulamaları için de uygun bir alternatif olan PLA, insan vücuduna yerleştirildiğinde kemiklerde olumsuz yanıtlara yol açmadığından metalik implantlara kıyasla oldukça avantajlıdır. Ayrıca, implantı çıkarmak yahut yenilemek için ikinci bir ameliyata ihtiyaçları yoktur, bu nedenle hem tıbbi maliyet düşer hem de iyileşme esnasında bozulan polimer yerini doğal dokuya bırakır (Dearnaley ve diğ., 2007).

Polilaktik asitin yüksek mekanik özellikleri, kolay işlenebilirliği ile *in vitro* ve *in vivo* biyouyumluluğu nedeniyle kemik doku mühendisliğinde kullanımı araştırılmakla birlikte kırılgenlik, düşük hidrofilisite ve biyolojik bozunma oranları biyolojik uygulamasını sınırlamaktadır (Saiga ve diğ. 2015; ; Shi ve diğ, 2015), Kemik doku mühendisliğinde PLA iskelelerinin zayıf özelliklerini geliştirmek için katkı maddeleri ekleme, kaplama, diğer polimerlerle karışım oluşturarak yahut biyocam ve hidroksiapatit gibi seramiklerle kompozit halinde kullanımı literatürde araştırılmış ve umut verici bulunmaktadır (Rusias ve diğ., 2006 ; Mohammadi ve diğ, 2014; Davashi ve Kaffashi, 2015).

Alifatik bir polyester olan Poligliserolsebakat (PGS), doku mühendisliğinde birçok dokuda yenileyici bir potansiyele sahip olması sebebiyle son yıllarda biyomedikal uygulamalarda oldukça ilgi çekici bir polimer olarak görülmektedir (Frydrych ve diğ., 2015; Piszko ve diğ., 2021). Termoset bir polimer olan PGS'in fizikokimyasal özellikleri çapraz bağlama ve kopolimerizasyon gibi kimyasal ve post-sentetik modifikasyonlar dahil birçok şekilde yönetilebilmektedir. Biyouyumluluk, elastikiyet ve şekil hafızasıyla öne çıkan bir polimer olmakla birlikte bozunma süresinin tahmin edilebilirliğiyle de doku

mühendisliğinde tercihi söz konusudur. Kırılgan polimer ya da seramik malzemelere az miktarda katılarak elastikiyeti ile malzeme sağlamlığını geliştirmek üzerine kemik doku mühendisliği çalışmaları artarak devam etmektedir (Zong-Yan ve diğ., 2009; Shi ve diğ., 2015; Wang ve diğ., 2019).

Seramikler, insanlık tarihindeki en eski malzemelerden kabul edilir. Biyoseramikler ise 18. yüzyılın sonlarından beri ilk olarak diş hekimliği uygulamalarıyla kullanılmaya başlanmıştır. Doku mühendisliğinde diğer malzemelere kıyasla antimikrobiyal etkiye sahip olmaları ve sıcaklık ve pH gibi fiziksel değişimlere dayanıklı olmaları ile ön plandadırlar. Kendi hallerinde inert oldukları için vücutta yabancı cisim yanıtı oluşturmaz ve biyouyumludurlar. Özellikle kemiğin mineral fazıyla benzerliklerinden dolayı onarımı indükleyebileceğinden sert doku tedavisinde sıklıkla tercih edilmektedirler. 20. yüzyıldan itibaren kemik defektlerinde kalsiyum fosfat; kalça eklemlerinde alümina ve zirkonya seramikleri ve kompozitleri kullanımdadır. Biyoaktif ve biyoinert olarak sınıflandırılan seramiklerin seçimi tüm biyomalzemelerde olduğu gibi malzeme-doku etkileşimine uygunluğuna göre bölgeye özgü yapılır. Biyoaktif seramikler çevre dokuyla etkileşirken biyoinert seramikler herhangi bir etkileşim göstermez, bu durum sert doku uygulamalarında yumuşak doku oluşumuna sebep olabileceği için inert seramiklerin biyoaktif malzemelerle kaplanıp kullanımı da tercih edilmektedir. İnert seramiklere örnek olarak kalça protezlerinde kullanılan zirkonya, alümina ve yapay kalp kapakçıklarında kullanılmış olan karbonlu malzemeler verilebilir. Biyoaktif cam, kalsiyum fosfat ve hidroksiapatit seramikleri ise biyoaktif seramiklerdendir (Yang ve diğ., 2011).

İnorganik kemik matriksinin yaklaşık %90'ını oluşturan hidroksiapatit seramiği, biyouyumluluğunun yanında implante edildiği doku ile kimyasal olarak bağlanma sağlayabilmekte, yavaş bozunmakta ve kemik farklılaşmasını da desteklemektedir. Ortopedide doğrudan kullanımı geçmişten beri yaygın olmakla birlikte literatürde kemik dokuya implantasyonunda dokuya tam entegrasyonu ile sonuçlanan çalışmalar olduğu da bildirilmektedir (Heise ve diğ., 1990; Woodard ve diğ., 2006; Zhou ve Lee 2011). Son zamanlarda kontrollü ilaç salımı ve kemik doku mühendisliği uygulamalarında sıkça kullanılan hidroksiapatit yumuşak doku uygulamalarında da olumlu sonuçlar göstermekle birlikte özellikle kemik onarımında, sert doku implant kaplamasında ve sert doku dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. İyi osteokondüktif özelliklerine rağmen işleme zorluğu

ve kırılabilirliği sebebiyle kemik doku mühendisliğinde tek başına kullanımı sınırlıdır (Ginebra ve diğ., 2006; Johnson ve Herschler, 2011).

Kompozit malzemeler, iki veya daha fazla farklı bileşen malzeme veya faz içeren malzemelerdir. Kompozit malzemeler genellikle iki bileşenin de olumlu yönlerini ön plana çıkararak biyouyumluluk, biyobozunurluk, mukavemet vb. gibi kontrol edilebilir mekanik özellikler sergiler. Kemik doku mühendisliğinde seramik/polimer kompozitlerin kullanımı kemiğin doğal bir kompozit oluşundan dolayı yaygındır. Şu ana dek tek bir malzemenin kemik doku mühendisliğine uygunluğunun kanıtlanamaması kompozit malzemeleri bu alanda umut verici bir konuma taşımıştır (Sultana, 2013).

Kemik gibi kompozit bir malzeme üretmek için, karıştırılarak yahut kaplama gibi yaklaşımlarla kemik doku mühendisliği için polimer/seramik kompozit iskeleler üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Böylece polimer bazlı iskelerle biyobozunmanın takibi, mekanik özelliklerin nispeten yönetilebilir olması, işlenebilirlik kolaylığı ile HAP malzemenin osteoindüktif ve biyomimetik özellikleri birleştirilerek kemikte kullanılmak üzere en uygun iskelenin üretiminin önü açılmıştır (Wei ve Ma, 2003; Russias ve diğ. 2006, Zhou ve Lee 2011).

Metalik biyomalzemeler, antibakteriyel özellikleri, kırılma tokluğu ve mukavemetleri gibi avantajları ile özellikle ortopedi ve ortodontide tercih edilmektedir. Özellikle deformasyon riski düşük olan ve yük taşıyan dokularda tercih edilmektedir. Genellikle korozyon direncinin artırılmasıyla paslanmaz çelik, hafifliği ve inertliğiyle titanyumun kullanımı yaygındır. Kemik doku mühendisliğinde büyüme faktörü yüklü titanyum iskeleler, polimer kaplı demir ve magnezyum bazlı alaşımların kullanımı çalışılmıştır. Kemik yapısında doğal olarak bulunan, biyobozunur, yoğunluk ve mekanik dayanımıyla kemiğe yakın olan magnezyum bazlı malzemelerin korozyonu ile oluşan kalsiyum fosfat tabakasının kemik oluşumunu indükleyici olduğu da bilinmektedir. Tüm avantajlarının yanında metaller alaşım halinde çalışılsa dahi korozif olduğundan bozunma ürünlerinin vücutta toksik ve alerjik etkilere yol açtığı bilinmektedir (Hasırcı ve Hasırcı, 2018). Son çalışmalar, metalik biyomalzemeleri korozyon direncinin artırılması, biyoaktivitenin düzenlenmesi ve yüzey modifikasyonları gibi iyileştirmelerle gelecekte daha kullanışlı hale getirmeye odaklanmıştır (Chowdhury ve diğ., 2021).

2.3.1.2. Kemik Doku İskelesi Üretim Yöntemleri

Kemik dokuya yönelik iskele üretim metodu seçiminde özellikle mekanik mukavemeti ve biyouyumluluğu ile tercih edilen malzemenin özelliklerine zarar vermeyecek yahut iyileştirecek metot tercih edilmelidir. Ayrıca hasara uygun büyüklükte iskele üretiminin sağlanabileceği yöntemin seçimi önemlidir. Tablo 2.4'te iskele üretim teknikleri avantajları ve dezavantajlarıyla birlikte sunulmuştur.

Çözücülü döküm ve partikül uzaklaştırma yöntemi iki basamaklı olarak uygulanır. Organik çözücüde çözülmüş polimer solüsyonuna bu çözücünden etkilenmeyen fakat suda çözülebilen tuz, şeker, jelatin gibi porojen maddeler eklenerek bir çözelti karışımı oluşturulur. Ardından bu çözelti bir kalıba dökülür ve çözücünün uçması sağlanır. Kalıbın şeklini alan polimer karışımı çözücünün uçmasıyla üç boyutlu halde kalır. Ardından suda bekletilerek porojenler uzaklaştırılır ve porojenlerin olduğu yerlerde oluşan gözenekler ile gözenekli iskele yapısı elde edilmiş olur. Bu yöntemde iskelenin gözenekliliği, gözenek boyutu ve birbirleriyle bağlantıları, seçilen porojen ve eklenen porojenin konsantrasyonu ve çözelti homojenizasyonu ile yönetilebilir (Eltom ve diğ., 2019; Chocholata ve diğ, 2019).

Liyofilizasyon (Dondur-uçur) metodu, çözücülü döküm yöntemi gibi polimer çözeltisinin kalıba aktarılması ardından çözücüyü uçurmak için çözeltinin dondurulup liyofilizatör cihazı ile uçurulmasına dayanır. Liyofilizasyon işlemiyle üretilen iskelelerde gözenek çapı ve miktarının yönetilmesi zordur.

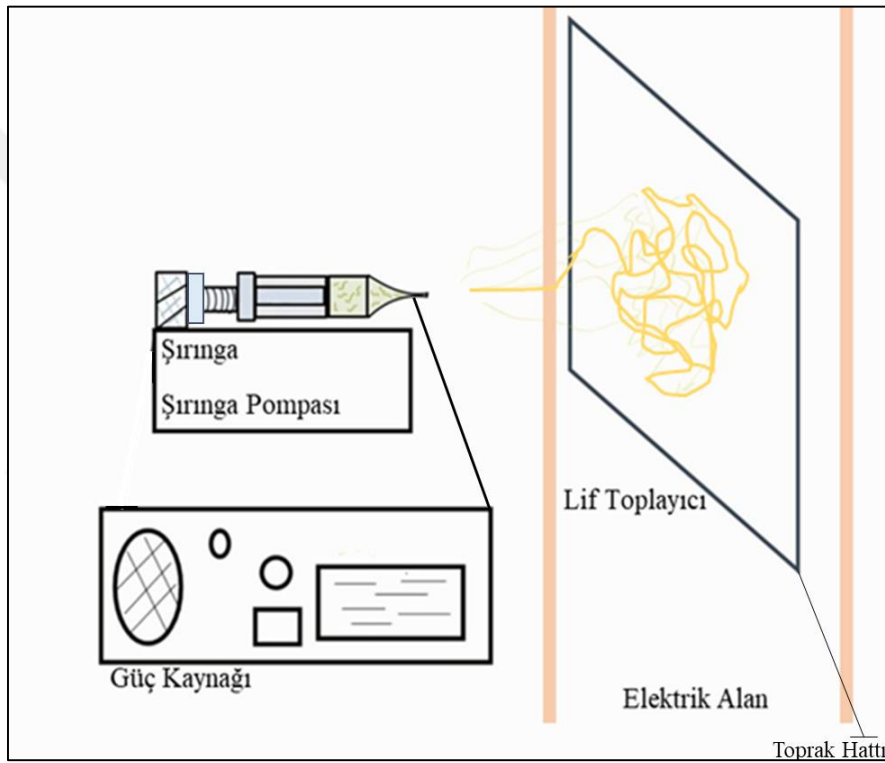
Gaz köpürtme tekniği, katı haldeki polimer matrisi uzun bir süre yüksek basınç altında CO₂ ve N₂ gibi gazlara maruz bırakılarak gaz genleşmesi yoluyla yapıda gözenekler oluşturulması prensibine dayanır. Solvent ve porojen kullanılmadığı için sitotoksik yanıt riski minimumda olmasına karşın heterojen gözeneklilik ve gözenek bağlantılarının yönetilememesi gibi olumsuz özellikleri de söz konusudur. Kullanılan gazda düşük de olsa çözünürlüğü olan polimerler için etanol veya seyreltilmiş asit gibi yardımcı çözücüler olmaksızın bu tekniğin kullanımı mümkün değildir (Eltom ve diğ., 2019; Chocholata ve diğ, 2019).

Tablo 2.3. İskele üretim teknikleri ile avantajları ve dezavantajları (Eltom ve diğ, 2019)

ÜRETİM TEKNİKLERİ	AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI		
Geleneksel Yöntemler	Solvent dökümü ve partikül uzaklaştırma	İnce çeperli numunelere uygundur. Yüksek gözeneklilik (%50–90) gösterir. Malzeme kaybı fazla olabilir.	İnce iskelelerde verimlidir. Genellikle toksik çözücüler kullanılır.	
	Gaz köpürtme	%85'e kadar gözeneklilik	Kapalı gözenekler ve iskele dışında bir polimer kabuk olabilir	
	Elektroeğirme	Nanolifli yapı iskeleleri geliştirmek için uygundur. Yüksek çekme mukavemetli lifler elde edilir.	Toksik çözücüler kullanılır. Büyük üç boyutlu yapı elde edilmesi zordur. Birçok değişkenin optimizasyonu gereklidir.	
	Isıl olarak indüklenmiş faz ayrımı yöntemi	Termoplastik kristalize polimerlerde kullanılabilir. Biyoaktif moleküllerin entegrasyonu için düşük sıcaklık kullanılabilir. Liflerin gözenekliliği %98'den fazladır, yüksek yüzey-hacim oranı elde edilir.	Sadece termoplastikler için uygundur.	
	Hızlı Prototipleme	Stereolitografi (SLA)	Yüksek çözünürlükte üretim yapılabilir. Gözenek boyutu ve yoğunluğu kontrol edilebilir.	Fotopolimerizasyon sürecinde sınırlamalar vardır. Fotopolimerizasyon sonrası tamamlayıcı işlemlere de gerek duyulabilir. Çok miktarda malzeme gerekir.
		Seçici lazer sinterleme (SLS)	İskelenin mikro yapısında mükemmel kontrol sağlar.	Yüksek çalışma sıcaklığı gerektirir. Malzeme sayısı sınırlıdır.
		Eriyik yığınlayarak modelleme (FDM)	Düşük sıcaklıkta ve büyük parçalar üzerine çalışılabilir.	Biyobozunur polimerlere uygulanmasında sınırlamaları vardır.

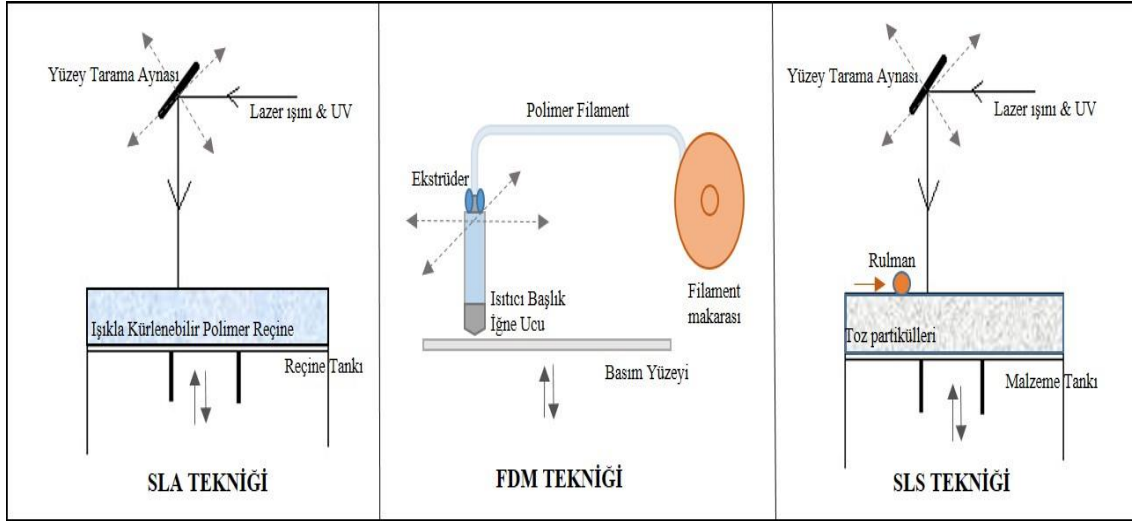
Isıl olarak İndüklenmiş Faz Ayrımı Yönteminde (TIPS), polimer çözücüsünde yüksek sıcaklıkta homojen olarak çözündükten sonra çözelti donma noktasının altına soğutulur. Tamamen donan çözeltide sublimleşme yoluyla çözücü uzaklaştırır. Polimerce fakir bölgeler yapı içinde gözenek oluşumunu sağlar. Kullanılan malzeme çeşidi sınırlıdır.

Elektroegirme yöntemi, elektrik alan kullanılarak polimer eriyiği yahut çözeltilisinden nanolifler üretmeyi amaçlar. Şekil 2.4'te görülebileceği üzere temelde şırınga pompası, güç kaynağı, metalik iğne ve topraklanmış bir toplayıcıdan meydana gelen sistemde, elektrik alan uygulanan polimer molekülleri iyonik yüklenirken toplayıcı ve iğne arasındaki potansiyel farkla malzeme uzayarak fiberler halinde topraklanmış olan toplayıcıda birikmeye başlar. Lif kalınlığı ve gözeneklilik; polimer moleküler ağırlığı, konsantrasyonu ve uygulanan elektrik alanın kontrolü ile ayarlanabilir (Collins ve diğ, 2021).



Şekil 2.4. Elektroegirme düzeneği

Hasarlı bölgenin implant ve yapay doku gibi uygulamalarla tedavi sürecinde, bölgede söz konusu olan implant-doku etkileşimi ile doku oluşumu esnasında; hem hücre göçü desteklenerek tedavi sürecinin hızlanması hem de dokuya mekanik destek sağlanabilmesi için malzeme ile çevresi arasında tam fiziksel uyum olması önemlidir. Hızlı prototipleme olarak da adlandırılan üç boyutlu basım yöntemleri (Şekil 2.5) ile destek malzemenin birebir hasarlı bölge geometrisine uygun ve söz konusu doku gelişimini destekleyecek gözeneklilikte üretilmesi mümkündür (Hasırcı ve diğ., 2022).



Şekil 2.5. Üç boyutlu basım yöntemleri

Fotopolimerizasyon temelli çalışan stereolitografi (SLA) yönteminde UV ışığı veya lazer, bir tankın içindeki fotokürlenilebilir malzeme solüsyonu içinde tasarlanan desen üzerinde yönlendirilerek istenilen yerlerde ışınla kürlleme yoluyla polimerizasyon sağlanarak katmanlar oluşturulur. Tank her katman sonunda bir adım geri çekilir ve diğer katman için aynı işlem tekrarlanır. Bu teknikle çok yüksek hassasiyetle üretim sağlanabilmesine karşın yüksek ultraviyole radyasyon kaynaklı sitotoksik etki riski ve uygun malzemenin azlığıyla doku mühendisliğinde kullanımı sınırlıdır (Bishop ve diğ., 2017; Rey ve St-Pierre 2019).

1980lerin sonlarında geliştirilen Eriyik Yığınlayarak Modelleme (FDM) teknolojisi termoplastik bir malzemenin eritilerek uygun bir basınçla tasarlanan iskele şeklinin geometrisine özel olarak seçilmiş bir iğne ucundan ekstrüde edilmesine dayanır. Ekstrüzyon esnasında oluşan iplikçiklerin bir düzlem üzerinde şekle uygun olarak biriktirilmesiyle üretim gerçekleştirilir. İplikçikler arası uzaklıklar, iplikçiklerin kalınlıkları ve biriktirilen malzeme miktarı dokuya özgü olarak ayarlanabilir. PLA, PCL PLGA ve PS gibi biyouyumlu termoplastik polimerlerin kullanımında bu yöntem sıklıkla tercih edilmektedir (Top ve Gökçe, 2020).

Seçici Lazer Sinterleme (SLS) yönteminde karbondioksit lazer ışınları kullanılır. Lazer ışınları ile toz haldeki polimerik malzeme yüzeyi verilen tasarıma uygun olarak taranarak tozla ışının etkileştiği yerde malzeme sıcaklığının erime noktasına yükseltilip moleküllerin kaynaşması sağlanır ve katman meydana gelir. Her katmanda eski katmanın

üstü yeni bir toz kütlesiyle kaplanıp bir rulman aracılığıyla düzgünce çökertildikten sonra lazer taraması tekrarlanır. Bu teknik metal ve seramik malzemelerde de rahatlıkla kullanılabilir. Hidroksiapatit-polimer kompozitler için oldukça kullanışlı olduğu literatürde bildirilmektedir (Tan ve diğ., 2003).

2.3.2. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücreler

Kemik doku mühendisliğinin ilk aşamalarında, osteoblastlar, kemik rejenerasyonu kavramını kanıtlamak için kullanılırken son çalışmalarda çoğunlukla materyal/malzeme ve/veya materyal/büyüme faktörü kombinasyonlarının *in-vitro* kemik oluşumunu indüklemeye yeteneğini değerlendirmek için kullanılmıştır. Osteoblastlar ekstrasellüler matriks oluşturmalarıyla ön plana çıksa da çoğalmalarının sınırlı oluşu kemik hasarı tedavisinde kullanımını sınırlar (Kinard ve diğ., 2015).

Vücutta birçok farklı dokudan elde edilebilen Mezenkimal Kök Hücreler (MKH), özel kültür koşullarında birden çok hücre tipine farklılaşabilmeleri sebebiyle en yaygın olarak araştırılan hücre tipidir (Can, 2014). Tarihsel süreçte ilk keşfedilen kök hücre çeşidi olan kemik iliği kök hücrelerinin kemik doku mühendisliğinde kullanımı çokça çalışılmıştır. Bu hücrelerin osteoblasta farklılaşma yetenekleri yüksek olsa da dokudan izolasyonunun zorluğunun yanında diğer kök hücre türlerine göre sayıca az elde edilmeleri ve yağ doku kökenli mezenkimal kök hücrelerle benzer farklılaşma dinamikleri göstermeleri gibi sebeplerle adipoz kök hücrelerin kullanımı daha çok tercih edilebilmektedir (Gündeşlioğlu ve diğ., 2013, Oryan ve diğ., 2017). Vücutta çok fazla bölgede bulunan yağ dokusundan hücre izolasyonu diğer dokulara nispeten daha kolay olmakla birlikte donor bölgede de daha az yaralanmayla sonuçlanır. Yağ doku kökenli kök hücrelerin çoğalma kabiliyetlerinin de kemik iliği kökenli kök hücrelerden iyi olduğu literatürde bildirilmektedir (Guerado ve Caso, 2017).

Göbek bağının iç bağ dokusu olan Wharton Jeli'nden izole edilen kök hücreler de osteojenik farklılaşma için uyarıldığında çeşitli osteoblastik davranışlar sergiler. İlkel hücreler olduklarından farklılaşma kapasiteleri yüksektir ve *in vivo* uygulamalarda immün yanıt oluşturma riskinin de çok düşük oluşuyla kemik doku mühendisliğinde kullanımı tercih edilmektedir (Zhao ve diğ., 2010; Karadaş ve diğ., 2012). Bu kök hücre

türünün de osteojenik farklılaşma kapasitesi yağ doku kökenli hücrelerden düşüktür (Christodoulou, 2013).

Embriyonik kök hücreler (EKH), bütün hücelere farklılaşabilme yeteneğine sahip olsa da kullanımında söz konusu etik tartışmaların yanı sıra, uygulandığı bölgede teratom oluşturma eğilimi sebebiyle çok tercih edilmemektedir (Kinard ve diğ., 2015; Çerçi ve Erdost, 2019).

Tüm bunların yanında, somatik hücelere viral ve viral olmayan yöntemlerle gen aktarılması ve hücre programlanması sonucu gen transkripsiyonunun değiştirilmesi yoluyla üretilen İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler, tüm hücre türlerine farklılaşabilmektedir (Takakashi ve Yamanaka, 2006; Okita ve diğ., 2008; Can, 2014). Ayrıca bu hücre türünden farklılaştırılarak oluşturulan osteoblast ve mezenkimal kök hücreler de kemik doku mühendisliğinde kullanılmaktadır (Jeon ve diğ., 2016; Jungbluth ve diğ., 2019).

2.3.3. Kemik Doku Mühendisliğinde Biyosinyal Molekülleri

Kemik oluşumu ve gelişimi, çok çeşitli sinyal moleküllerinin hücrelerin eylemlerini ve mikroçevresini yönlendirmesiyle meydana gelir. Hücrelerin çoğalmasını indükleyebilen, metabolizmanın yanıtlarını etkileyebilen bu sinyal faktörlerinin düzenlenmesi, hücre şeklini, çoğalmasını, göçünü, farklılaşmayı ve apoptozu düzenler. Büyüme faktörlerinin etkileri konsantrasyonuna bağlıdır ve hücre yüzeyindeki reseptörler aracılığıyla algılanır. Doku mühendisliği uygulamaları için de, hasarlı bölgeye özgü gelişimi için bir büyüme faktörünün konsantrasyonu ve salımını kontrol etmek çok önemli olduğundan bunların kontrolü için kontrollü salım ve enkapsülasyon gibi teknikler çalışılmaktadır. (Celil ve diğ., 2007)

Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyosinyal molekülleri, zarara uğrayan kemik dokunun iyileşmesinde rol oynayan moleküllerdir. Bunlara bölüm 2.1.3'te ve Tablo 2.2'de ayrıca değinilmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. Poligliserolsebakat (PGS) Prepolimerinin Sentezlenmesi

Tez çalışmasında kullanılan poligliserolsebakat (PGS) prepolimerinin sentezi için Aydın ve diğ. (2013) kullandığı yöntem değiştirilerek uygulandı:

Tablo 3.1’de görüldüğü üzere farklı mol oranlarında Sebasik asit (Aldrich, 202,25 gram/mol) ve gliserol (Merck, 92,1 gram/mol) bileşenleri beherde karıştırılıp 5 dakika boyunca (1 dakika eritme üzerine 2 dakika karıştırma ve 2 dakika prepolimerleşme) 700 Watt mikrodalga ışınına maruz bırakılarak prepolimerizasyonun gerçekleşmesi sağlandı.

Tablo 3.1. Prepolimer karışımı monomer oranları

Karışım(mol/mol oranı)	Sebasik Asit (mol)	Gliserol (mol)
1:1	0,02	0,02
1:1,5	0,02	0,03
1:2	0,02	0,04

150°C’de vakum altında 6, 8 ve 10 saat çapraz bağlanma gerçekleştirilerek polimerleşme özelliği test edilmiştir.

3.2. PGS Prepolimerinin Karakterizasyonu

3.2.1. PGS Prepolimerinin FTIR Analizi

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometre (FTIR), kızılötesi alandaki ışınların molekül üzerine gönderilmesiyle molekülün titreşim ve dönme hareketlerinin etkilendiği belli enerji frekanslarını absorbe etmesi üzerine oluşan sinyallerin dedektörle toplanıp ölçülmesiyle oluşan piklerin yorumlanmasına dayanan bir spektroskopik ölçüm yöntemidir (Mohamadi ve diğ., 2017).

Farklı monomer oranlarında üretilen prepolimerlerin yapısındaki bağların tanımlaması için kızılötesi spektrofotometrik analizi Acıbadem Üniversitesi Biyomalzeme Merkezi'ndeki Perkin Elmer Spectrum IR cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. PGS Prepolimerlerinin NMR Analizi

Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR), kuvvetli manyetik alan içerisine yerleştirilen bir moleküldeki farklı manyetik özelliklere sahip atom çekirdeklerinin belli frekanslarda rezonansa girmesi ve bu sinyallerin ölçülmesi sonucu ortaya çıkan piklerin hangi frekanslara denk geldiğinin bir spektrum üzerinde belirtilmesiyle molekül iskeletinin belirlenmesine dayanan bir spektroskopik ölçüm yöntemidir (Simpson ve diğ., 2012). Gliserol ve sebasik asitin hangi oranlarda tepkimeye girdiğini ve tepkimenin gerçekleşmiş olduğunu kanıtlamak için bu yöntem tercih edilmiştir.

Numunelerin Nükleer Manyetik Rezonans ^1H proton spektrumu analizi ODTÜ Merkez Laboratuvarı'ndaki Bruker Avance cihazı ile hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. GPC ile PGS Prepolimerinin Moleküler Ağırlık Tayini

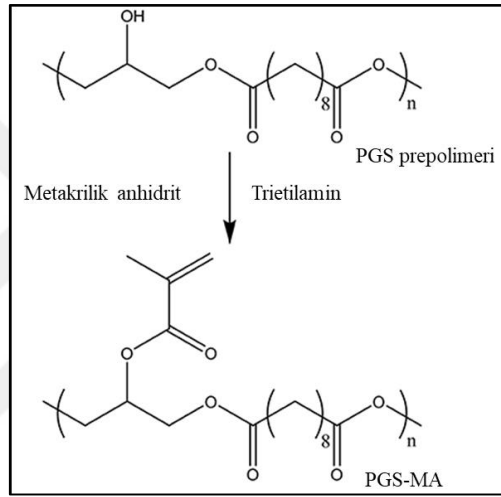
FTIR analizi ile uygunluğuna karar verilen numunenin moleküler ağırlığını belirlemek için Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (GPC) analizi ODTÜ Merkez Laboratuvarı'ndaki Malvern Omnisec cihazı ile hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Numune spektroskopik saflıktaki tetrahidrofolik asitte (THF) çözülüp manyetik karıştırıcıda 16 saat karıştırılıp 0,2 μm 'lik filtreden süzülüp çalışılmıştır.

3.3. PGS Prepolimerinin Metakrilatlanması

Metakrilat gruplarında bulunan çift bağların çok reaktif olması bu grubu içeren moleküllerde polimerleşme sürecini kolaylaştırır, özellikle dış dolgularında ve kemik çimentosu uygulamalarında metakrile malzemelerin kullanımı yaygındır (Stickler ve Rhein, 2012). Bu çalışmada kullanılacak PGS oranının çok düşük olması sebebiyle PGS prepolimerini daha reaktif hale getirebilmek ve polimerleşmesine katkıda bulunmak için molekül metakrilatlanarak kullanılmıştır.

Tez çalışmalarında kullanılan metakrile PGS prepolimerinin sentezi için Tala ve diğ. (2018) kullandığı yöntem uygulandı:

PGS prepolimerini metakrilatlama reaksiyonu 0°C’de gerçekleştirildi. 1 gr PGS 4 ml diklorometanda (Sigma-Aldrich) çözüldü. Bir mol PGS’e 0,8 mol Metakrilik anhidrit (Aldrich) ve 0,8 mol Trietilamin (Sigma Aldrich) eklendi. 1 mg 4-metoksifenol (Aldrich) 1 gr PGS’e eklendi ve 24 saat manyetik karıştırıcıda, buz dolu hazne içinde karıştırıldı. 24 saat sonunda aynı hacimde 30 mM hidroklorik asit (Isolab) ile yıkandı ve kalsiyum klorür granülü (Sigma) ile kurutuldu. Kurutma işlemi ardından Rotary Evaporator (BUCHI, Rovaporator R-100) ile çözücü uzaklaştırılıp metakrile poliglisero-sebakat prepolimeri (PGS-MA) elde edildi. Metakrile prepolimer -80°C dondurucuda muhafaza edildi.



Şekil 3.1. Poli(glisero-sebakat)'ın metakrilatlanması (Pashneh-Tala ve diğ., 2018)

3.4. PGS-MA Prepolimerinin Karakterizasyonu

3.4.1. PGS-MA Prepolimerinin FTIR Analizi

Metakrilatlama işlemi sonrası metakrilat grubunun tanımlanması için kızılötesi spektrofotometrik analizi Acıbadem Üniversitesi Biyomalzeme Merkezi'ndeki Perkin Elmer Spectrum IR cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. PGS-MA Prepolimerinin NMR Analizi

Numunelerin Nükleer Manyetik Rezonans ¹H proton spektrumu analizi ODTÜ Merkez Laboratuvarı'ndaki Bruker Avance cihazı ile hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

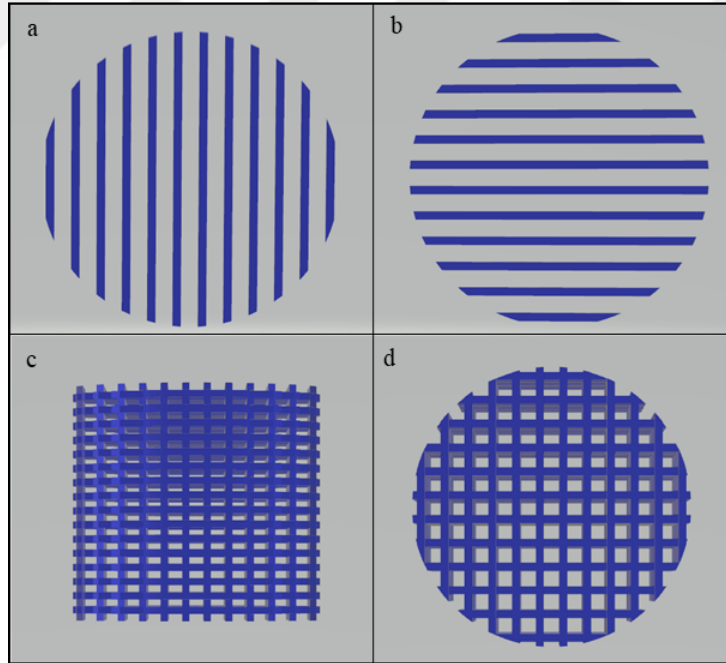
3.5. Üç Boyutlu Doku İskelelerinin Üretimi

Bu çalışmada, üç boyutlu doku iskelelerinin üretiminde Başlık 2.3.1’de bahsedilen üç boyutlu basım yöntemlerinden FDM ile solventli döküm metodu birlikte kullanılmıştır. FDM yöntemiyle kalıp üretilip kalıba solventli döküm yapıldıktan sonra kalıbın uzaklaştırılması yoluyla iskele elde edilmiştir.

3.5.1. Üç Boyutlu Doku İskelesi Kalıplarının Üretimi

3.5.1.1. Polivinilalkol (PVA) İskele Kalıbının Tasarımı Ve Üretimi

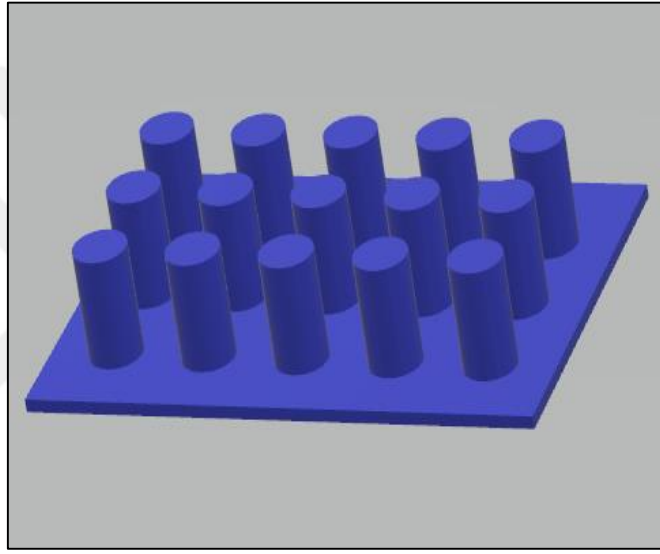
İskele kalıpları Solidworks 2020 programı kullanılarak 1 mm aralıklı 0,4 mm kalınlığında filamentlerden 14,1 mm çapında ve birbirine 90° açı yapan üstüste 33 katmandan oluşmak üzere 13,2 mm yüksekliğinde tasarlandı (Şekil 3.2) . Tasarım .stl formatına dönüştürülüp Ultimaker Cura dilimleme yazılımı kullanılarak basıma hazır hale getirildi ve üç boyutlu yazıcıda (Ultimaker S5) suda çözülebilen doğal PVA filament (Ultimaker, 2,85 mm) kullanılarak hassas profilde 10 mm/sn basım hızıyla basıldı.



Şekil 3.2. PVA Kalıp Tasarımı (a ve b) 90° açılı katman filamentleri, (c) yandan görünüm, (d) üstten görünüm.

3.5.1.2. 15 Kuyucuklu Polidimetilsiloksan (PDMS) Plaka

İskeleleri oluşturmak üzere polivinil alkol kalıp ve polimer çözeltilerinin ekleneceği kuyucukları içeren PDMS plakanın kalıbının çıkarılması için Solidworks 2020 programı kullanılarak 3 mm kalınlığında 13,5 x 9,5 cm² alanındaki dikdörtgen taban üzerinde 14,1 mm çapında 2,5 cm yüksekliğinde silindirlerin bulunduğu bir tasarım yapıldı (Şekil 3.3). Tasarım .stl formatına dönüştürülüp Ultimaker Cura dilimleme yazılımı kullanılarak basıma hazır hale getirildi. Üç boyutlu yazıcıda (Ultimaker S5) şeffaf PLA filamenti (Ultimaker, 2,85 mm) kullanılarak ekstra hassas profilde 50 mm/sn basım hızıyla basıldı.



Şekil 3.3. PDMS plaka kalıbı tasarımı

Şeffaf PLA materyali kullanılarak basılan üç boyutlu kalıp sıvı silikon elastomer bazı ve kürlenme ajanı içeren karışım (Sylgard 184, silikon elastomer kiti) üzerine yerleştirildi ve bir gece boyunca 55°C fırında (Thermo Scientific, Heratherm) tutularak kürlenmesi sağlandı. Kürlenme işlemi gerçekleştirildikten sonra PLA kalıp çıkarılarak 15 kuyucuklu PDMS plaka elde edilmiştir.

3.5.2. Polimer ve Kompozit Çözeltilerinin Hazırlanması

Polilaktik asit (PLA) (NatureWorks, Ingeo 4043D), PGS-MA ve HAP (Sigma Aldrich, Hydroxyapatite nanopowder<200nm) bileşenleri Tablo 3.2’ de gösterilen konsantrasyonlarda 1,4-Dioxane (Carlo Erba) çözücüsü içine eklenerek oda sıcaklığında 24 saat manyetik karıştırıcıda (Thermo, HPS RT2 advanced) 100 rpm’de karıştırıldıktan

sonra 24 saat çalkalayıcıda 70 rpm’de çalkalanarak homojen çözeltiler oluşması sağlandı. PGS-MA içeren çözeltilerin ısıyla kürlenme aşamasına kadar ışıık görmesi engellenmiştir.

Karışımlarda kullanılan PGS prepolimeri miktarı, Yang ve diğ. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada PLA’ya oranla % 2’den az PGS katıldığında darbe dayanımını yüksek miktarda arttırdığının raporlanması üzerine, % 1 olarak seçilmiştir.

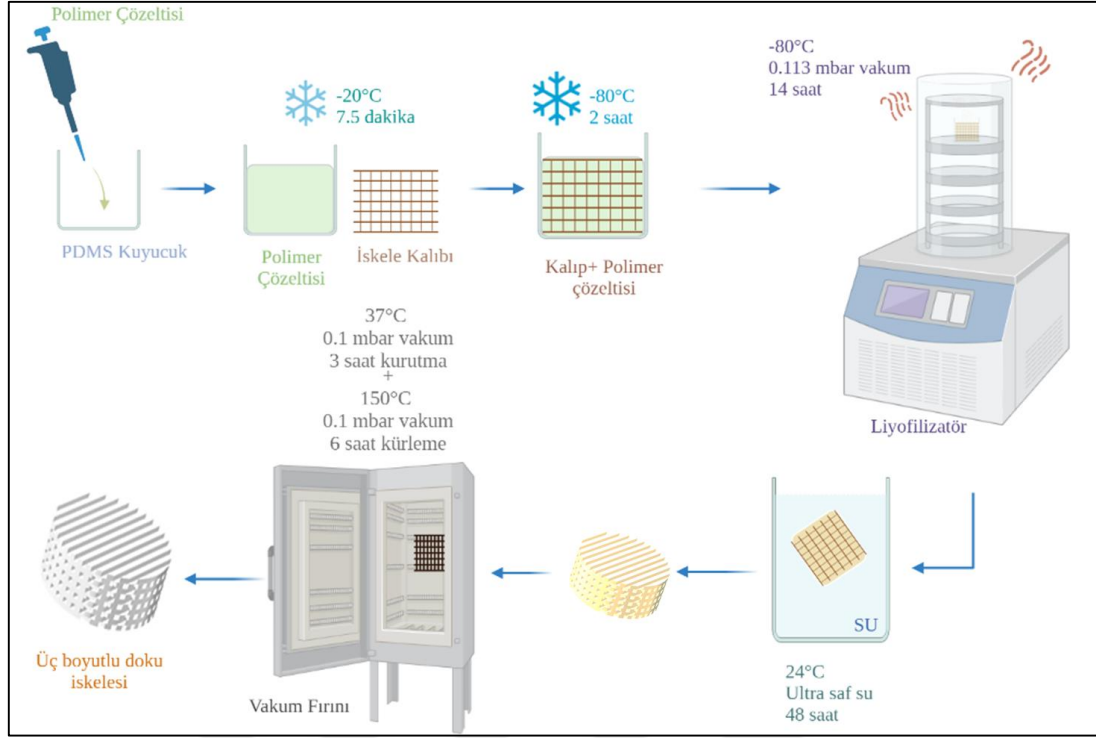
Tablo 3.2. Polimer çözelti kompozisyonları

Örnek	PLA (g/ml)	PGS-MA (g/ml)	HAP (g/ml)
%10 PLA	0,1	-	-
%15 PLA	0,15	-	-
%20 PLA	0,2	-	-
PLA/PGS-MA	0,2	0,002	-
PLA/PGS-MA/HAp	0,2	0,002	0,01

3.5.3. Üç boyutlu Doku İskelelerinin Üretimi

PDMS plakadaki kuyucuklara 1’er ml polimer çözeltisi eklenip sonra PVA kalıplarla birlikte 7,5 dakika -20°C buzdolabında soğutulmaya bırakıldı. Soğutma işlemi sonrası PVA kalıplar polimer çözeltisi içeren kuyucuklara yerleştirildi ve -80 °C dondurucuya alınıp 2 saat bekletilerek çözeltiler donduruldu ve ardından bir gece -80 °C 0,113 mbar vakum altında liyofilizatörde (Labconco, FreeZone 6L) bırakılarak çözücü uçuruldu. Liyofilizatörden çıkartılan iskeleler 48 saat boyunca oda sıcaklığında ultra saf suda bırakılarak PVA kalıbın çözünmesi sağlandı.

PVA yapıdan ayrıldıktan sonra meydana gelen üç boyutlu doku iskelesi 37°C vakumlu fırında 0,1 mbar vakum altında (Thermo Scientific, Vacutherm) 3 saat kurutulduktan sonra 6 saat 150°C’de 0,1 mbar vakum altında PGS-MA prepolimerinin ısıyla kürlenme yoluyla polimerleşmesi amacıyla bekletildi ve iskele üretimi tamamlandı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. 3 Boyutlu Doku İskelesi Üretim Süreci (Şekil biorender.com kullanılarak oluşturulmuştur.)

3.5.4. Doku İskelesi Yapımında Kullanılacak PLA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

%10, %15 ve %20 PVA kalıplar (0,4 mm aralıklı 1 mm filamentlerden oluşan) kullanılarak üretilen PLA doku iskelelerinin mukavemeti Shimadzu AGS-X mekanik test cihazı ile 5 kN yük hücresi kullanılarak 1mm/dk hızda gerçekleştirilen basma testi ile ölçülerek en yüksek mekanik dayanıma sahip olan PLA çözeltisi ile deneylere devam edildi.

3.6. Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

3.6.1. Doku İskelerinin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi

PVA kalıplar (1 mm aralıklı 0,4 mm kalınlığında filamentlerden oluşan) kullanılarak üretilen PLA doku iskelelerinin ve iskele kalıbı olmaksızın PLA, PLA/PGS-MA ve PLA/PGS-MA/HAp kompozitlerinin geniş bir kalıba dökülerek liyofilizasyon temelli üretim sürecinden geçirilmesi sonucu oluşan süngerlerden delgeç yardımıyla elde edilen disklerin mekanik özellikleri Shimadzu AGS-X mekanik test cihazında 5 kN yük hücresi kullanılarak 1mm/dk hızla gerçekleştirilen basma testi ile belirlenmiştir.

3.6.2. Doku İskelelerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Analizi

PVA kalıplar (1 mm aralıklı 0,4 mm kalınlığında filamentlerden oluşan) kullanılarak üretilen PLA, PLA/PGS-MA ve PLA/PGS-MA/HAp doku iskelelerinin fiziksel analizi 20 miliamper şiddetinde 2 dakika altınla kaplandıktan sonra Acıbadem Üniversitesi Biyomalzeme Merkezi'nde bulunan Zeiss Evo 10 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak yapılmıştır.

3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.7.1. İnsan Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (ADMKH) İzolasyonu ve Kültürü

Acıbadem Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Değerlendirme Kurulu'nun verdiği izinle (ATADEK 2020-12/10) hastaya onam formunun imzalatılması sonrasında liposuction ameliyatında tıbbi atık olarak açığa çıkan yağ dokusu orjinal kabında Acıbadem Üniversitesi Biyomalzeme Merkezi'ne getirildi ve aynı gün hücre izolasyonu gerçekleştirildi. Yağ dokusu 50 ml falkon tüplere alındı ve üzerine bire bir hacimde kollajenaz-I (Gibco) çözeltisi (%0,1 Kollajenaz, HBSS) eklendi ve 1 saat süre ile 37°C'deki çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1800 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atıldı ve pellet üzerine DNAase (Dornaz Alfa, Pulmozyme) solüsyonu (%1 PSA, 50µg/ml DNAase, HBSS) eklendi ve pipetlenerek yıkandı. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant pasteur pipeti ile çekildikten sonra pellet üzerine 10 ml DPBS (1x, Gibco) Gibco eklenerek yıkandı, 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj ardından süpernatant pasteur pipet ile toplandı. Pellet, büyüme besiyeri (%0.1 PSA, 1 ng/ml bFGF(Cell Signalling Technology), %10 FBS(Gibco), DMEMF12 (Gibco)) ile çek bırak yapılarak çözüldü. Ardından hücre süzgecinden (70 µm naylon, Falcon) geçirilerek kalan yağ ve kirliliklerden ayrıştırılan hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantı pasteur pipet ile çekilip atıldı ve 1 ml besiyeri ile pellet resüspanse edildi. Hücreler T25 flaska ekildi ve 37°C sıcaklığında %5 CO₂ içeren inkübatörde (PHCB, IMCO-170A/CUVH-PE) çoğaltıldı. Üç günde bir besiyeri değiştirildi ve hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında % 0,05 Trypsin-EDTA (Gibco) ile

kaldırılıp 5 dakika 1500 rpm’de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet büyüme besiyerinde çözülüp T75 flaska pasajlandı.

3.7.2. İnsan Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society for Cellular Therapy) ve Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi’ne (The Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee) göre bir hücrenin mezenkimal kök hücre olduğunu söyleyebilmek için bu hücre belli şartları sağlamalıdır:

-Kültüre edildiğinde plastiğe tutunabilmelidir.

-Özel yüzey antijenlerini ifade ederken hematopoietik hücre yüzey antijenlerini de ifade etmemelidir.

-Kültür koşullarında osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara farklılaşabilmelidir (Dominici ve diğ., 2006).

Bu doğrultuda izolasyon sonrası plastik flasklarda büyüdükleri gözlemlenebilen hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğunu kanıtlamak için bazı karakterizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin ifade ettikleri yüzey antijenlerinin tayini için immünofenotip analizi ve farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi için de osteojenik ve adipojenik farklılaşma protokolleri uygulanmıştır.

3.7.2.1. Hücre Morfolojisinin Mikroskopik Yöntemlerle Analizi

Üçüncü pasajdan kaldırılan hücreler, 0,2 mg/ml fibronektin (Gibco) kaplı 8 kuyucuklu mikroskop slaydına (μ slide, IBIDI) kuyucuk başına 100.000 hücre olacak şekilde büyüme besiyeri içinde ekildi. Üç gün boyunca 37°C’de inkübe edildikten sonra iki kere PBS ile yıkandı ve oda sıcaklığında 20 dakika boyunca % 4 paraformaldehitte (PFA) tutularak sabitlendi. Sabitleme işlemi ardından kuyucuklara 200 μ l % 0,1 Triton X-100 (Gibco) eklenip 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon ardından kuyucuklar üç kere beşer dakika boyunca PBS ile yıkandı ve 200 μ l %3 BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich) çözeltisi (%3BSA, PBS) eklenerek yarım saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından % 0,1 BSA (%0.1BSA, PBS)’da hazırlanan 1:100 vimentin (Cell Signaling, XP (R) Rabbit mAb) birincil antikor çözeltisi eklenip

37°C’de 1 saat inkübe edildikten sonra kuyucuklar üç kez PBS ile yıkanıp %0,1 BSA’da hazırlanan 1:400 floresan ikincil antikor çözeltisi (Cell Signaling, Anti RabbitIgG (H+L), F(ab’)₂ Fragment (Alexa Fluor 594 Conjugate)) eklendi ve 1 saat 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası sekonder antikorlar çekilip hücreler üç kere PBS ile yıkandı ve kuyucuklara 200’er µL PBS’te hazırlanan 1:1000 DAPI (Cell Signaling) çözeltisi eklenip 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Boyama işlemi tamamlandığında üç kere PBS ile yıkanan kuyucukların kurumasını önlemek için 200’er µl PBS eklendi ve konfokal mikroskopla (Zeiss LSM 900) görüntü alındı.

3.7.2.2. Hücrelerin İmmünofenotip Analizi

İzole edilen hücrelerin yüzey antijeni ifadeleri akış sitometrisi cihazı (BD Accuri C6 Plus) ile analiz edildi. Üçüncü pasaja gelen hücreler % 0,25 Trypsin-EDTA kullanılarak kaldırılıp 5 dakika 1500 rpm’de santrifüj edildi. Pelletteki hücreler büyüme besiyerinde pipetlenip sayıldı ve her antikor için 10×10^4 hücre 1,5 ml tüplere alınarak 1500 rpm’de +4°C’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet %1 BSA içeren solüsyonda çözülerek antikorlar (FITC-CD105, PerCP-CD73, PerCP-CD90, PECD44, FITC-CD45, PE-CD34, PerCP-HLA-DR, PE-HLA-ABC, PerCP-IgG2α, FITC-IgG1, PerCP- IgG1 ve PE- IgG1 (BD Biosciences)) eklenip +4°C ‘de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası +4°C 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilen hücreler iki kez PBS’le yıkandı ve %1 PFA ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek sabitlemeleri sağlandı. Sabitleme işlemi ardından +4°C 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilen hücreler FACS solüsyonunda (DPBS’te %0,01 sodyum azid (Sigma), %1 BSA) çözülerek akış sitometrisi cihazı ile analiz edildi.

3.7.2.3. Hücrelerin Osteojenik Farklılaşma Kapasitesinin Belirlenmesi

Üçüncü pasaja ulaşan hücreler 24 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde büyüme besiyeri içinde ekildi. Hücreler tüm kuyucuğu kaplayıncaya kadar 37°C’de %5 CO₂ inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası büyüme besiyeri Osteojenik Farklılaşma besiyeri (%10 FBS, %1 PSA, 5×10^{-6} M Askorbat-2 fosfat (Sigma), 10 mM β – gliserofosfat (Appllichem), 0.01 µM deksametazon (Sigma), DMEM Low Glucose (Gibco)) ile değiştirilerek farklılaşma prosedürü başlatıldı. Besiyeri haftada üç kez tazelendi.

Deksametazon, kemik nodülü oluşumu arttıran osteoblast genlerinin ifadesini ve ALP enziminin aktivitesini artırır, askorbik asit kaynağı kollajen içeren kemik matrisi üretiminde önemli bir rol oynar ve β -gliserofosfat ise mineralizasyon için gerekli olan fosfat kaynağını sağlamaktadır (Stein ve Lian, 1993; Coelho ve diğ, 2000).

Hücreler 21. günde Alizarin Red (Sigma) ile boyanarak kalsiyum fosfat birikimi gözlemlendi. Alizarin Red boyaması için farklılaşma başlatıldıktan sonra 21. gün sonunda besiyeri her kuyucuktan dikkatlice uzaklaştırıldı. Hücreler 2 ml DPBS ile yıkandıktan sonra %4 PFA eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında bekletilerek sabitlenmesi sağlandı. Sabitleme sonrası PFA dikkatlice uzaklaştırıldı ve kuyucuklar üçer defa 5'er dakika süre ile distile su ile hücre tabakası tabandan kalkmayacak şekilde dikkatlice yıkandı. Distile su uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 1'er ml %2 Alizarin Red solüsyonu (Alizarin Red S tozu (Sigma) distile suda çözülüp pH 4.18'e ayarlanmıştır) eklendi. Otuz saniye oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra kalan fazla boya çekildi ve kuyucuklar ikişer defa beşer dakika boyunca çeşme suyu ile hücre tabakası kalkmayacak şekilde dikkatlice yıkandı. Yıkama sonrası kurumaması için kuyucuklara 1 ml PBS eklendi. Işık mikroskopunda (Zeiss Primovert) görüntü alındı.

3.7.2.4. Hücrelerin Adipojenik Farklılaşma Kapasitesinin Belirlenmesi

Üçüncü pasaja ulaşan hücreler 24 kuyucuklu plakaya her kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde büyüme besiyeri içinde ekildi. Hücrelerin tüm kuyucuğu kaplayıncaya kadar % 5 CO₂ inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası büyüme besiyeri Adipojenik Farklılaşma besiyeri (%10 FBS, %1 PSA, 10^{-6} M deksametazon (Sigma), 200 μ M indometasin (Sigma), 10 μ g/ml Insulin (Sigma), 0.5 mM 3-izobutil-1-metilksantin(Sigma)) ile değiştirilerek farklılaşma prosedürü başlatıldı. Besiyeri haftada üç kez tazelendi. Hücreler 14. günde Oil Red O Stain Kit (Abcam) ile boyanarak yağ tanecikleri ışık mikroskobu ile görüntülendi.

Oil Red O Stain Kit (Abcam) boyaması için farklılaşma başlatıldıktan sonra 14. günde hücreler 2 ml DPBS ile yıkandıktan sonra % 4 PFA ile 20 dakika oda sıcaklığında sabitlendi. Sabitleme sonrası PFA dikkatlice uzaklaştırıldı ve kuyucuklar üçer defa distile su ile hücre tabakası yüzeyden kalkmayacak şekilde dikkatlice yıkandı. Her kuyucuğa 1 ml Propilen glikol solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 2 dakika bekletildikten sonra

çekilip yerine Oil Red O solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 6 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası Oil Red O solüsyonu çekilip kuyucuklara distile suyla hazırlanan %85 Propilen glikol solüsyonu eklenerek 1 dakika bekletildi. Ardından solüsyon çekildi ve iki kez distile suyla yıkama yapıldıktan sonra kurumaması için PBS eklendi. Işık mikroskopunda görüntü alındı.

3.8. Doku İskelelerine Hücre Ekimi ve İskele Üzerindeki Hücresel Davranışın Belirlenmesi

3.8.1. Doku İskelelerinin Hücre Ekimine Hazırlanması ve İskelelere Hücre Ekimi

Üretimi tamamlanan PLA temelli doku iskelelerinin hidrofilisitesini arttırmak için iskelelere Diener Pico Plazma Sistemi'nde 5 dakika boyunca 50 watt Oksijen (O₂) Plazma uygulandı. Plazma işleminin ardından iskeleler laminar kabin içerisinde yarım saat %70 etanolde bırakılarak sterilizasyonu gerçekleştirildi. Sterilizasyon işlemi sonrası alkolün uzaklaştırılması için iskeleler 3 kez 15 dakika boyunca PBS ile yıkandı. Sterilizasyon ve yıkama işlemleri ardından 24 kuyucuklu plakada FBS içeren büyüme besiyeri içine alınıp gece boyu 37°C'de inkübe edilerek hücre tutunmasına pozitif etki gösterecek FBS kaynaklı protein kaplaması tamamlanan iskeleler hücre ekimine hazır hale getirildi.

Gece boyu 37°C'de inkübasyonu tamamlanan iskelelerin fazla besiyeri alındı ve üzerlerine, üçüncü pasajdan kaldırılan hücreler iskele başına 100.000 hücre 25µl büyüme besiyerinde olacak şekilde pipet ile damlacık halinde ekildi. Ekim sonrası 37°C sıcaklığında %5 CO₂ içeren inkübatörde 4 saat bekletilen iskelelerin kuyucuklarına hücrelerin iskele yüzeyinden kalkmasına neden olmadan, kenardan 1'er ml büyüme besiyeri eklendi.

3.8.2. İskelelerin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

İskelelere bölüm 3.2.1'de belirtildiği gibi hücre ekimi gerçekleştirildikten sonra inkübasyonun 24. saat ve 7. gününde Canlı-Ölü Hücre Boyaması (Cell Check Viability/Cytotoxicity Test Kit, ABP Biosciences) yapılarak iskelelerin hücre canlılığına etkisi incelenmiştir. İnkübasyon sonunda besiyeri fenol kırmızısı içermeyen DMEM (Gibco) besiyerinde 1 saat bekletildikten sonra (Mg ve Ca içerir, Gibco) fazla besiyeri atılmış, 5 µl Propidium Iodide ve 5 µl Calcein AM içeren 10 ml DPBS solüsyonu hazırlanıp

iskeleler üzerine 1'er ml eklenmiştir. 45 dakika 37°C'de inkübe edilen iskelelerden konfokal mikroskobu ile 150 µm kalınlıkta üç boyutlu z-stack görüntü alındı.

3.8.3. Phalloidin Boyama

Ekim ardından inkübasyonun 7. ve 21. gününde % 4 PFA kullanılarak sabitlenen hücreler üzerine 1 ml % 0,1 Triton X-100 solüsyonu eklenip 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra iskeleler 3 kere PBS ile yıkandı ve yarım saat bloklama serumunda (PBS'te çözünmüş % 1 BSA) 37°C sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası % 0,1 BSA ile yıkanan iskeleler üzerine 1 ml Phalloidin boyama solüsyonu (1:100 Phalloidin (Sigma): % 0,1 BSA) eklendi ve 1 saat 37°C sıcaklığında inkübasyon sağlandı. Süre sonunda 3 kez PBS ile yıkanan hücreler üzerine DAPI (1:1000, PBS) solüsyonu eklenip 10 dakika oda sıcaklığında boyama tamamlandıktan sonra PBS ile yıkanan iskelelerden konfokal mikroskop (Zeiss LSM 900) ile görüntü alındı.

3.8.4. İskelelerin Hücre Çoğalmasına Etkisinin Belirlenmesi

Tetrazolyum bazlı (MTT) ve resazurin bazlı Alamar Blue ve Presto Blue gibi metabolik deneyler, hücrelerin redoks aktivitesini kullanarak optik veya floresan olarak tespit edilebilir bir bileşenin oluşturulmasına dayalı, hücre popülasyonlarını nicel olarak izlemek için kullanılan testlerdir. Tetrazolyum bazlı testler toksik olduğundan son nokta analizi olarak kullanılabilirken resazurin bazlı testler ise floresan olmayan mavi resazurini floresan pembe resorufine indirgemek için mitokondriyal aktiviteyi kullanan toksik olmayan testlerdir (Sonnaert ve diğ., 2015).

Resazurin bazlı Presto Blue testinin hücre kültüründe sürekli olarak izlemeye olanak sağlaması ve hücre canlılığı ve çoğalmasının incelenmesinde güvenilir bir metot olması sebebiyle iskelelerin hücre çoğalmasına etkisinin incelenmesi için bu metot tercih edilmiştir.

İskelelere bölüm 3.2.1'de belirtildiği gibi hücre ekimi gerçekleştirildikten sonra inkübasyonun 24. saat, 7. gün, 14. gün ve 21. günlerinde büyüme besiyeri çekilip yerine %10 Presto Blue (İnvitrogen) içeren büyüme besiyeri eklenerek 2 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda çoklu plaka okuyucu cihazında (Victor Nivo, Perkin Elmer)

570 ve 600 nm dalgaboylarında absorbans ölçümü yapılarak sonuçlar analiz edilmiştir. Analizlerin doğruluğu için kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır.

3.8.5. İskelelerin Osteojenik Farklılaşmaya Etkisinin Belirlenmesi

İskelelerin üzerindeki osteojenik farklılaşma protokolüne tabi tutulan hücrelerin farklılaşmasına etkisinin belirlenmesi için kantitatif olarak Alkalen fosfataz (ALP) aktivite analizi yapılmış, kalitatif olarak Tetrasiklin-HCL antibiyotiği ile floresan yöntem kullanılarak, Alizarin Red boyası ile ve taramalı elektron mikroskobu yardımıyla mineralizasyon varlığı gözlemlenmiştir.

3.8.5.1. Osteojenik Farklılaşmanın Alkalen Fosfataz Testi ile Belirlenmesi

Kemik, karaciğer ve böbrek dahil çeşitli dokularda ifade edilen Alkalen fosfataz enziminin hücresel olaylardaki kesin rolü bilinmemekle birlikte, dokuya özgü olmayan ALP genel bir osteoblast belirteci olarak kabul edilir. Mezenkimal kök hücrelerde ALP aktivitesi üzerine yapılan çoğu çalışma bunun erken osteojenik farklılaşma sırasında ifade edildiğini göstermiştir (Kim ve diğ, 2012).

İskele üzerindeki osteojenik farklılaşmanın kantitatif olarak alkalen fosfataz enzimi aktivitesinin ölçülmesi yoluyla belirlenmesi için p-nitrofenil fosfatın p-nitrofenol ve fosfata dönüştürülmesine dayanan bir ALP kiti (Randox) kullanıldı.

İskelelere bölüm 3.2.1’de anlatıldığı üzere hücre ekimi yapıldıktan bir gün sonra büyüme besiyeri osteojenik besiyeri ile değiştirilerek osteojenik farklılaşma başlatıldı. Osteojenik farklılaşmanın 7,14 ve 21. günlerinde besiyeri uzaklaştırılıp iskeleler 2 kez DPBS ile yıkandı. Her kuyucuğa 1 ml % 0,1 Triton X-100 solüsyonu (Triton X-100 (Sigma), 0,1 M Tris tampon çözeltisi) eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon ardından solüsyon pipetlenerek hücrelerin iskeleden iyice çıkması sağlandıktan sonra lizatlar 15 ml’lik falkon tüplere alındı. Tüpler 10 dakika -20°C’de ardından 10 dakika 37°C’de bekletildi ve bu dondur-çöz işlemi üç kez tekrarlandı. Dondur-çöz işlemi sonrası numuneler buz üzerinde 10 dakika boyunca 30 saniye aralıklarla % 60 genlikte sonikasyona (Bandelin Sonoplus Sonikatör, SH70G probu) maruz bırakıldı. Sonikasyon sonrası 10 dakika 2000 rpm’de +4°C’de santrifüj edilen örneklerin süpernatantından alınan 50µl örnek üzerine 50 µl Triton X-100 ve 20 µl ALP solüsyonu eklenip bir saat

oda sıcaklığında bekletildikten sonra çoklu plaka okuyucu cihazında 405 nm dalgaboyunda absorbans ölçümü yapıldı.

ALP deneyinin analizinde kullanılmak üzere iskelelerdeki toplam protein miktarı ölçüldü. BCA protein tayin kiti (Thermo Scientific, Pierce BCA Protein Assay Kit) ile ALP deneyinde kullanılan süpernatanttaki toplam protein miktarının belirlenmesi için süpernatanttan alınan 20 µl lizat üzerine 200 µl BCA çalışma solüsyonu (1:50 reaktif a: reaktif b) eklenip 30 dakika 37°C’de inkübe edildikten sonra 562 nm’de absorbans ölçümü yapıldı.

Total protein konsantrasyonu ile alkalen fosfataz enzimi konsantrasyonu oranlanarak sonuçlar analiz edilmiştir. Analizlerin doğruluğu için p-nitrofenol ve total protein kalibrasyon eğrileri kullanılmıştır (Ek-A ve Ek-B).

3.8.5.2. Mineralizasyonun Alizarin Red Boyası ile Görüntülenmesi

Osteojenik farklılaşma inkübasyonunun 21. gününde iskeleler Alizarin Red (Sigma) ile boyanarak kalsiyum fosfat birikimi gözlemlendi. 21. gün sonunda iskeleler DPBS ile yıkandıktan sonra % 4 PFA eklenerek 40 dakika oda sıcaklığında bekletilerek sabitlenmesi sağlandı. Sabitleme sonrası PFA uzaklaştırılıp kuyucuklar üçer defa distile su ile dikkatlice yıkandı. Distile su uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklara 1’er ml % 2 Alizarin Red solüsyonu eklendi ve otuz saniye oda sıcaklığında inkübe edilip boya çekildikten sonra kuyucuklar ikişer defa beşer dakika boyunca çeşme suyu ile,ikişer defa ultra saf su ile, kontrol iskelelerdeki boya kalıntıları tamamen yıkanana kadar, yıkanıp gece boyu çeşme suyu içinde +4°C’de bekletilerek artık boyanın uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama sonrası kurumaması için kuyucuklara 1 ml PBS eklendi. Stereomikroskopta (Zeiss Stemi 508) görüntü alındı.

3.8.5.3. Mineralizasyonun Floresan Görüntülenmesi

Mineralizasyonun floresan olarak görüntülenmesi için ortamdaki serbest kalsiyumu bağlayarak mineralizasyon esnasında osteoblastlar tarafından kalsiyum fosfat minerali içinde biriktirilen otofloresan bir bileşik olan Tetrasiklin kullanılmıştır (Kenar, 2003).

İskelelere hücre ekimi gerçekleştirildikten bir gün sonra büyüme besiyeri antibiyotik olarak tetrasiklin (Tetra, 500 mg Tetrasiklin-HCL, Mustafa Nevzat) içeren osteojenik farklılaşma besiyeri (%10 FBS, %1 tetrasiklin-HCL, 5.10^{-6} M askorbat-2-fosfat, β – gliserofosfat, 0.01 μ M deksametazon) ile değiştirildi. 37°C sıcaklığında %5 CO₂ içeren inkübatörde 21 gün kültüre edilen iskelelerdeki hücreler iki kez PBS, iki kez %70 etanol ile yıkandı ve 6 saat boyunca +4°C’de % 96 etanolde bırakılarak sabitlendi. Etanol atıldıktan sonra iskeleler karanlık bir ortamda kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra konfokal mikroskop ile 390 nm uyarma dalgaboyunda 75 μ m kalınlığında z-stack üç boyutlu görüntü alınarak mineralizasyon gözlemlendi.

3.8.5.4. Mineralizasyonun Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analizi

Osteojenik farklılaşmanın 21. gününde örnekler iki kere PBS ile yıkandıktan sonra bir kere kakodilat tamponu (0,1 M kakodilik asit (AppliChem) ultra saf suda çözülüp pH 7,4’e ayarlanmıştır) ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 2 saat kakodilat tamponunda hazırlanmış % 2,5 Gluteraldehit (Sigma-Aldrich) solüsyonunda inkübe edilerek sabitlenmiştir. Sabitleme işlemi sonrası bir kere kakodilat tamponu ile yıkanan örnekler, -80°C’de bir gece dondurulduktan sonra 8 saat boyunca liyofilize edilerek kurutulmuştur.

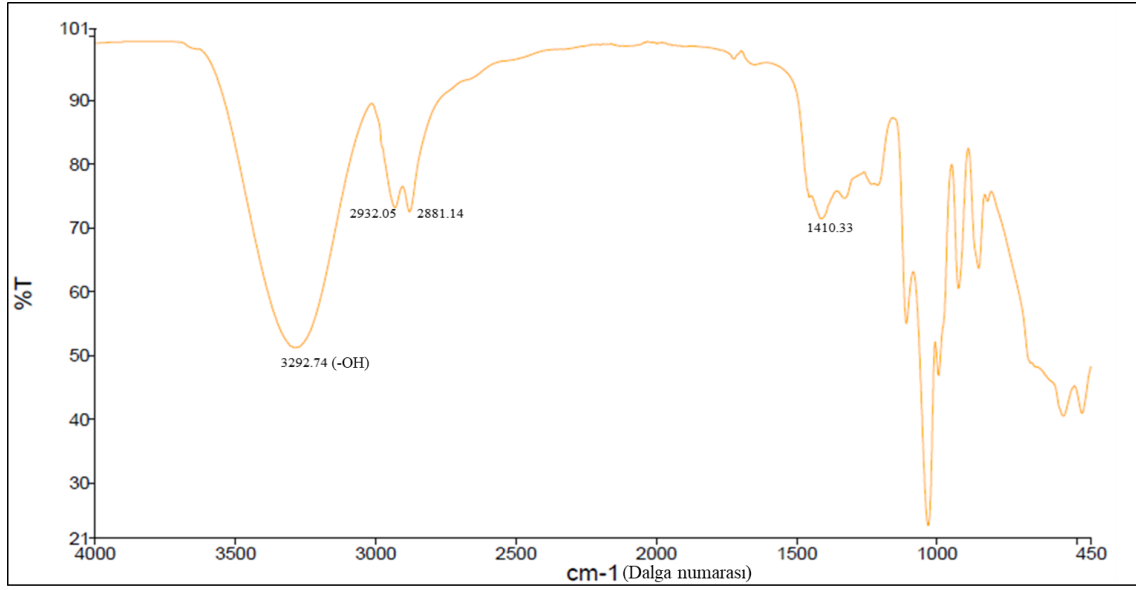
Tamamen kuruyan örnekler Acıbadem Üniversitesi’nde bulunan Leica marka EM ACE 200 model kaplama makinesi ile 50 nm kalınlığında altın kaplama yapıldıktan sonra Thermo Scientific marka Quattro S model taramalı elektron mikroskobu ile iskelelerin görüntüsü alındı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. PGS ve PGS-MA Moleküllerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

4.1.1. PGS Prepolimerinin Üretimi ve FTIR Analizi

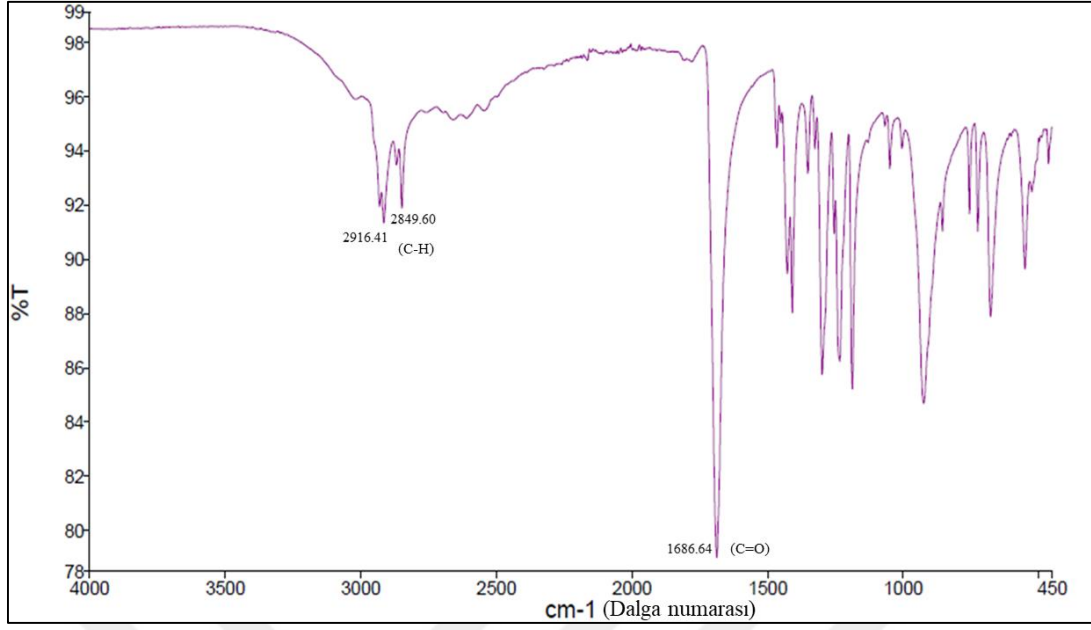
Mikrodalga fırında prepolimer üretiminin ardından prepolimer numuneleri ile gliserol ve sebasik asit monomerlerinin FTIR spektrumu çekilerek prepolimerizasyon sürecinin işleyişi gözlemlendi (Şekil 4.1 , 4.2 ve 4.3).



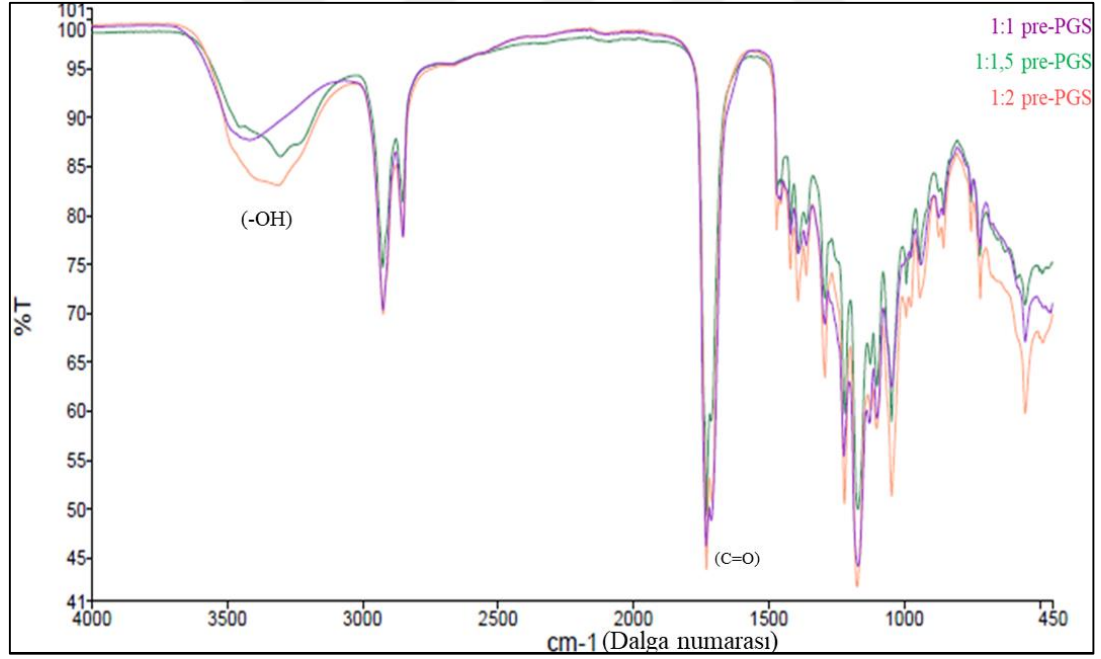
Şekil 4.1. Gliserolün FTIR spektrumu

Toplamda 5 dakika süren prepolimerizasyon işlemi sonunda üç numune için de viskoz transparan sarımsı renkte bir form elde edildi. Numunelerin FTIR analizine göre 1731 cm⁻¹ deki pik ester bağlarını oluşturan C=O bağlarını doğrularken 3417.2 cm⁻¹ noktasındaki pikin yoğunluğunun gliserole göre düşmesi gliserol monomerinin polimerleşmeye katılarak azalışını temsil etmektedir (Şekil 4.3). Aydın ve diğ. (2013) çalışmasından yola çıkılarak geleneksel prepolimerizasyon yöntemine en yakın pikleri gösteren spektrum olarak 1:1 PGS prepolimeri seçilmiştir.

Vakum altında 150°C’de 6,8 ve 10 saat olarak gerçekleştirilen kürlleme testi sonuçlarına göre PGS prepolimerinin çapraz bağlanmasının en az 8 saatte gerçekleştiği görülmüştür.



Şekil 4.2. Sebasik asitin FTIR spektrumu



Şekil 4.3. PGS prepolimerlerinin FTIR analizi. 1:1, 1:1,5, 1:2 oranları polimerleşme öncesi karıştırılan sebasik asit:gliserol mol oranını belirtmektedir. (-OH) grubu üründe gliserol varlığını, (C=O) bağı ise sebasik asitin bulunduğunu göstermektedir.

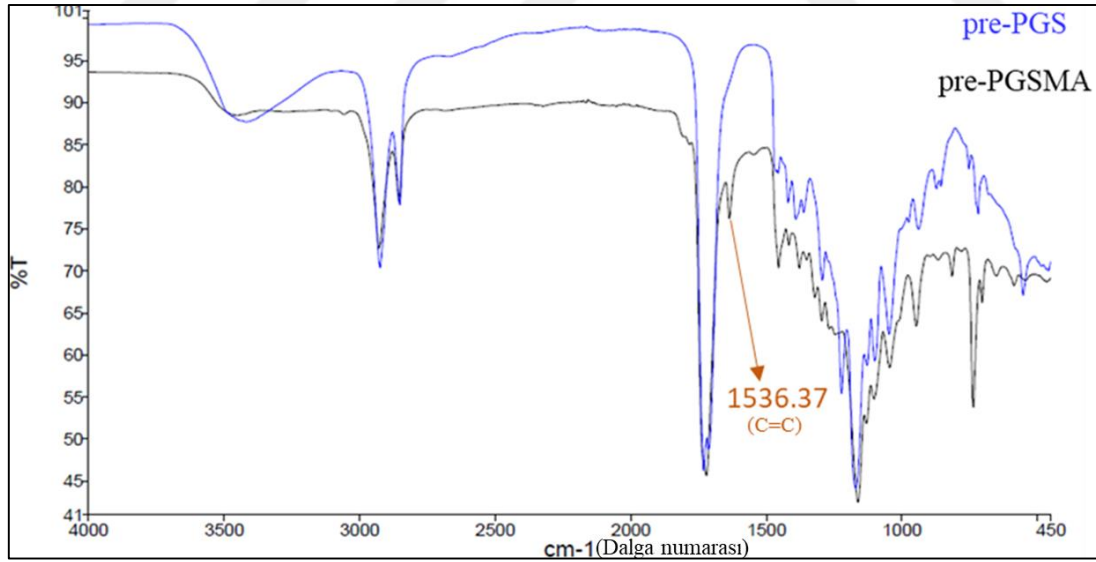
4.1.2. GPC ile PGS Prepolimerinin Moleküler Ağırlık Tayini

Mikrodalga fırında üretim sonrası 1:1 PGS prepolimerine uygulanan ağırlıkça ayırma kromatografisi ile sayıca ortalama moleküler ağırlığı (M_n) 988 g/mol, ağırlıkça ortalama moleküler ağırlığı (M_w) ise 3440 g/mol olarak belirlenmiştir.

4.1.3. PGS-MA'nın Üretimi ve FTIR Analizi

Polimer karışımı ve kompozit hazırlığı için PLA polimer matrisinin içinde az miktarda bulunan PGS prepolimerinin kürlenme esnasında kendi polimer dallarını bulmasını kolaylaştırmak için PGS prepolimerindeki gliserolün ikincil hidroksil gruplarına trietilamin varlığında metakrilat grubu bağlanarak malzeme daha reaktif hale getirildi. Malzemenin daha aktif hale geldiği çapraz bağlaması için 8 saat gereken PGS prepolimeri aksine aynı koşullarda 6 saatte tamamen katı ve koyu renkli bir faza dönüşmesiyle anlaşılmıştır.

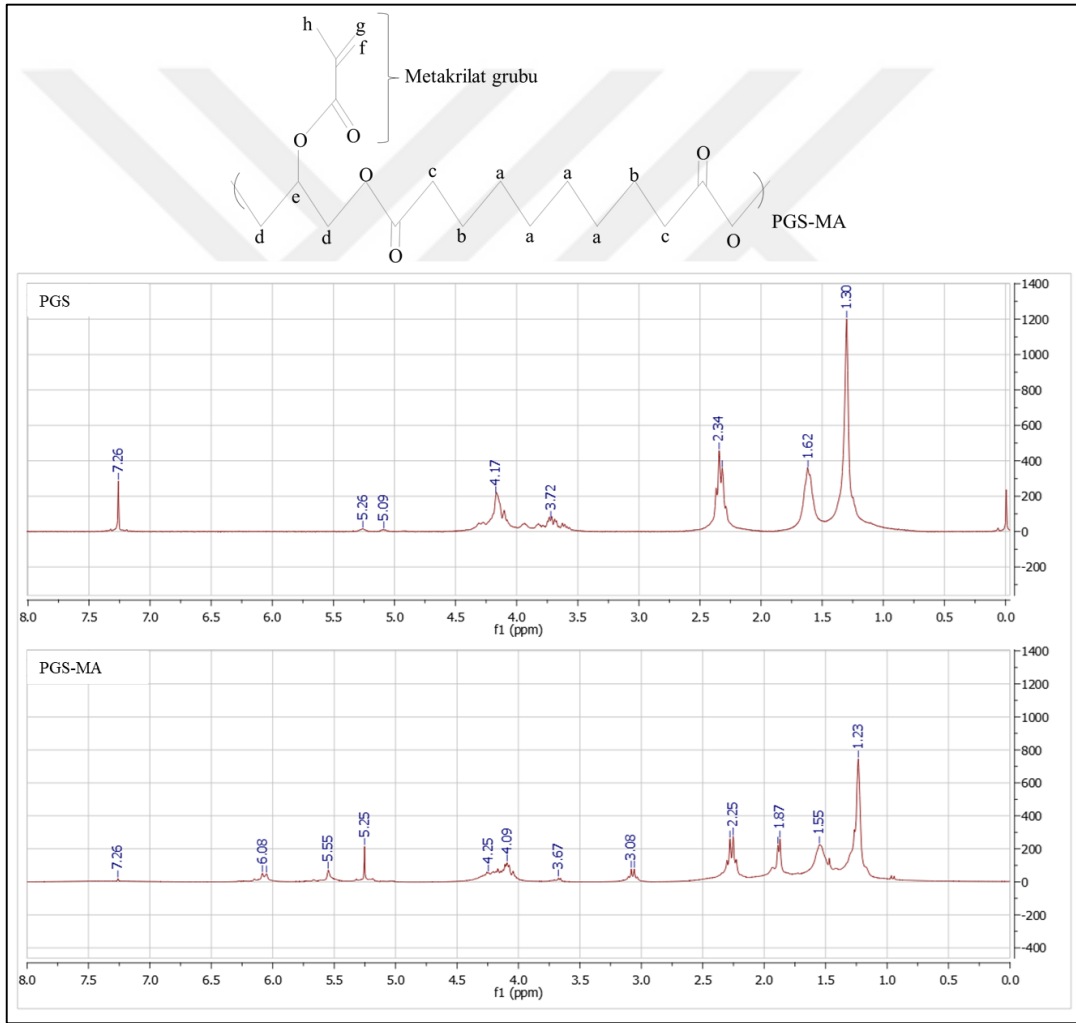
Metakrilatlama işlemi gerçekleştirilen polimere FTIR analizi yapılarak –MA grubunun varlığı 1536.37 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikle kanıtlanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. pre-PGS ve pre-PGS-MA'nın karşılaştırmalı FTIR analizi. (C=C) grubunun varlığı metakrilasyonun gerçekleştiğini göstermektedir.

4.1.4. PGS ve PGS-MA moleküllerinin NMR analizi

PGS ve PGS-MA moleküllerinin NMR analizi sonuçlarına (Şekil 4.5) göre 7.26 ppm’de deneyin gerçekleştirildiği çözücü olan kloroformu gözlemlemekteyiz. 3.7 (d), 4.2 (d) ve 5.2 (e) ppm bandındaki pikler gliseroldeki, 3.1 bandındaki pik ise gliseroldeki metakrile olmamış, OH grubuna bağlı halde olan hidrokarbonları (e) temsil etmektedir. Sebasik asitten gelen pikler 1.3 (a), 1,6 (b) ve 2.3 (c) ppm seviyelerinde gözlemlenmektedir. 1.9 (h), 5.5 (g) ve 6.1 (f) ppm bandındaki pikler ise metakrilat grubundan gelen protonları simgelemektedir.



Şekil 4.5. PGS-MA molekülünün iskeleti ile PGS ve PGS-MA prepolimerlerinin NMR Spektrumu

PGS prepolimerinin GPC testine göre moleküler ağırlık değeri ve NMR spektrumundaki piklerin altında kalan alan değerleri kullanılarak PGS prepolimerindeki monomerlerin birleşme oranları ve PGS-MA molekülünün metakrilasyon derecesi hesaplanmıştır.

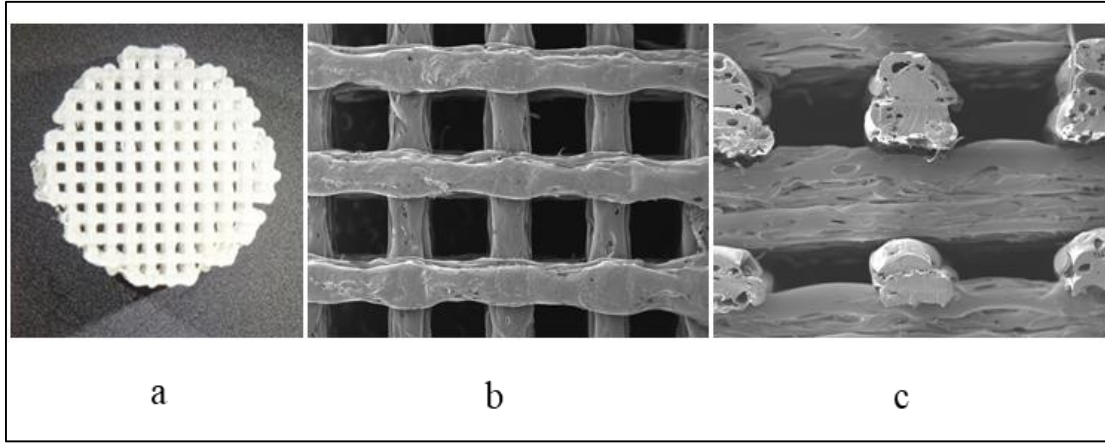
PGS polimerinin monomer birleşme oranının hesaplanmasında gliserol ve sebasik asitten gelen pikler, molekül iskeletinde denk geldiği atomlar ve moleküler ağırlık yoluyla elde edilen miktarlarıyla oranlanarak hesap yapılmıştır. Üretimde 1:1 (sebasik asit: gliserol) mol oranda tepkimeye eklenen monomerlerin tepkime sonrası sentezlenen kopolimerde birleşme oranının 45:55 olduğu anlaşılmıştır. Dolayısıyla sebasik asit monomerinin uçlarından da gliserolün bağlanmış olabileceği düşünülmektedir.

PGS prepolimerinin metakrilatlanma derecesi hesaplanırken molekül iskeletinde metakrilat grubunun içerdiği atomları temsil eden piklerin altında kalan alan hesaplanmış atom sayısı elde edilip gliserol miktarıyla oranlanarak PGS prepolimerinin metakrilatlanma derecesinin %69 olduğu bulunmuştur.

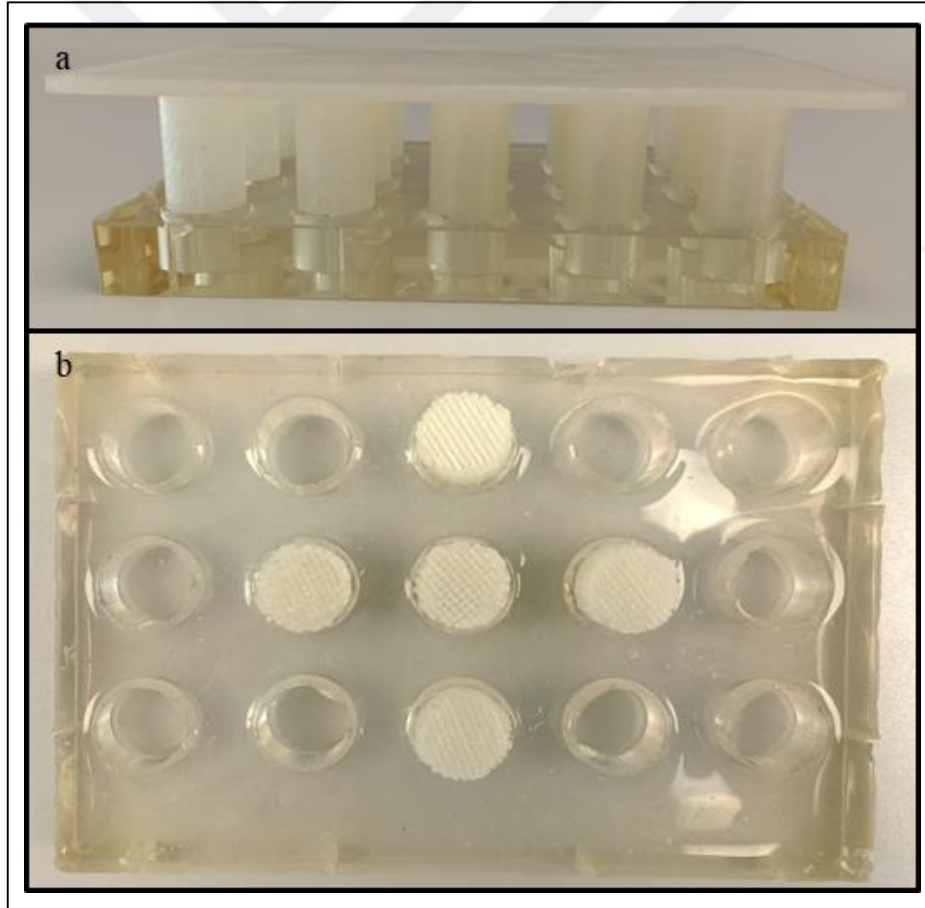
4.2. Üç Boyutlu İskele Kalıbının ve Kuyucuklu Plakanın Üretimi

Üç boyutlu iskeleye kalıp olarak kullanılmak için üretilen PVA iskele kalıbı stereomikroskop ve taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir (Şekil 4.6). SEM verilerine göre üç boyutlu basım sonrası tasarımı 400 µm olarak verilen filament kalınlığının ortalama $398,2 \pm 69,2$; 1000 µm olarak verilen filamentler arası boşluğun $822,3 \pm 22,05$ µm uzunluğunda olduğu bulunmuştur. FDM yöntemi ile üretilen PVA iskele kalıbının tasarıma birebir uyum göstermediği, normalde iki filament üst üste atmasına rağmen bazı katmanlarda cihazın bir yahut üç filament üstüste attığı ve bunun o katmanın yüksekliğini, PLA bazlı iskelelerin filamentlerinin şeklini etkilediği düşünülmektedir. Bu durum iskelelerin mekanik özelliklerinin tekrarlanabilirliğine de olumsuz etki göstermektedir.

Şekil 4.7’de PDMS plakanın 55°C fırında kürlendikten sonra PLA kalıbından ayrılmadan önceki hali ve PVA iskele kalıbı ile PDMS 15 kuyucuklu plakanın birebir uyum sağladığı görülmektedir.



Şekil 4.6. PVA Kalıbın mikroskop görüntüleri (a) Üstten görünüm (stereomikroskop görüntüsü) (b) Üstten görünüm (SEM görüntüsü, 50 X büyütme), (c) Kesit görüntüsü (SEM görüntüsü, 100X büyütme).



Şekil 4.7. PDMS 15 Kuyucuklu Plaka. (a) PLA kalıp ile PDMS plakanın oluşturulması, (b) PVA iskele kalıbı ile PDMS plakanın beraber kullanımı.

4.3. Üç Boyutlu PLA, PLA/PGS-MA, PLA/PGS-MA/HAp Doku İskeleleri

4.3.1. İskeleler için Uygun PLA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bu tezde iyileşme sürecinde mekanik etkilere de maruz kalan ve mukavemeti en yüksek doku olan kemik dokuya en yakın mekanik dayanıma sahip iskelelerin üretilmesi amaçlanmıştır. Çözelti içindeki polimer yoğunluğunun mekanik dayanıma etkisinin gözlemlenebilmesi için üç farklı polimer konsantrasyonu ile iskele üretilip bunların mekanik özellikleri karşılaştırıldı (bahsi geçen iskeleler ısıyla kürleme işlemine maruz bırakılmamıştır). Mekanik test sonuçlarına göre beklendiği gibi polimer konsantrasyonu fazla olan iskelenin dayanımı daha yüksek çıkmıştır (Tablo 4.1, Ek-C).

Tablo 4.1. Farklı PLA konsantrasyonlarıyla üretilen iskelelerin elastiklik modülü değerleri

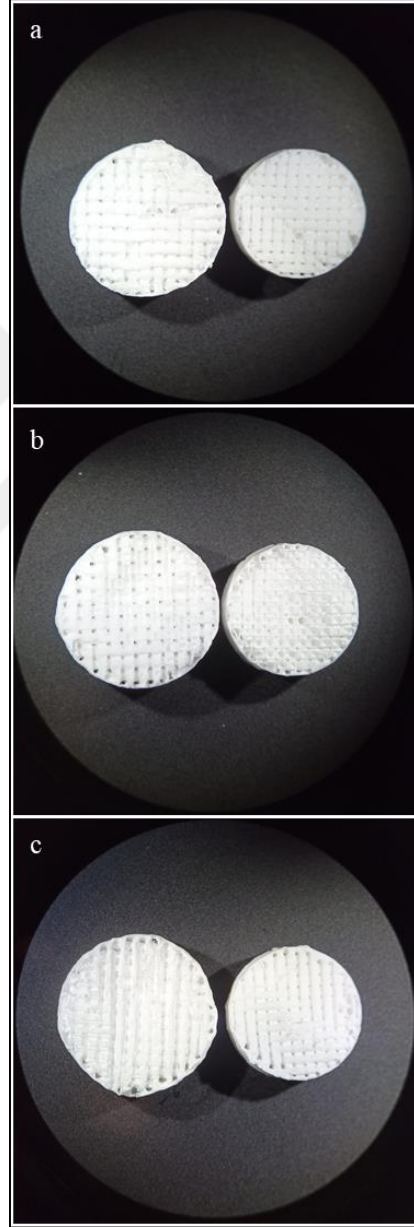
Konsantrasyon (%)	Elastiklik Modülü (MPa)
10	1,21 ± 0,29
15	2,94 ± 0,67
20	7,42 ± 0,49

4.3.2. Doku İskelelerinin Fiziksel Karakterizasyonu

Üretim bandında PGS-MA prepolimerinin polimerleşmesi için ısıyla kürleme işlemine maruz kalmadan önce ve sonraki halleriyle yanyana gözlemlenen doku iskelelerinin stereomikroskop görüntüleri (Şekil 4.8) ve kumpas ile ölçüm bilgilerine göre kürlenmeden önceki çapı 1,4 cm iken kürleme işlemi sonrası HAP katkılı iskelelerin genelde 1,15, diğer iskelelerin 1,2 cm'e düştüğü hesaplanmıştır. Bu durumda kürleme işlemi sonrası filament ve filamentler arası boşluk boyutlarında değişme meydana geldiği anlaşılmaktadır.

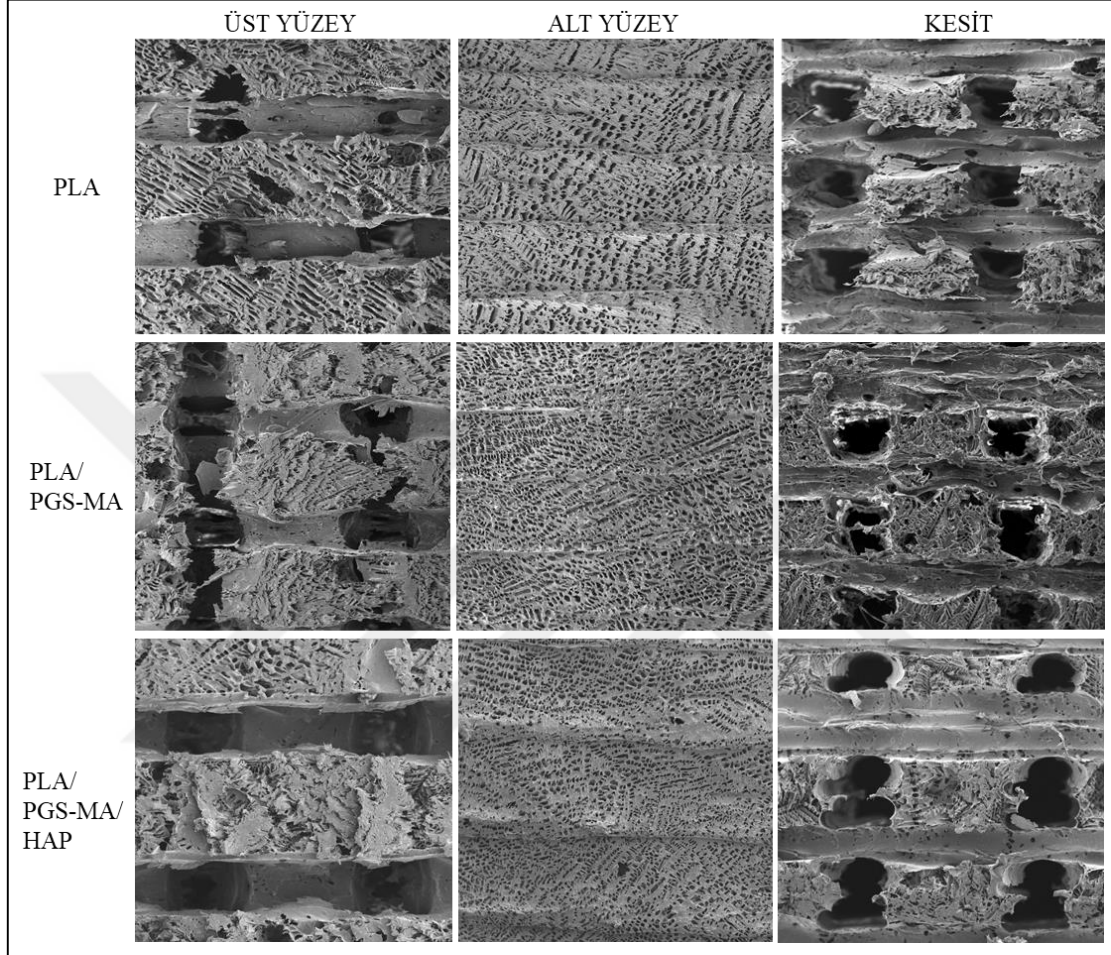
İskelelerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri 100X büyütmede alındı (Şekil 4.9). Taramalı elektron mikroskobu analizine göre iskele ölçülerinin belirlenmesi için farklı bölgelerden uzunluk ölçümü yapıp ortalamaları alınmıştır. PLA örneği için filament

kalınlığı ortalama 642,3 μm , filamentler arası mesafe ise ortalama 350,4 μm olarak; liyofilizasyon işlemi sebebiyle filamentlerde oluşan gözeneklerin çapı ortalama 50,85 μm olarak ölçülmüştür. PLA/PGS-MA örneği için filament kalınlığı ortalama 701,4 μm , filamentler arası boşluk 400 μm , gözenek çapı 23,8 μm ; PLA/PGS-MA/HAP örneği için filament kalınlığı 605 μm , filamentler arası mesafe 420,5 μm , gözenek çapı ise 30,6 μm olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.8. Doku iskelelerinin kurlanmeden önceki ve sonraki stereomikroskop görüntüleri (soldan sağa öncesi ve sonrası), (a) PLA, (b)PLA/PGS-MA, (c) PLA/PGS-MA/HAP

İskelenin alt yüzeyinin kapalı olmasının, hücrelerin iskele içinde kalmasına destek olacağı düşünülmüştür. Üretim metoduna bağlı olarak küçük gözenekler olduğu görülse de hücre kaybını minimize etmeyi kolaylaştıracaktır.



Şekil 4.9. PLA, PLA/PGS-MA ve PLA/PGS-MA/HAP iskelelerin SEM görüntüleri (100X büyütme).

4.3.3. Doku İskelelerinin Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi

Kompozit diskler bölüm 3.6.1’de anlatıldığı gibi mekanik teste tabi tutuldu. PLA diskin elastiklik modülü $42,35 \pm 4,38$ MPa, PLA/PGS-MA diskin elastiklik modülü $52,10 \pm 5,73$ MPa, PLA/PGS-MA/HAP diskin elastiklik modülü ise $47,07 \pm 2,48$ MPa olarak belirlendi. PGS-MA’nın varlığının PLA doku iskelesinin elastiklik modülünde artış sağladığı açıkça görülmektedir. Bunun PLA/PGS-MA iskelesinde bulunan metakrilat gruplarının ısının arttırılması sonucu kendi aralarında ve PLA’nın yapısındaki çift bağları açarak çapraz bağ oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Malzemelerin akma noktası değerleri ise PLA için $2,82 \pm 0,23 \text{ N/mm}^2$, PLA/PGS-MA için $3,67 \pm 0,10 \text{ N/mm}^2$, PLA/PGS-MA/HAP için $2,71 \pm 0,06 \text{ N/mm}^2$ olarak ölçülmüştür. Bu da saf PLA'ya kıyasla malzemenin kalıcı olarak şekil değiştirmeden önce taşıyabildiği yük miktarının PGS-MA eklenmesiyle arttığını kanıtlar niteliktedir. Bunun PLA'nın düzensiz amorf ve kristalin yapısı içinde dağılan PGS-MA'nın çapraz bağlar oluşturmasıyla yapıya kattığı sert elastikiyetin kırılabilirliği azaltmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. HAP katkılı kompozitte HAP seramiğinin PGS-MA'nın çapraz bağlarının oluşmasına engel olarak bu elastikiyet özelliğinin tam olarak malzemeye yansımadağı düşünülmektedir. Ek-D'de malzemelerin gerilme-şekil değişimi grafiğı verilmiştir.

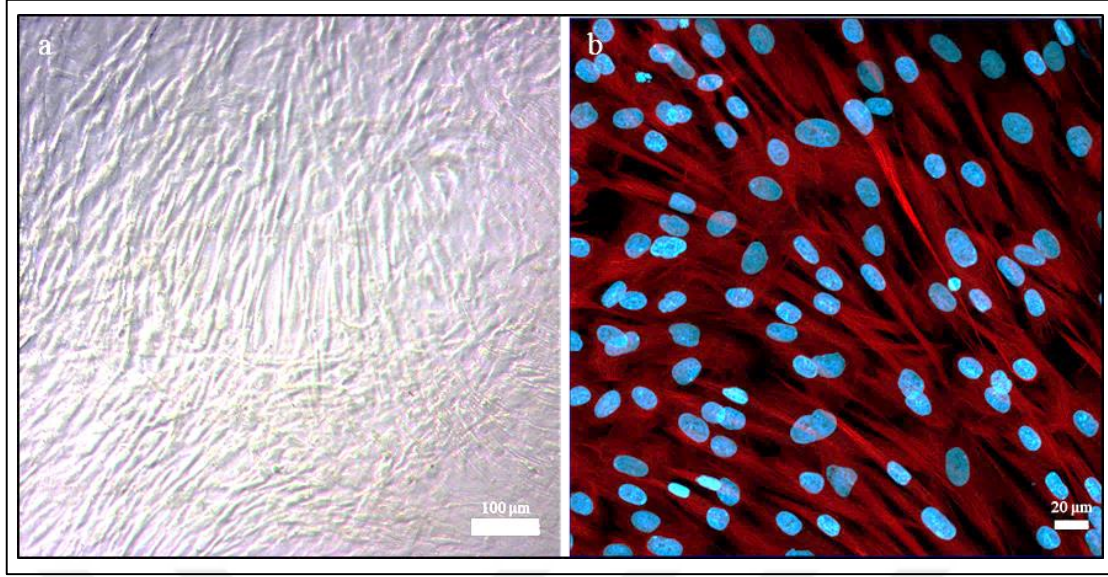
4.4. İnsan Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Adipoz doku kökenli kök hücrelerin karakterizasyonu için hücrelere yüzey antijeni analizi yapılmış, hücrelerin osteojenik ve adipojenik farklılaşma kapasiteleri belirlenmiştir.

4.4.1. Hücrelerin Mikroskopik Yöntemlerle İncelenmesi

İzolasyon sonrası pasaj 3'e gelen hücreler inkübasyonun 3. gününde ışık mikroskobu ile plastik kuyucuk yüzeyine tutunabilirliğini ve morfolojisini belirlemek için görüntülenmiştir (Şekil 4.10 (a)).

Üçüncü pasaj sonrası İbidi marka kuyucuklu cam slayt fibronektin ile kaplanarak yüzeye ekim gerçekleştirilmiştir. Fibroblastik yapıda (iğsi) hücreler olan mezenkimal kök hücreler Vimentin pozitif olduğundan izolasyonu yapılan hücrelerin morfolojisinin belirlenmesi ve mezenkimal kök hücre olduklarının kanıtlanması amacıyla anti-vimentin antikoruna ile işaretlenerek hücre iskeleti boyaması ve DAPI çekirdek boyaması yapıldı. Boyama ardından konfokal mikroskopta $9,5 \mu\text{m}$ derinlikte z-stack üç boyutlu görüntü alınarak hücrelerin tümünün vimentin pozitif olduğu kanıtlanmıştır (Şekil 4.10 (b)).

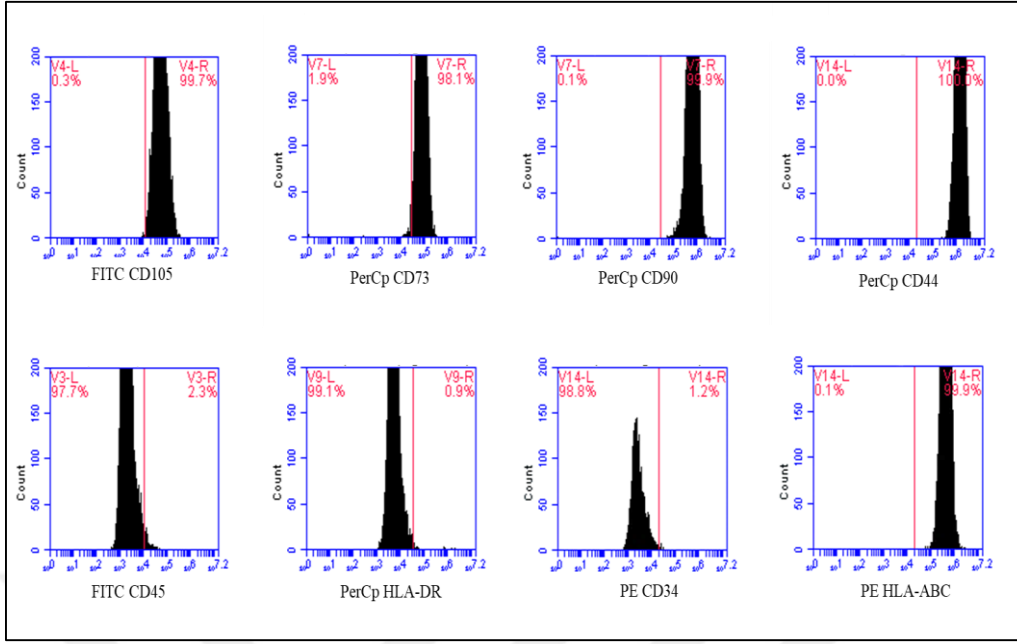


Şekil 4.10. Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin (a) ışık mikroskobu görüntüsü, (b) anti-vimentin ile immün boyama sonrası konfokal mikroskop görüntüsü.

4.4.2. Hücrelerin Yüzey Antijeni Analizi

Üçüncü pasaja gelen mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu için hücreler FITC CD 105, PerCp CD73, PerCp CD90, PerCp CD44, PerCp CD45, PerCp HLA-DR, PE CD34 ve PE HLA-ABC antikorlarıyla işaretlenerek akış sitometri cihazında analiz edilmiştir. Özgün olmayan bağlanmaların tespiti için sonuçlar bu antikorların izotipleri ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.11’de izole edilen adipoz doku kökenli hücrelerin mezenkimal kök hücre belirteci olan CD105, CD73, CD90, CD44 ve HLA-ABC antijenlerini ifade ettiği, hematopoietik hücre belirteci olan CD45, CD34 ve HLA-DR antijenlerini ise ifade etmediği görülmektedir.

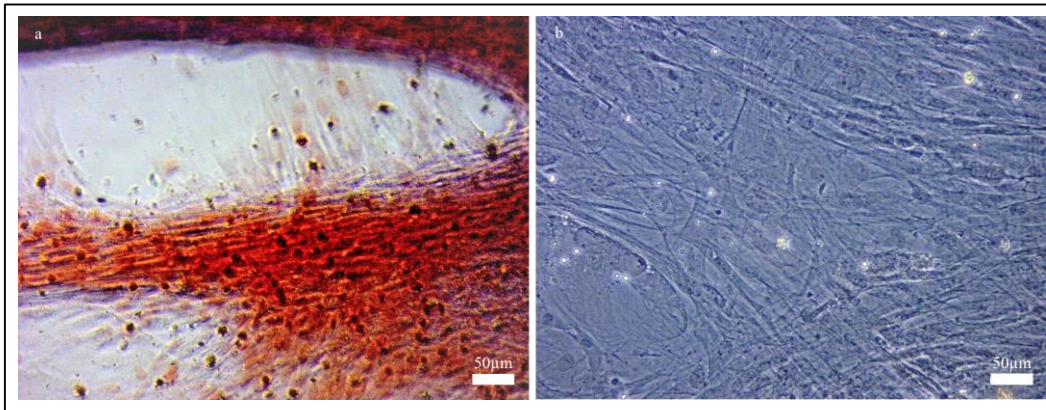
Şekil 4.11’de okunabilen yüzde değerlerine göre, hücrelerin antijenlere özgün bağlanma gerçekleştirdiğini, izolasyonu yapılan hücrelerin hedeflenen hücreler olduğunu ve popülasyon saflığının yüksek olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 4.11. Hücrelerin akış sitometrisi ile karakterizasyon verileri.

4.4.3. Hücrelerin Osteojenik Farklılaşma Kapasitesinin Belirlenmesi

Osteojenik farklılaşmanın tayini için 24 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler kuyucuğu tamamen kaplayınca büyüme besiyeri osteojenik farklılaşma besiyeri ile değiştirildi. Üç günde bir tazelenen osteojenik besiyerinde 21 gün boyunca inkübe edilen hücreler ve bu inkübasyon süresince kontrol besiyerinde inkübe edilen kontrol kuyucuğu 21 gün sonunda % 4 PFA ile oda sıcaklığında 20 dakika bekletilerek sabitlendikten sonra Alizarin Red solüsyonu ile boyandı.

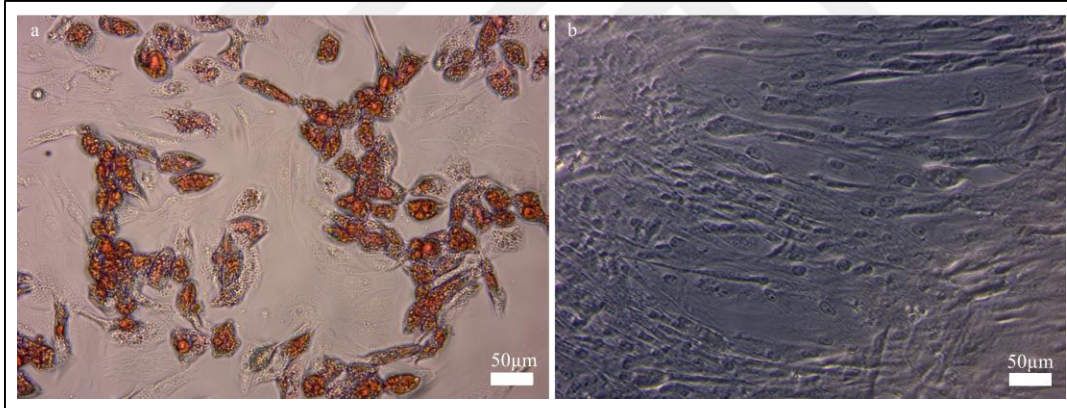


Şekil 4.12. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaştırma ile oluşturduğu kemik mineralinin Alizarin red boyaması sonrası ışık mikroskobu görüntüleri. (a) Osteojenik farklılaşma grubu, (b) kontrol grubu.

Boyama sonucunda osteojenik farklılaşma protokolüne tabi tutulan hücrelerin farklılaşarak oluşturduğu mineraller kırmızı boyanarak hücrelerin farklılaşabildiği kanıtlanmıştır (Şekil 4.12 (a)). Kontrol grubunda boyanma söz konusu değildir (Şekil 4.12 (b)).

4.4.4. Hücrelerin Adipojenik Farklılaşma Kapasitesinin Belirlenmesi

Adipojenik farklılaşmanın gözlemlenmesi için 24 kuyucuklu plakaya ekimi gerçekleştirilen hücreler %100 yoğunluğa erişince büyüme besiyeri adipojenik farklılaşma besiyeri ile değiştirilerek farklılaşma süreci başlatıldı. 14 gün sonunda adipojenik farklılaşma uygulanan hücre grubu ve kontrol grubu % 4 PFA ile sabitlendikten sonra Oil Red O boyaması gerçekleştirildi. Boyama işlemi sonunda adipojenik farklılaşma protokolü uygulanan hücrelerin oluşturduğu yağ damlacıkları ışık mikroskopunda görüntülendi (Şekil 4.13 (a)). Kontrol grubunda boyanma gerçekleşmemiştir (Şekil 4.13 (b)).



Şekil 4.13. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin adipojenik farklılaştırma ile oluşturduğu yağ damlacıklarının Oil Red O boyaması sonrası ışık mikroskobu görüntüleri. (a) Adipojenik farklılaşma grubu, (b) kontrol grubu.

4.5. Doku İskelelerindeki Hücresel Davranışın Değerlendirilmesi

4.5.1. İskeleler Üzerinde Hücre Canlılığı ve Çoğalmasının Belirlenmesi

İskelelerin hücre canlılığı ve çoğalmasına etkisinin belirlenmesi için floresan Canlı-Ölü hücre boyaması, floresan Phalloidin-DAPI boyaması ve kantitatif bir yöntem olan Presto Blue hücre çoğalma testi gerçekleştirilmiştir.

4.5.1.1. Canlı-Ölü Hücre Boyaması

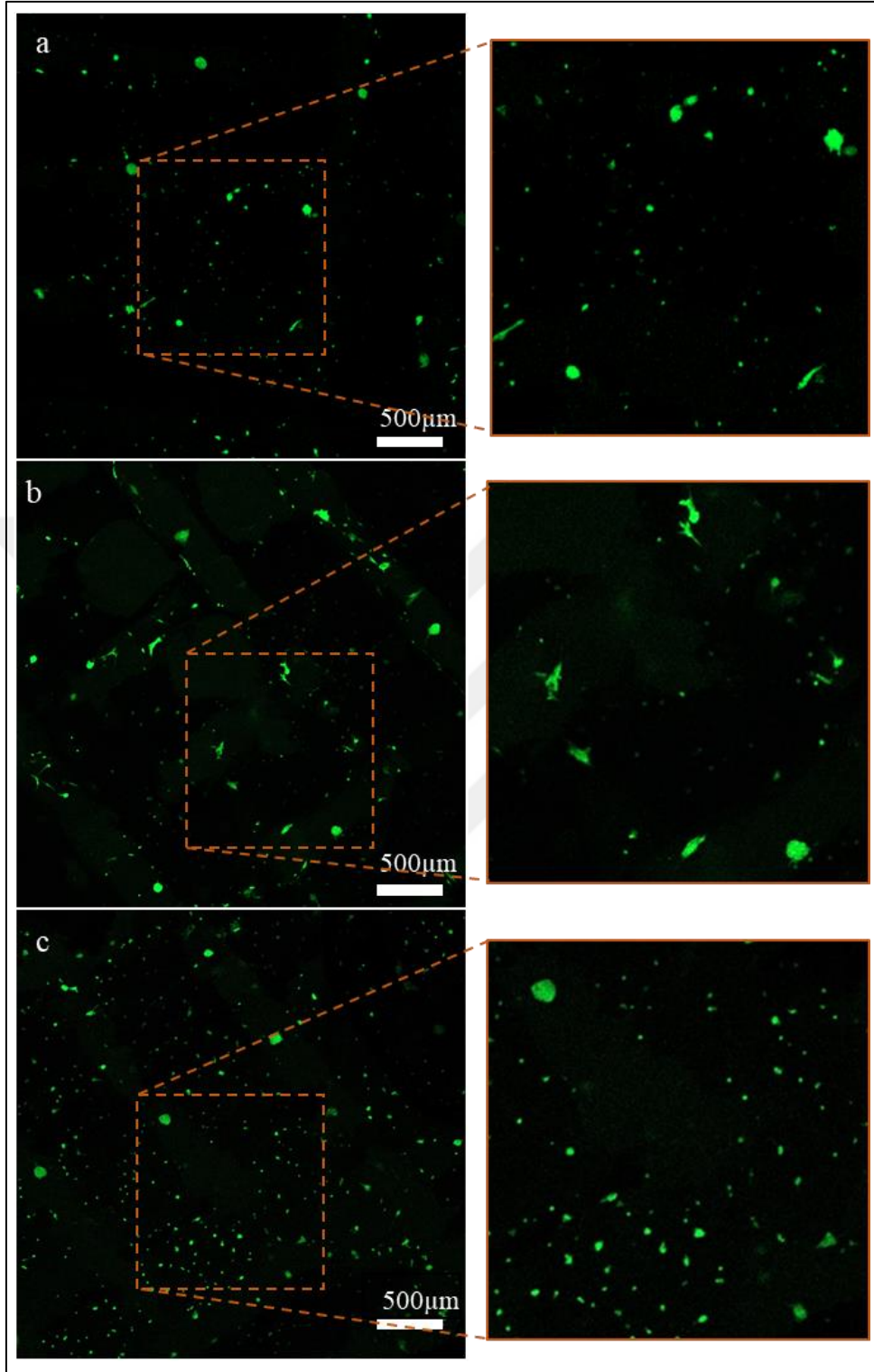
İskeleler üzerine ekim gerçekleştirildikten 24 saat ve 7 gün sonra canlı-ölü hücre boyaması yapıldıktan sonra konfokal mikroskop ile görüntüsü alınarak hücre canlılığı değerlendirildi. 24 saat sonunda görüntülenen iskelelerin hiçbirinde toksik etki görülmemiştir (Şekil 4.14).

Hücreler çoğunlukla birbiriyle küme yapmış halde olsa da uzanan hücrelerin varlığı da görülebilmektedir. PGS-MA katkılı iskelede (Şekil 4.14(b)) tutunup uzanan hücre sayısı diğer iskelelere göre daha fazla durumdadır. En az hücre uzanmasının görüntülediği iskele ise HAP katkılı iskeledir (Şekil 4.14(c)).

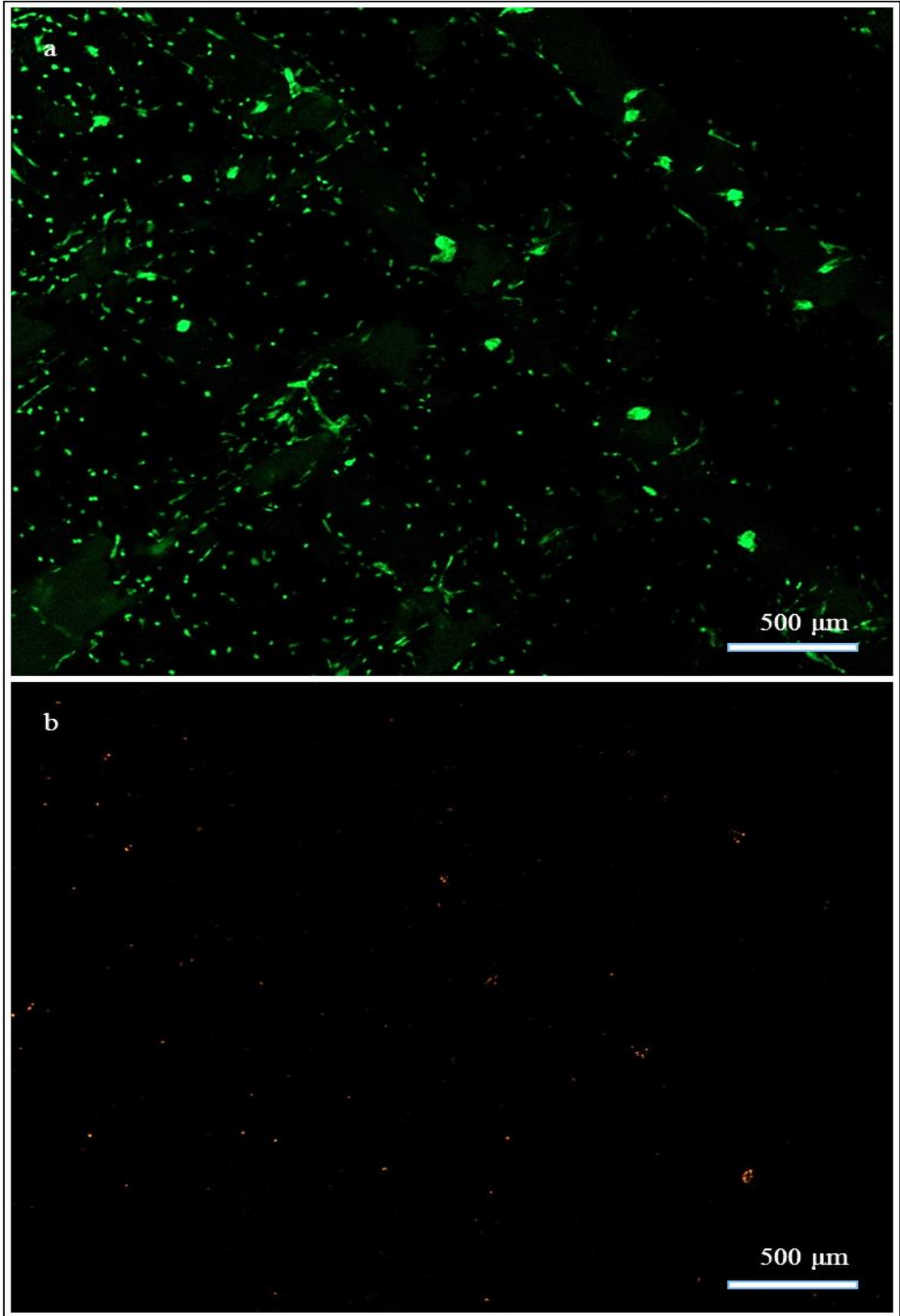
7. günde yapılan canlı-ölü hücre boyamasına göre tüm iskele türlerinde hücre kümelerinin açılmaya ve hücrelerin iskele üzerine yayılmaya başlamış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17). Yine en çok hücre uzanmasının olduğu iskelenin PGS-MA katkılı iskele olduğu Şekil 4.16'de görülmektedir.

Hücre ölümlerinin çoğunun hücre kümeleri içinde meydana geldiği görüntülerden anlaşılmıştır, hücre kümelenmelerinin en çok olduğu HAP katkılı iskelede doğru orantılı olarak daha fazla ölü hücre bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.17).

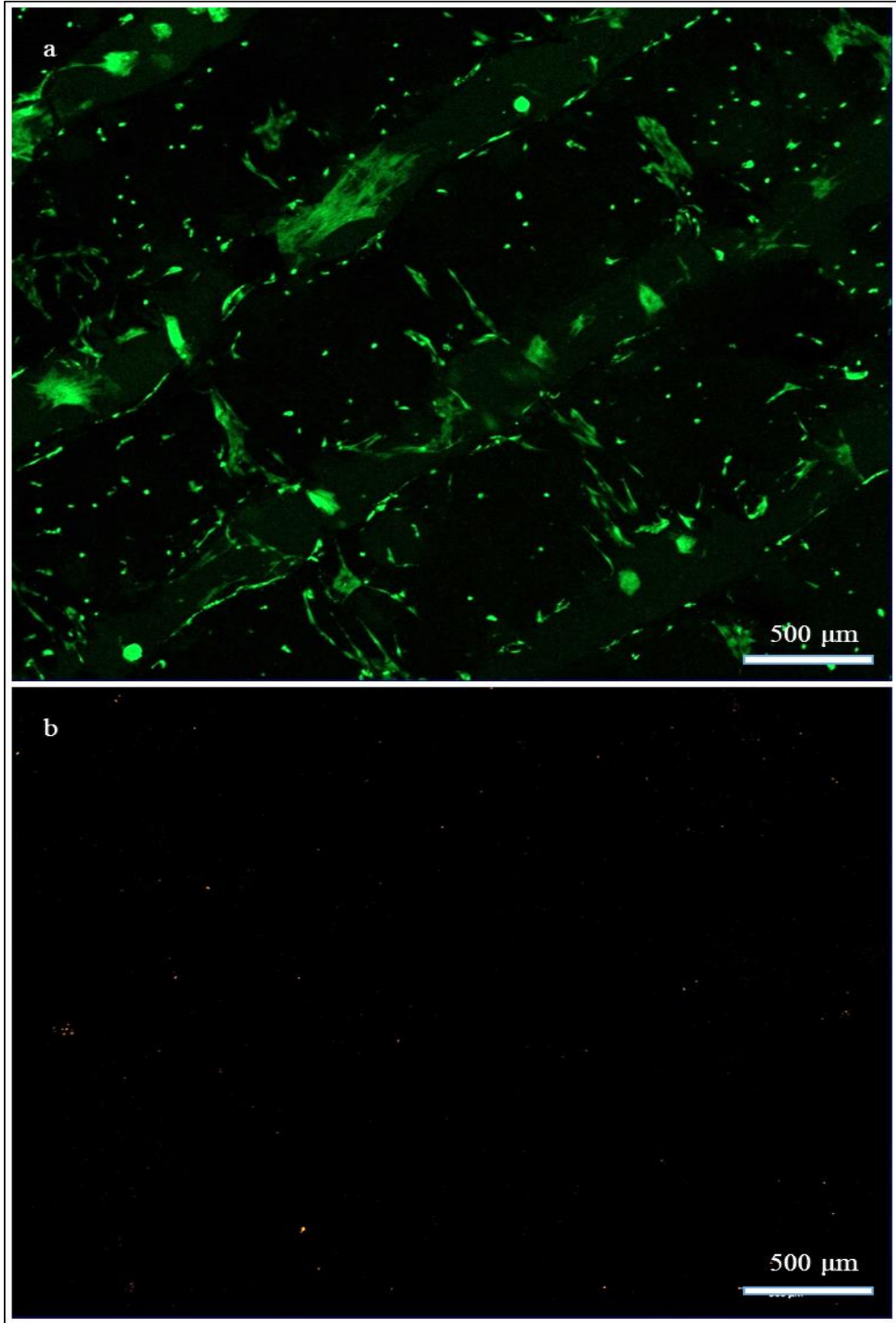
İskele filamentlerinin yerleşimi de 390 nm dalga boyunda yaptığı ışına sayesinde gözlemlenebilmektedir. Boşluklu yapıda özellikle filament kenarlarında hücrelerin tutunmuş olduğu söylenebilir.



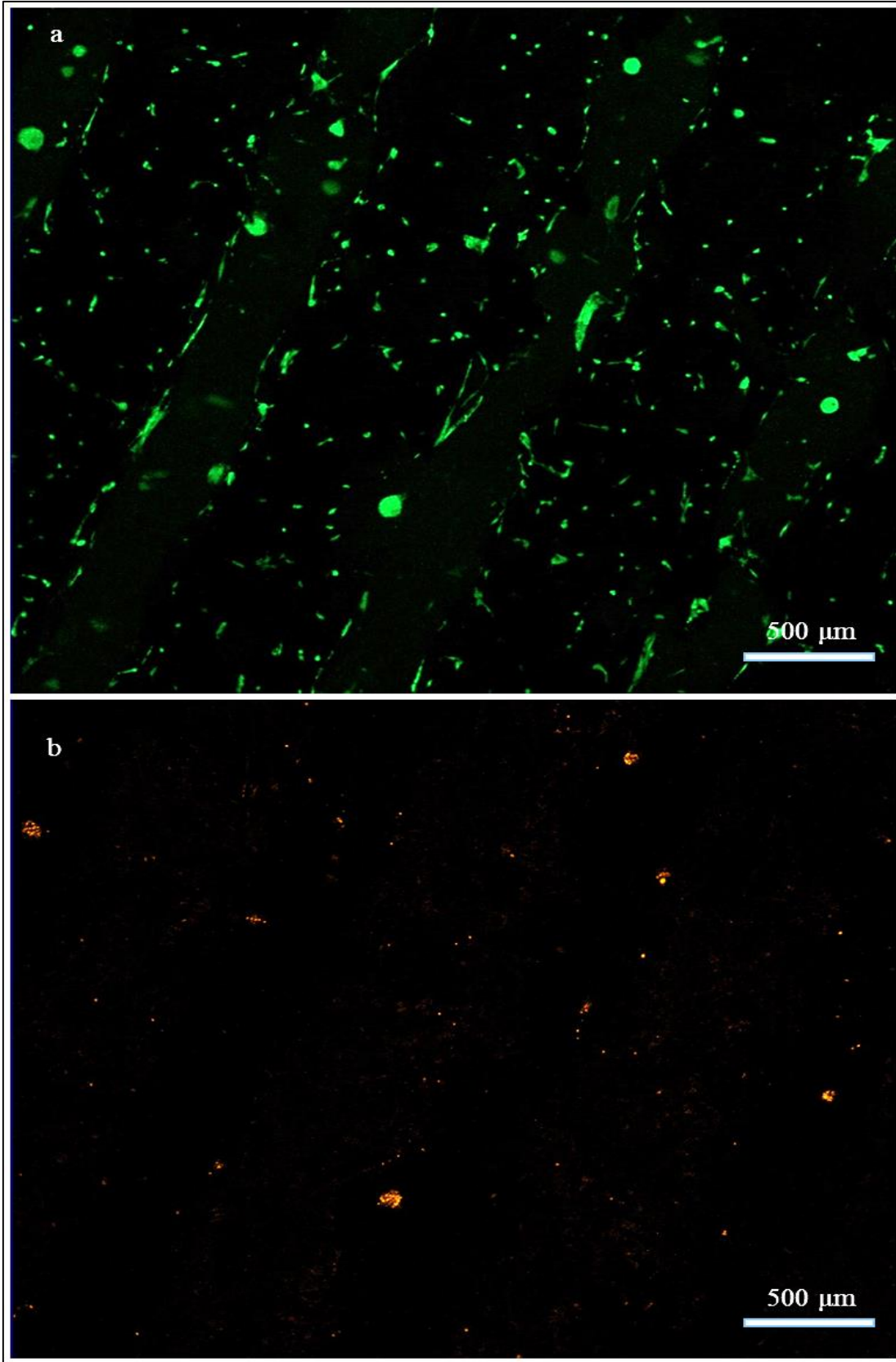
Şekil 4.14. İskele üzerinde 24 saat sonunda canlı- ölü hücre boyaması ile elde edilmiş canlı hücre görüntüleri. (a) PLA, (b)PLA/PGS-MA, (c)PLA-PGS-MA/HAP iskele üzerindeki canlı hücreler.



Şekil 4.15. PLA iskele üzerinde 7. gün canlı-ölü hücre boyaması konfokal mikroskop görüntüleri. (a) Canlı (b) Ölü.



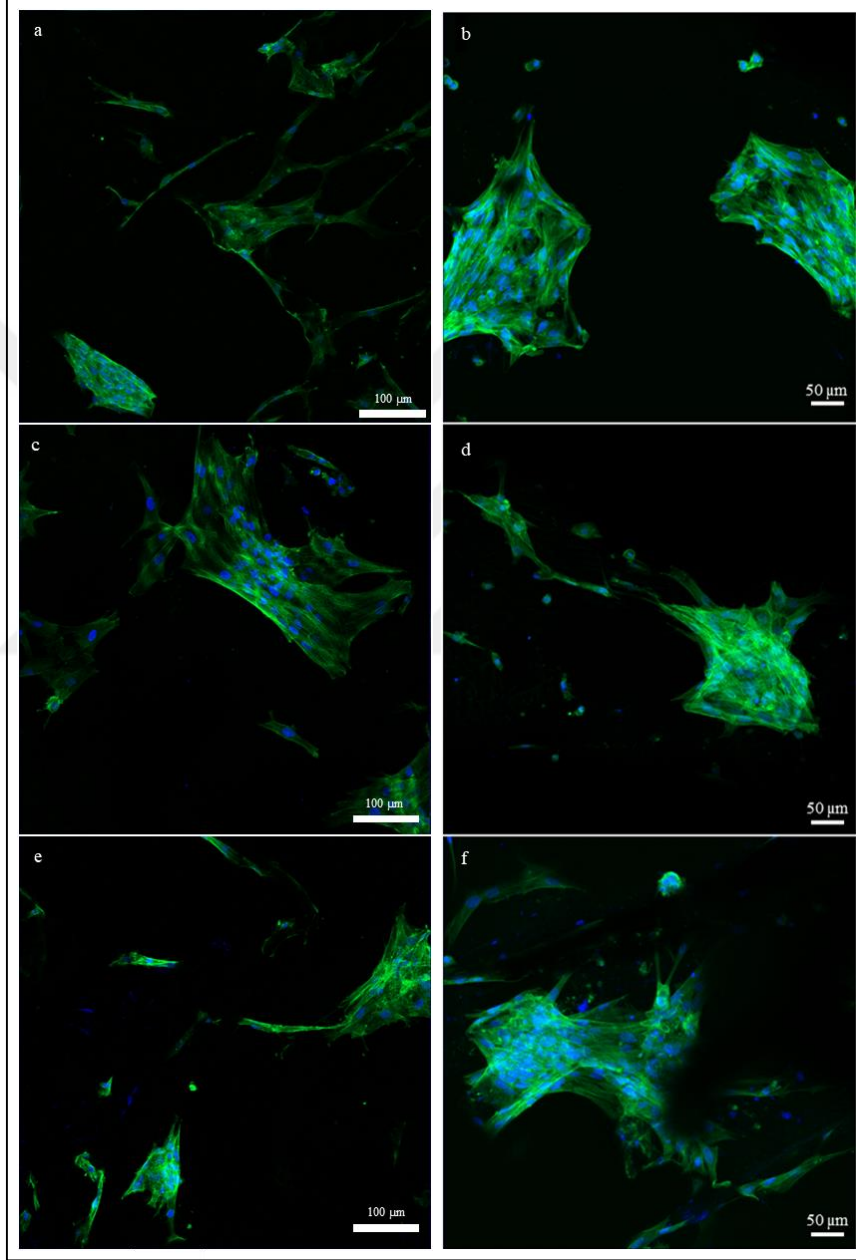
Şekil 4.16. PLA/PGS-MA iskele üzerinde 7. gün canlı-ölü hücre boyaması konfokal mikroskop görüntüleri. (a) Canlı (b) Ölü.



Şekil 4.17. PLA/PGS-MA/HAP iskele üzerinde 7. gün canlı-ölü hücre boyaması konfokal mikroskop görüntüleri. (a) Canlı (b) Ölü.

4.5.1.2. Phalloidin-DAPI Boyaması

İskelelere hücre ekimi gerçekleştirildikten 7 gün sonra ve 21. günde iskele yüzeyinde hücre yayılmasını gözlemlemek için hücrelerin F-aktin filamanları Phalloidin ile, çekirdekleri ise DAPI boyası ile boyandı ve hücreler konfokal mikroskopta görüntüldü.

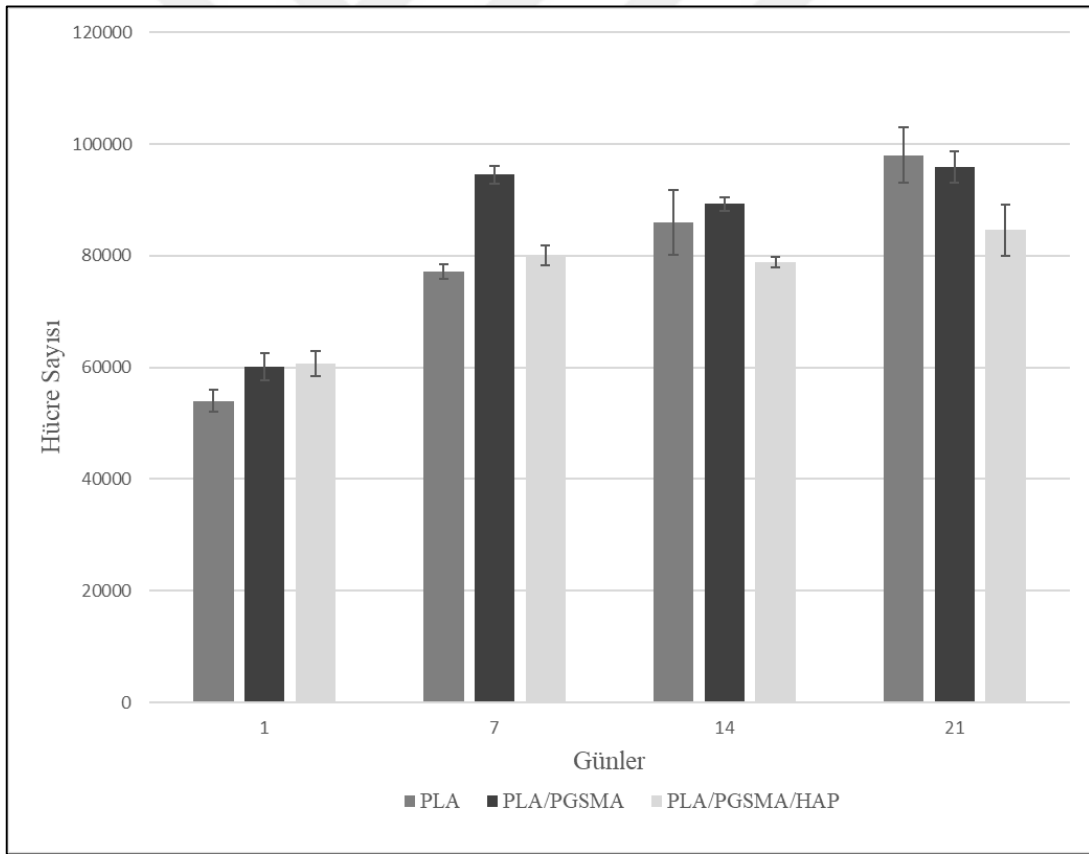


Şekil 4.18. İskeleler üzerindeki hücrelerin 7. gün ve 21. gün Phalloidin- DAPI boyaması konfokal mikroskop görüntüleri; (a) PLA, 7.gün, (b) PLA, 21. Gün, (c) PLA/PGS-MA, 7. Gün, (d) PLA/PGS-MA, 21. Gün, (e) PLA/PGS-MA/HAP, 7.gün, (f) PLA/PGS-MA/HAP.

7. günde yapılan boyamada görüntüler 7. gün canlı-ölü hücre boyamasını destekler nitelikte, hücre kümeleri içermektedir. Hücre kümesi yoğunluğunun PLA iskele ve HAP içeren iskelede daha çok olduğu, PLA/PGS-MA yüzeyinde kümelerde yer alan hücrelerin yüzey ile daha iyi etkileşerek yayıldığı görülmüştür. 21.günde tüm iskele türlerinde hücre kümelerinin açılıp hücrelerin yayılmaya başladığı gözlemlenebilmektedir (Şekil 4.18).

4.5.1.3. Presto Blue Testi

24. saat sonunda gerçekleştirilen Presto Blue testi ile PLA/PGS-MA ve PLA/PGS-MA/HAP iskelelerine PLA iskeleye kıyasla daha çok hücre tutunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19). HAP içeren iskelede 7. günden itibaren hücre çoğalma hızının oldukça azaldığı, diğer iki iskele grubunda ise genel olarak çoğalma hızının daha yüksek olduğu ve benzer bir eğilime sahip olduğu görülmüştür.



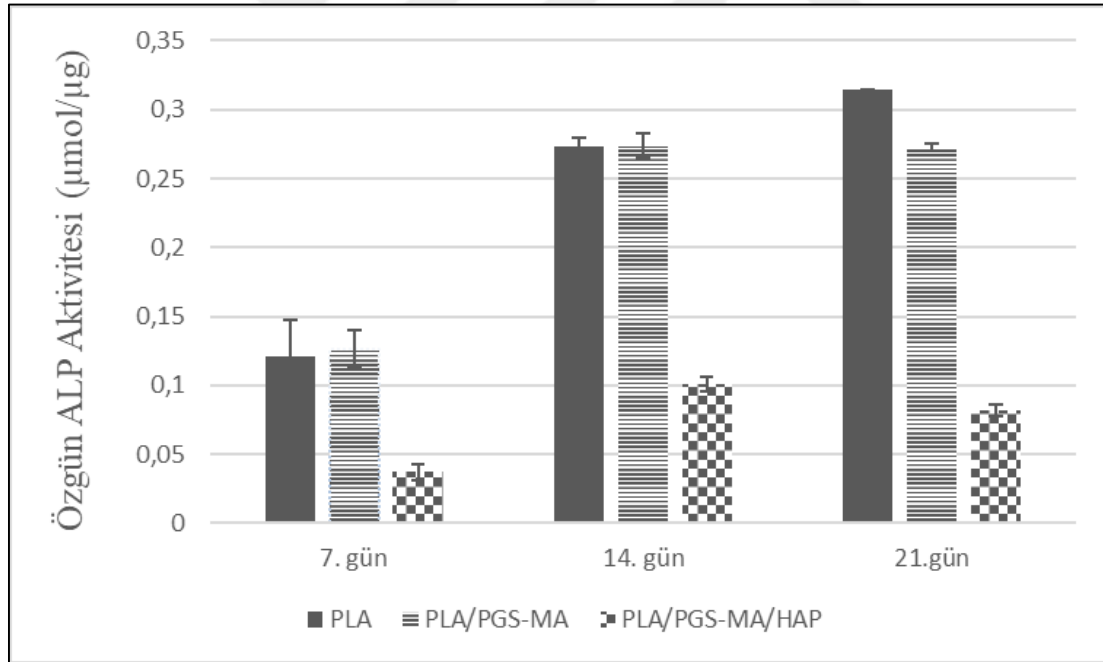
Şekil 4.19. Presto Blue Testi ile belirlenmiş iskeleler üzerindeki canlı hücre sayıları.

4.5.2. İskele Üzerindeki Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasının İncelenmesi

İskelelere ekimi yapılan hücrelerin osteojenik farklılaşmasını belirlemek için hücrelerin ürettiği Alkalın fosfataz enzimi miktarı belirlenmiştir. Osteojenik farklılaşma sonucu oluşan mineralizasyon Alizarin Red boyaması ve otofloresan olan tetrasiklinin hücre kültüründe kullanımı ile görüntülenmiştir. İskelelerin yüzeyindeki mineralizasyon SEM ile de görüntülenmiştir.

4.5.2.1. Osteojenik Farklılaşmanın ALP Testi ile Belirlenmesi

Hücre zarı ile ilişkili bir enzim olan, hücre dışı kemik mineralizasyonunu tetikleyen Alkalın fosfataz enzimi (ALP) osteoblastik aktivitenin erken bir belirteçidir (An ve diğ., 2012). Farklı iskeleler üzerine ekimin ardından osteojenik farklılaşma protokolüne maruz bırakılan hücrelere 7, 14 ve 21. günlerde uygulanan ALP aktivitesi testi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.20’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



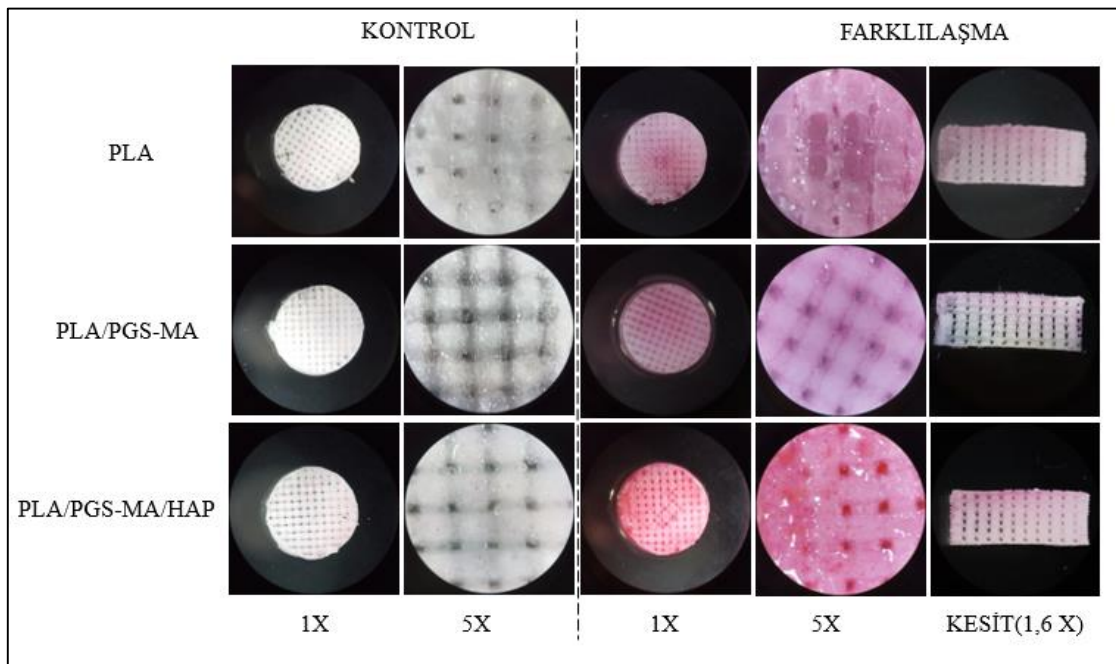
Şekil 4.20. İskele üzerindeki hücrelerin ALP enzimi aktivitesi

İnsan periodontal ligament hücrelerinin osteojenik farklılaşması ve mineralizasyonu üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışmada kalsiyum ve fosfat iyonlarını yüksek seviyelerde içeren örneklerde mineralizasyonun daha erken aşamalarda meydana geldiğine ve ALP enzimi salgılanmasının mineralizasyonun gerçekleşmesi ardından

azaldığına literatürde değinilmiştir (An ve diğ., 2012). PLA/PGS-MA/HAP iskelesinde tüm zaman noktalarında diğer iskele türlerine göre daha az ALP aktivitesi görülmesinin bundan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

4.5.2.2. Mineralizasyonun Stereomikroskop ile Görüntülenmesi

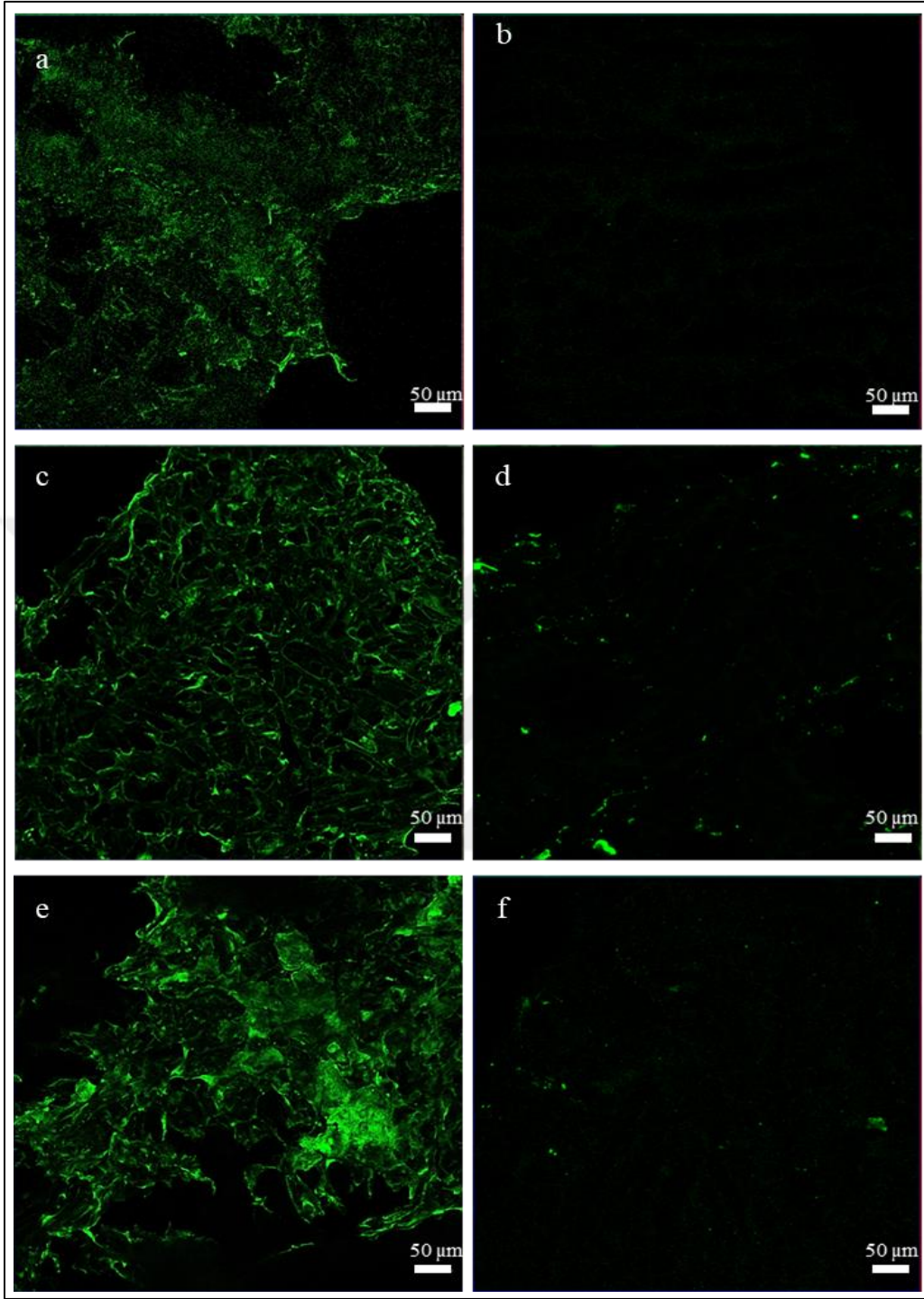
Osteojenik farklılaşmanın 21. gününde fikse edilen iskeleler ve hücresiz kontrol grupları Alizarin Red boyası ile boyanıp stereomikroskop ile 1X ve 5X büyütmede görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. İskeleler üzerinde Alizarin Red boyaması ile görünür hale getirilmiş kemik mineralinin ışık mikroskobu görüntüleri. KIRMIZI: kemik minerali.

4.5.2.3. Mineralizasyonun Floresan Görüntülenmesi

Osteojenik farklılaşma sonucu iskeleler üzerinde hücreler tarafından oluşturulan kemik mineralinin floresan yöntemle gözlemlenmesi amacıyla farklılaşma protokolünde antibiyotik olarak tetrasiklin kullanılmıştır. Bu yöntemle PLA/PGS-MA/HAP iskele içeriğindeki HAP mineralinin boyanmaması nesnel bir kıyaslama yapmayı sağlamıştır. Kontrol grubu olarak hücre ekimi yapılmamış iskelenin görüntüsü alınmıştır. Tetrasiklinin uyarılma dalga boyu olan 390 nm’de uyarılması sonucu elde edilen konfokal mikroskopi görüntüleri Şekil 4.22’te verilmiştir.



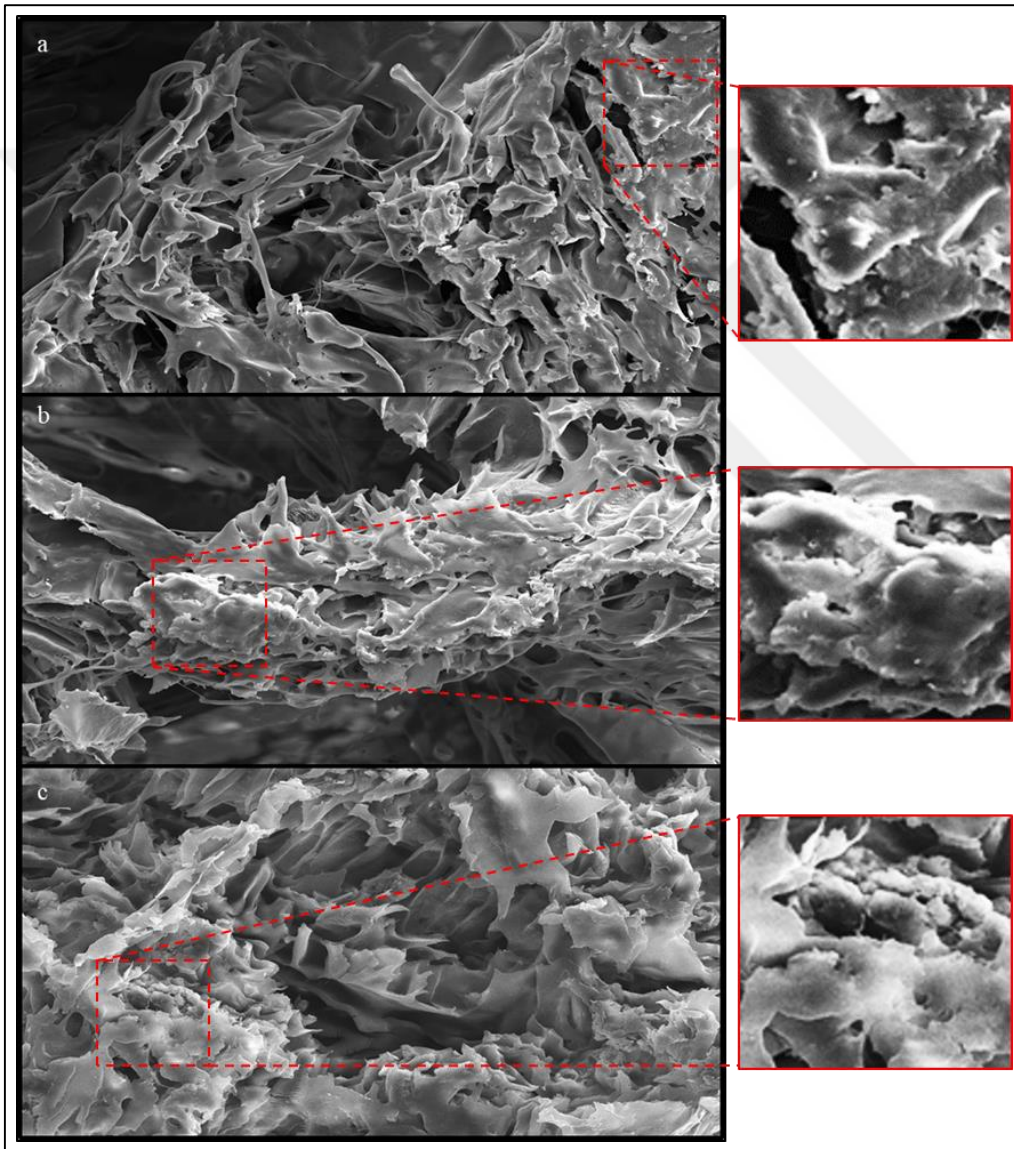
Şekil 4.22. İskeleler üzerinde hücreler tarafından oluşturulan kemik mineralinin otofloresan tetrasiklin ile işaretlenmesi sonucu elde edilen konfokal mikroskopi görüntüleri (a) PLA, (b) PLA kontrol, (c) PLA/PGS-MA, (d) PLA/PGS-MA kontrol, (e) PLA/PGS-MA/HAP ve (f) PLA/PGS-MA/HAP kontrol

390 nm dalgaboyunda PGS molekülünün yaptığı oto-ışılma PLA/PGS-MA ve PLA/PGS-MA/HAP iskelelerinin kontrol gruplarında görülebilmektedir. Tetrasiklin serbest olan kalsiyuma tutunduğu için iskeleler üzerindeki floresan sinyal hücreler tarafından

biriktirilen ve kemik minerali içinde yer alan kalsiyumu işaret etmektedir. Tüm iskelelerde kemik minerali birikimi gözlenmiştir ancak en yoğun kemik minerali kümelenmesi HAP katkılı iskelede tespit edilmiştir (Şekil 4.22 (e)).

4.5.2.4. Mineralizasyonun Taramalı Elektron Mikroskobu ile Gözlemlenmesi

PLA/PGS-MA ve PLA/PGS-MA/HAP iskelelerde PLA iskeleye kıyasla daha çok kemik minerali birikimi gözlemlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Osteojenik farklılaşma protokolü uygulanan doku iskelelerinin SEM görüntüleri (a) PLA, (b) PLA/PGS-MA, (c) PLA/PGS-MA/HAP. Kemik mineralinin gözlemlendiği bölgelerden bazıları büyütülerek gösterilmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

PLA, zayıf tokluk özelliği ile bilinen, kırılğan ve yüksek erime sıcaklığına sahip olan termoplastik bir polimerdir. Reaktif yan grupları olmayan lineer bir polimer olduğundan özelliklerini iyileştirmek için yapılabilecek modifikasyonlar sınırlıdır. Düşük hidrofilisitesi sebebiyle polimer-doku etkileşiminde de eksiklik gösterir. Malzemenin tüm bu olumsuzluklarını iyileştirmek için kırılğanlığını azaltmak ve biyoaktivitesini arttırmak amacıyla PGS-MA ile karışımı hazırlanmış, mekanik dayanımının artması ve hücreleri osteojenik farklılaşmaya teşvik etmesini sağlamak için de bu iki polimere HAP katılmıştır. İskelelere hücre tutunmasında PLA'nın hidrofobik etkisini azaltmak için oksijen plazma uygulanmış ve FBS kaynaklı proteinlerin iskele yüzeyine tutunması sağlanıp hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir.

PLA'nın yüksek erime sıcaklığında ekstrüzyonlu basımının yapılması termoset bir polimer olan PGS'nin bozunmasına sebep olduğundan ve çözelti halinde basım sırasında PLA filamentlerinin çözücü uçurma sonrasında filmleşmesi gibi sebeplerle iskele üretiminin kalıp kullanarak çözücü uçurma yöntemi ile üretilmesi tercih edilmiştir. Bu yöntemle üretim iskeledeki filament kalınlıklarının ve gözenek çaplarının sabit olmasını sağlarken polimer çözeltisi aktarımı ve kalıp yerleştirme gibi basamaklarda oluşan hava kabarcıklarının iskele içinde kalması ve liyofilizasyon sürecinin doğal bir parçası olarak meydana gelen minik hava boşluklarının oluşması gibi sebeplerle özellikle iskelenin mekanik özelliklerinin tekrar edilebilirliğinde olumsuz etki göstermiştir.

Dolaylı olarak üç boyutlu basım yöntemi ile üretilen PLA, PLA/PGS-MA doku iskelelerine uygulanan fiziksel ve mekanik karakterizasyon testlerinin sonuçlarına göre PLA iskeleye PGS-MA katılması ve sıcaklıkla kürlenme işlemi sonrası oluşan PLA/PGS-MA iskelenin PLA iskeleye göre daha yüksek mekanik mukavemete ve akma noktasına sahip olduğu gösterilmiştir.

İskelelere uygulanan hücre deneyleri sonucuna göre, hidrofobik olduğu bilinen PLA iskeleye kıyasla PGS-MA katkılı iskelenin hücre çoğalması ve farklılaşmasını daha iyi desteklediği görülmektedir. PGS-MA katkılı iskelede, diğer iskelelere kıyasla daha az sayıda hücre kümesinin oluşu, hücre yayılmasının ekimden sonraki erken süreçte

başlamasından, dolayısıyla PGS-MA katkısının yüzey özelliklerini olumlu etkilemesinin bir sonucu olduğu görülmektedir.

PLA/PGS-MA/HAP doku iskelesinin osteojenik farklılaşmaya daha iyi etki ettiği mineralizasyonun tetrasiklin deneyi ve osteojenik farklılaşma sonrası çekilen taramalı elektron mikroskobu görüntüleri ile tayini yoluyla gözlemlenmiştir. ALP deneyi sonuçlarına göre PLA/PGS-MA/HAP iskelede ALP enzimi aktivitesinin az olması, HAP katkısının mineralizasyonun erken indüklenmesine sebep olması ve aktif mineralizasyon sürecinden sonra azalan ALP enzim aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

PGS-MA, viskoz ve elastik bir polimer olmasıyla yumuşak doku mühendisliği uygulamalarında da sıklıkla tercih edilmektedir. Metakrilat uçları polimerin fotobaşlatıcı kullanımı ile ışıkla çapraz bağlanabilmesine de olanak sağlamaktadır. PGS-MA molekülünün PLA yerine daha reaktif olan PLGA gibi formlarıyla yahut reaktivitesi artırılmış PLA polimeri ile kullanımı da etkili olabilir.

Liyofilizasyon yoluyla üretilmiş olan sünger iskeledeki gözeneklilik dolayısıyla iskelenin sert kemiğe göre düşük olan mekanik dayanım özelliği; yük taşıyan sert kemik dokuların onarımında uygulanmasındansa, yük taşımayan sert kemik bölgelerinde yahut trabeküler kemik hasarı onarımında kullanılmasını daha uygun kılmaktadır. Liyofilizasyon temelli problemleri ve kalıp kullanımından dolayı kalıptaki kusurları taklitten kaynaklanan fiziksel kusurları ortadan kaldırmak için PGS-MA polimerinin zarar görmeyeceği kadar düşük erime sıcaklığına sahip ve yüksek mukavemetli bir polimer ile karışım halinde ekstrüzyon bazlı iskelesinin üretilmesi kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanışlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Altunatmaz, K., (2004). Kırık İyileşmesinin Biyolojisi ve Biyolojik Osteosentez. *İstanbul Univ. Vet. Fak. Derg.*, 30(1), 141-147.
- Anandhapadman, A., Venkateswaran, A., Jayaraman, H., Ghone, N. V. (2022). Advances in 3D Printing of Composite Scaffolds for the Repairment of Bone Tissue Associated Defects. *Biotechnology Progress*. DOI: 10.1002/btpr.3234
- An, S., Ling, J., Gao, Y., Xiao, Y. (2012). Effects of varied ionic calcium and phosphate on the proliferation, osteogenic differentiation and mineralization of human periodontal ligament cells in vitro. *Journal of Periodontal Research*, 47,374-382.
- Aydin, H. M., Salimi, K., Rzayev, Z. M. O., Pişkin, E. (2013). Microwave-Assisted Rapid Synthesis of Poly(glycerol-sebacate) Elastomers. *Biomaterials Science*, 1, 503-509. DOI: 10.1039/c3bm00157a
- Bishop, E. S., Mostafa, S., Pakvasa, M., Luu, H. H., Lee, M. J., Wolf, J. M., Ameer, G. A., He, T. C., Reid, R. R. (2017). 3-D Bioprinting Technologies in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Current and Future Trends. *Genes & Diseases*, 4(4), 185–195. DOI: 10.1016/j.gendis.2017.10.002
- Can, A. (2018). Mezenkimal Kök Hücreler. *Kök Hücre*. (363-426). Ankara: Akademisyen Tıp Kitabevi.
- Can, A. (2018). Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler. *Kök Hücre*. (261-290). Ankara: Akademisyen Tıp Kitabevi.
- Celil, A. B., Guelcher, S., Hollinger, J. O., Miller, M. (2007). Tissue Engineering Applications-Bone. Fisher, J.P., Mikos, A.G., Bronzino, J. D. (Ed.), *Tissue Engineering* (21.1-21.22). Boca Raton: CRC Press.
- Christodoulou, I., Kolisis, F.N., Papaevangeliou, D., Zoumpourlis, V. (2013). Comparative Evaluation of Human Mesenchymal Stem Cells of Fetal (Wharton's Jelly) and Adult (Adipose Tissue) Origin during Prolonged In Vitro Expansion: Considerations for Cytotherapy. *Stem Cells International*, (2013). DOI: 10.1155/2013/246134
- Chocholata, P., Kulda, V., Babuska, V. (2019). Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials*, 12(4), 568. DOI: 10.3390/ma12040568
- Chowdhury, S. K., Nagarjuna, V., Bhaskar, B. (2021). Metallic Biomaterials in Tissue Engineering: Retrospect and Prospects. Bhaskar, B., Rao, P. S., Kasoju, N., Nagarjuna, V., Baadhe, R. R. (Ed.), *Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: From Basic Concepts to State of the Art Approaches*. (19-60). Singapore: Springer Publishing.

- Coelho, M. J., Fernandes, M. H. (2000). Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*, 21(11), 1095-1102.
- Collins, M. N., Ren, G., Young, K., Pina, S., Reis, R. L., Oliveira, J. M. (2021). Scaffold Fabrication Technologies and Structure/Function Properties in Bone Tissue Engineering. *Advanced Functional Materials*, 31(21), 2010609. DOI: 10.1002/adfm.202010609
- Çerçi, E., Erdost, H. (2019). Kök Hücre. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 14(2), 221-228. DOI: 10.17094/ataunivbd.483253.
- Davachi, S. M., Babak Kaffashi, B. (2015). Polylactic Acid in Medicine. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 54(9), 944-967.
- Dearnaley, G., Asher, J., Peacock, A. T., Allen, S. J., . Watkins R. E. J. (2007). The use of thin layer activation to evaluate ion beam surface treatments of orthopaedic implant materials. *Surface and Coating Technology*, 201, 8070–8075.
- Eltom, A., Zhong, G., Muhammad, A. (2019). Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019, 1–13. DOI: 10.1155/2019/3429527ghiasi
- Frydrych, M., Román, S., MacNeil, S., Chen B. (2015). Biomimetic poly(glycerol sebacate)/poly(L-lactic acid) blend scaffolds for adipose tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, (18), 40-49.
- Fuchs, R. K., Thompson, W. R., Warden, S. J. (2019). Bone Biology. Pawelec, K., Planell, J. A. (Ed.), Bone Repair Biomaterials: Regeneration and Clinical Applications. *Woodhead Publishing Series in Biomaterials (2nd ed.)*. (15-52), Woodhead Publishing.
- Ghiasi, M. S., Chen, J., Vaziri, A., Rodriguez, E. K., Nazarian, A. (2017). Bone Fracture Healing in Mechanobiological Modeling: A Review of Principles and Methods. *Bone Reports*, 6, 87–100. DOI: 10.1016/j.bonr.2017.03.002
- Ginebra, M.-P., Traykova, T., Planell, J. A. (2006). Calcium phosphate cements: Competitive drug carriers for the musculoskeletal system?. *Biomaterials* 27 (2006), 2171–2177.
- Guerado, E., Caso, E. (2017). Challenges of Bone Tissue Engineering in Orthopaedic Patients. *World Journal of Orthopedics*, 8(2), 87-98. DOI: 10.5312/wjo.v8.i2.87
- Gündeşlioğlu, A. Ö., Altuntaş, Z., İnce, B., Dadacı, M., Aktan, M., Duman, S. (2013). Yağ Doku Kökenli Kök Hücreler ve Plastik Cerrahide Uygulama Alanları. *Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi*, 21(3), 1-10.

- Gürgöl, S., Uzun C., Erdal, N. (2016). Kemik Biyomekaniği, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 8 (1), 18-34.
- Hasırcı, V., Hasırcı, N. (2018). Introduction. *Fundamentals of Biomaterials*. (1-14). New York: Springer.
- Hasırcı, V., Hasırcı, N. (2018). Metals as Biomaterials. *Fundamentals of Biomaterials*. (35-49). New York: Springer.
- Hasırcı, V., Hasırcı, N. (2018). Polymers as Biomaterials. *Fundamentals of Biomaterials*. (65-81). New York: Springer.
- Hasırcı, V., Hasırcı, N. (2018). Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Fundamentals of Biomaterials*. (281-300). New York: Springer.
- Hasırcı, V., Yücel, D., Kenar, H., Selamet, H., Başöz, D., Çam, N., Kıratlı, K. (2022). Tıp Alanında Üç Boyutlu Baskı Uygulamalarındaki Gelişmeler. *TOTBİD Dergisi*, 22(1), 102–111. DOI: 10.5578/totbid.dergisi.2022.16.
- Heise, U., Osborn, J. F., Duwe, F. (1990). Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute. *International Orthopedics*, 14, 329-338.
- Jeon, O. H., Panicker, L. M., Lu, Q., Chae, J. J., Feldman, R. A., Elisseeff, J. H. (2016). Human iPSC-derived Osteoblasts and Osteoclasts Together Promote Bone Regeneration in 3D Biomaterials. *Scientific Reports* 6, 1-11. DOI: 10.1038/srep26761
- Johnson, A. J. W., Herschler, B.A. (2011). A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair, *Acta Biomaterialia* 7 (2011), 16–30.
- Jungbluth, P., Spitzhorn, L. S., Grassmann, J., Tanner, S., Latz, D., Rahman, M. S., Bohndorf, M., Wruck, W., Sager, M., Grotheer, V., Kröpil, P., Hakimi, M., Windolf, J., Schneppendahl, J., Adjaye, J. (2019). Human iPSC-derived iMSCs Improve Bone Regeneration in Mini-Pigs. *Bone Research*, 7:32. DOI: 10.1038/s41413-019-0069-4
- Karadaş, O., Yucel, D., Kenar, H., Torun Kose, G., Hasırcı, V. (2012). Collagen Scaffolds with In Situ-Grown Calcium Phosphate for Osteogenic Differentiation of Wharton's Jelly and Menstrual Blood Stem Cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8(7), 534-545. DOI: 10.1002/term.1555
- Karakeçili, A., Demirtaş, T. T. (2015). Klinisyenler için Doku Mühendisliği Konsepti, Doku İskelesi Fabrikasyon Teknikleri. *Türkiye Klinikleri J Plast Surg-Special Topics*, 4(3), 27-32.

- Karakeçili, A., Tıǧlı Aydın, S., Yılgör Huri, P. (2014). Doku Mühendisliǧi. Asyalı, M. H., Kara, S., Yılmaz, B. (Ed.), *Biyomedikal Mühendisliǧinin Temelleri*. (451-492). Ankara: Nobel.
- Kenar, H. (2003). In Vitro Bone Tissue Engineering On Patterned Biodegradable Polyester Blends. Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Doğal ve Uygulamalı Bilimler Enstitüsü, Ankara, 143156
- Kim, Y. H., Yoon, D. S., Kim, H. O., Lee, J. W. (2012). Characterization of Different Subpopulations from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells by Alkaline Phosphatase Expression. *Stem Cells And Development*, 21(16), 2958-2968.
- Kinard, L., Mikos A., Kasper, F. K. (2013). Bone Engineering. Fisher, J.P., Mikos, A.G., Bronzino, J.D., & Peterson, D.R. (Ed.), *Tissue Engineering: Principles and Practices (1st ed.)*. (536–555). Boca Raton: CRC Press.
- Klein-Nulend, J., Bacabac, R. G., Mullender, M. G. (2005). Mechanobiology of Bone Tissue. *Pathologie Biologie*, 53(10), 576–580. DOI: 10.1016/j.patbio.2004.12.005
- Korkusuz, F., Tomin, E., Yetkinler, D. N., Timuçin, M., Öztürk, A., Korkusuz, P. (2011). Yapay Kemik Dokusu. *TOTBİD Dergisi*, 10(2), 134-142.
- Lacroix, D. (2019). Biomechanical Aspects of Bone Repair. Pawelec, K., Planell, J. A. (Ed.), *Bone Repair Biomaterials: Regeneration and Clinical Applications (Woodhead Publishing Series in Biomaterials) (2nd ed.)*. (53-64), Woodhead Publishing.
- Langer, R., Vacanti, J. P. (1993). Tissue Engineering. *Science*, 260, 920-926. DOI: 10.1126/science.8493529
- Lin, X., Patil, S., Gao, Y. G., Qian, A. (2020). The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Frontiers in Pharmacology*, 11:757. DOI: 10.3389/fphar.2020.00757
- Manzini, B. M., Machado, L. M. R., Noritomi, P. Y., da Silva, J. V. L. (2021). Advances in Bone Tissue Engineering: A Fundamental Review. *Journal of Biosciences*, 46(1), 1-17. DOI: 10.1007/s12038-020-00122-6
- Mohammadi, M. S., Ahmed, I., Muja, N., Rudd, C. D., Bureau, M. N., Nazhat, S. N. (2011). Effect of phosphate-based glass fibre surface properties on thermally produced poly(lactic acid) matrix composites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22(12), 2659-2672.
- Motamedian, S. R., Iranparvar, P., Nahvi, G., Khojasteh, A. (2016). Bone Tissue Engineering: A Literature Review. *Regeneration, Reconstruction & Restoration*, 1(3), 103-120.

- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., Yamanaka, S. (2008). Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science*, 322(5903), 949–953. DOI: 10.1126/science.1164270
- Oryan, A., Kamali, A., Moshiri, A., Baghaban Eslaminejad, M. (2017). Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence?. *Cells Tissues Organs*, 204(2), 59–83. DOI: 10.1159/000469704
- Oyar, P. (2016). Osseointegrasyon ve Kemik Rejenerasyonunda Kemik Doku Mühendisliğinin Yeri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 87-95
- Pashneh-Tala, S., Owen, R., Bahmaee, H., Rekštytė, S., Malinauskas, M., Claeysens, F. (2018). Synthesis, Characterization and 3D Micro-Structuring via 2-Photon Polymerization of Poly(glycerol sebacate)-Methacrylate–An Elastomeric Degradable Polymer. *Frontiers in Physics*, 6:41. 1-17. DOI: 10.3389/fphy.2018.00041.
- Piszko, P., Kryszak, B., Piszko, A., Szustakiewicz, K. (2021). Brief review on poly(glycerol sebacate) as an emerging polyester in biomedical application: Structure, properties and modifications. *Polymers in Medicine*, 51(1), 43-50.
- Rey, D. F. V. St-Pierre, J.-P. (2019). Fabrication Techniques of Tissue Engineering Scaffolds. Mozafari, M., Sefat, F., Atala, A. (Ed.), *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One (1st ed.)*, (109-125). Woodhead Publishing.
- Russias J., Saiz E., Nalla R.K., Gryn K., Ritchie R.O., Tomsia A.P. (2006). Fabrication and mechanical properties of PLA/HA composites: A study of in vitro degradation. *Materials science & engineering. C, Biomimetic and supramolecular systems*, 26(8), 1289-1295.
- Safadi, F. F., Barbe, M. F., Abdelmagid, S. M., Rico, M. C., Aswad, R. A., Litvin, J., Popoff, S. N. (2009). Bone Structure, Development and Bone Biology. Khurana, J. S. (Ed.), *Bone Pathology. (1-50)*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Saiga T., Sato S., Nagai K. (2015). Water vapor solubility of poly(lactic acid) films modified the surface by vacuum ultraviolet irradiation. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(27), 42200(1-8).
- Shi, H., Gan, Q., Liu, X., Ma, Y., Hu J., Yuan, Y., Liu, C. (2015). Poly(glycerol sebacate)-modified polylactic acid scaffolds with improved hydrophilicity, mechanical strength and bioactivity for bone tissue regeneration. *The Royal Science of Chemistry*, 5, 79703-79714.
- Simpson, A. J., Simpson, M. J., Soong R. (2012). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Its Key Role in Environmental Research, *Enviromental Science and Technology*, 46, 11488–11496.

- Sonnaert, M., Papantoniou, I., Luyten, F.P., Schrooten, J. (2015). Quantitative validation of the Presto Blue metabolic assay for on-line monitoring of cell proliferation in a 3D perfusion bioreactor system. *Tissue Eng. Part C Methods* 21, 519–529.
- 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.
- Stickler, M., Rhein, T., (2012). Polymethacrylates. Ley, C., (Ed.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 29,(341-354). Weinheim: Wiley.
- Sultana, N. (2012). Biodegradable Polymer-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Springer Briefs in Applied Sciences and Technology*. Germany: Springer.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019
- Tan, K., Chua, C., Leong, K., Cheah, C., Cheang, P., Abu Bakar, M., Cha, S. (2003). Scaffold Development Using Selective Laser Sintering of Polyetheretherketone–Hydroxyapatite Biocomposite Blends. *Biomaterials*, 24(18), 3115–3123. DOI: 10.1016/s0142-9612(03)00131-5
- Tanrıkulu, S., Gönen, E. (2017). Kırık İyileşmesi. *TOTBİD Dergisi*, 16(6), 455-475. DOI: 10.14292/totbid.dergisi.2017.62
- Tariverdian, T., Sefat, F., Gelinsky, M., Mozafari, M. (2019). Scaffold for Bone Tissue Engineering. Mozafari, M., Sefat, F., Atala, A. (Ed.), *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One* (1st ed.). (189-209). Woodhead Publishing.
- Top, N., Gökçe, H. (2020). *Doku Mühendisliğinde Bilgisayar Destekli Yapay Kemik İskelesi Tasarımı*. Ankara: İKSAD Publishing House.
- Topaloğlu, U., Ketani, M. A., Güney Saruhan, B. (2017). Kemik Doku ve Kemikleşme Çeşitleri. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10(1), 62-71.
- Ün, M. K., Akdoğan, G., Canpolat, Ç. (2014). Biyomekanik. Asyalı, M. H., Kara, S., Yılmaz, B. (Ed.), *Biyomedikal Mühendisliğinin Temelleri*. (97-156). Ankara: Nobel.
- Wang, X., Xu, S., Zhou, S., Xu, W., Leary, M., Choong, P., Qian, M., Brandt, M., Xie, Y. M. (2016). Topological Design and Additive Manufacturing of Porous Metals for Bone Scaffolds and Orthopaedic Implants: A Review, *Biomaterials*, 83, 127–141. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.012.
- Wang, Y., Sun, N., Zhang, Y., Zhao, B., Zhang, Z., Zhou, X., Zhou, Y., Liu, H., Zhang, Y., Liu, J. (2019). Enhanced osteogenic proliferation and differentiation of human

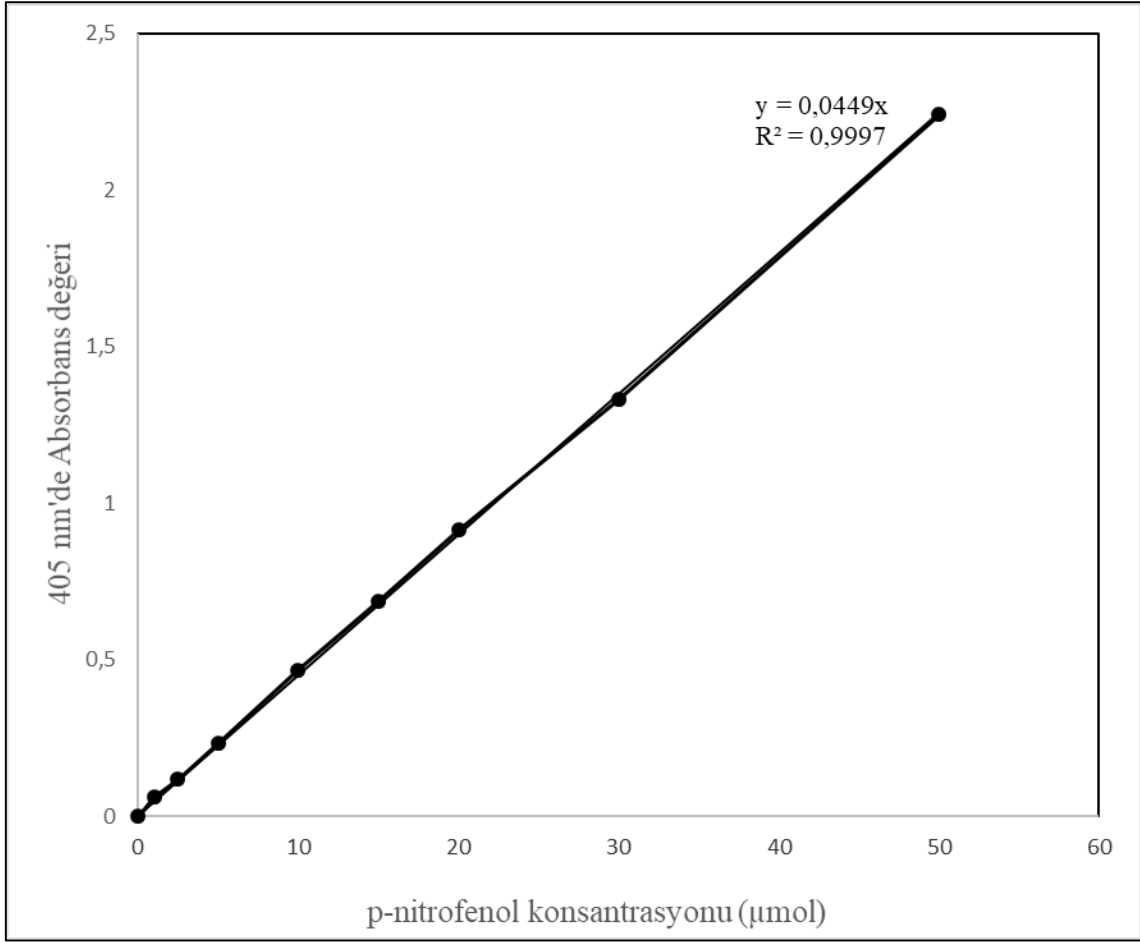
adipose-derived stem cells on a porous n-HA/PGS-M composite scaffold. *Scientific Reports*, 9(7960), 1-10.

- Wei, G., Ma, P. X. (2004). Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 25 (2004), 4749–4757.
- Woodard, J.R. , Hildore, A.J., Lan S. K., Park, C.J., Morgan, A.W., Eurell, J. A. C., Clark, S.G., Wheeler M. B., Jamison, R. D., Johnson, A.J. W. (2006). The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials*, 28(1), 45-54.
- Zhao, L., Weir, M. D., & Xu, H. H. (2010). Human Umbilical Cord Stem Cell Encapsulation in Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Engineering. *Biomaterials*, 31(14), 3848–3857.
- Zhou, H., Lee, J. (2011). Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia* 7(2011), 2769–2781.
- Zong- Yan, G., Chong, L., Yong-feng, L., Shu-jun, C. (2009). Preparation and Characterization of PGS-PLA Blend Composite. *Journal of East China University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 35(1), 57-61.



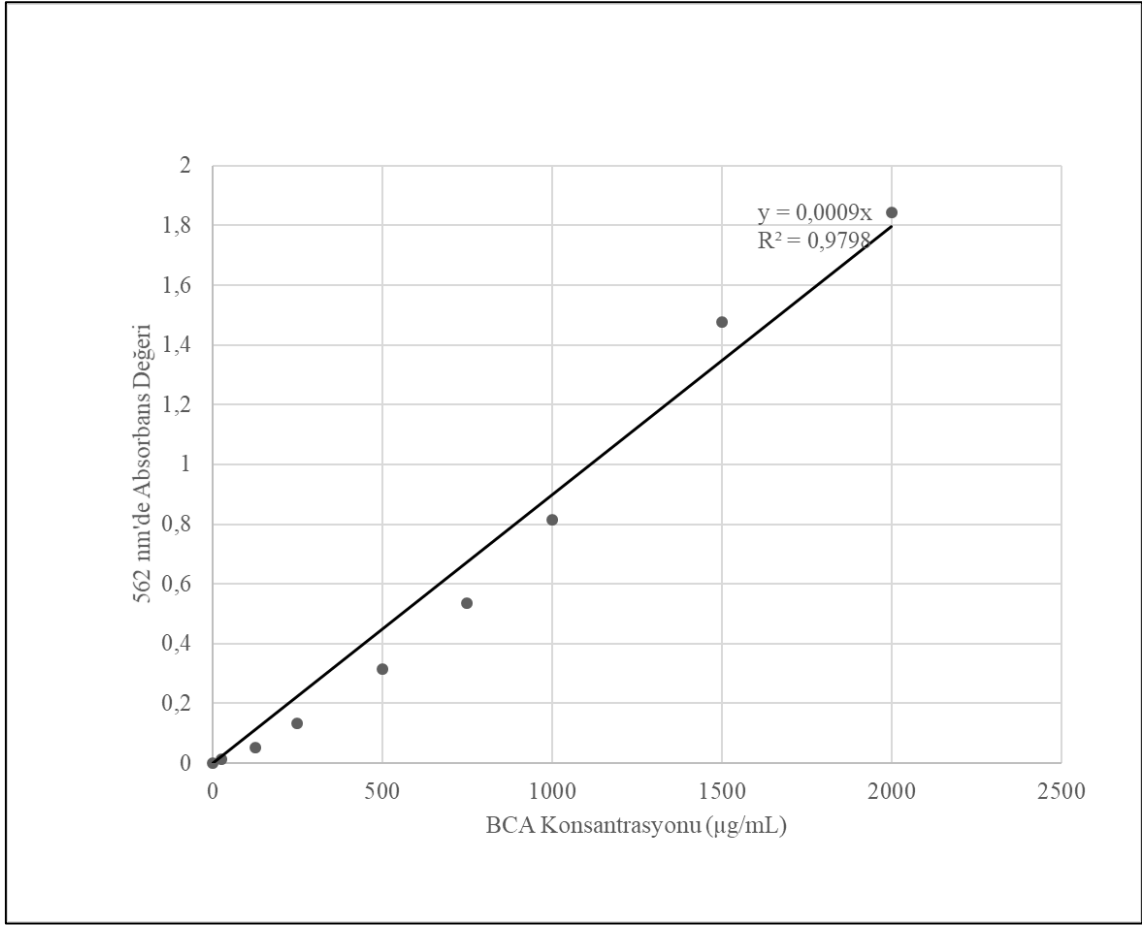
EKLER

Ek-A



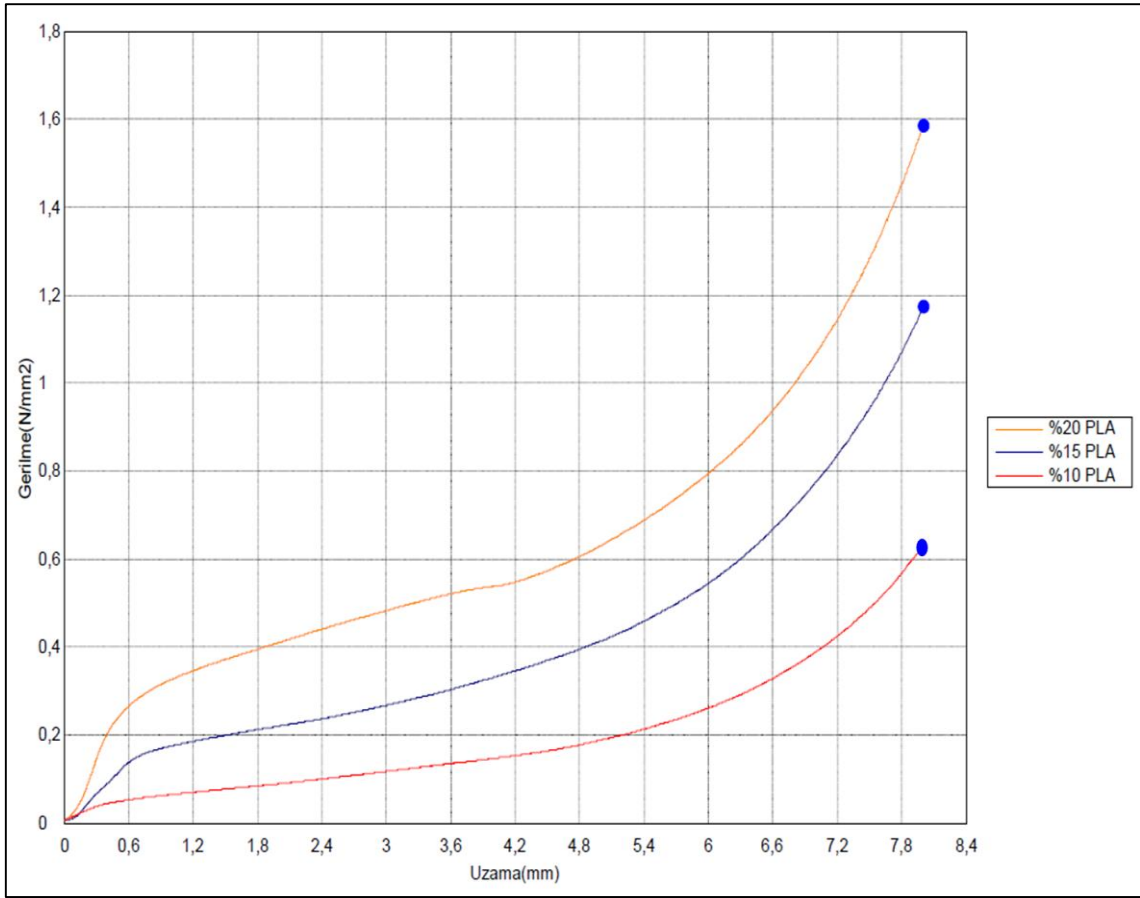
Şekil A. 1. ALP deneyi kalibrasyon eğrisi

Ek-B



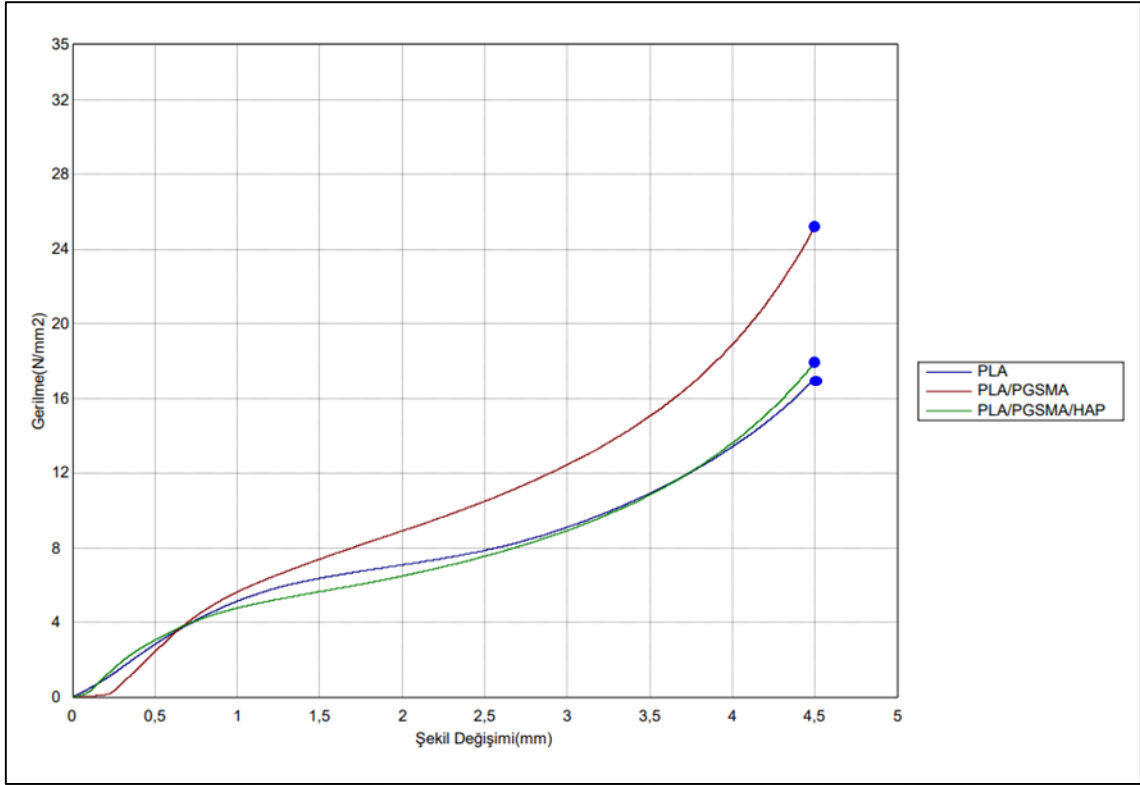
Şekil B. 1. BCA Total protein analizi deneyi kalibrasyon eğrisi

Ek-C



Şekil C. 1. Konsantrasyon Belirleme Çalışması Basma Testi Grafiği

Ek-D



Şekil D. 1. PLA, PLA/PGS-MA ve PLA/PGS-MA/HAP kompozitlerinin gerilme-şekil değişimi grafiği

Ek- E. Çalışma Etik Kurul İzni Belgesi



SAYI: ATADEK-2020/12
KONU: Etik Kurul Kararı

Sayın Doç. Dr. Halime Kenar,

Sorumluluğunu yürüttüğünüz **“Hidroksiapatit Katkılı Poli(gliserol sebakat) / Poli(laktik asit) Karışımından Üç Boyutlu Basım ile Kemik Doku İskelesi Üretimi ve İn vitro Karakterizasyonu”** başlıklı proje 11.06.2020 tarih 2020/12 Sayılı Atadek Toplantısında görüşülmüş olup 2020-12/10 karar numarası ile tıbbi etik yönden uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus

ATADEK Başkanı

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

- Hasırcı, V., Yücel, D., Kenar, H., Selamet, H., Başöz, D., Çam, N., **Kıratlı, K.**, Tıp Alanında Üç Boyutlu Baskı Uygulamalarındaki Gelişmeler, *TOTBİD Dergisi*, 2022, 22(1), 102–111.
- Kenar, H., Aydın, L., **Coşkun, K.**, Developing an in vitro functional heart muscle model from human iPSC derived cardiomyocytes, *IFSHC WORKSHOP*, Prague, Czech Republic, 6 Eylül 2021.
- Yalcinkaya, B., **Coşkun, K.**, Akgoz, M., Pence, S., A simple silica based DNA isolation method for cell-free DNA analysis from liquid biopsy. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2020, 45(6), 701–705.
- Yalcinkaya, B., **Coşkun, K.**, Aydın, E., Akgoz, M., Pence, S., A simple silica based method for cell free DNA isolation from blood plasma, *ULUSLARARASI İVEK BİO KONGRESİ (İVEK BIO 2018)*, İstanbul, Türkiye, 26-28 Kasım 2018.
- Ün, İ., **Coşkun, K.**, Yalcinkaya, B., Profilling And Determination of Extracted DNA Solution Impurities by qNMR, 1. *EBAT (Eurasia Biochemical Approaches & Technologies) Congress*, Antalya, Türkiye, 27 Ekim 2018.

ÖZGEÇMİŞ

İstanbul Şehremini Anadolu Lisesi'nde orta öğrenimini tamamladı. 2014 yılında Kocaeli Üniversitesi'nde Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. 2018 yılında başarıyla mezun oldu. Ardından aynı yıl Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

