

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

KIKIRDAK REJENERASYONU İÇİN DENTAL
FOLİKÜL MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE TGF β -1
KATKILI 3B NANOFİBER DOKU İSKELELERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ, İN VİTRO VE İN VİVO DENEYLERİ

FATMA KURU

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2024

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**KIKIRDAK REJENERASYONU İÇİN DENTAL
FOLİKÜL MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE TGF β -1
KATKILI 3B NANOFİBER DOKU İSKELELERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ, İN VİTRO VE İN VİVO
DENEYLERİ**

FATMA KURU

TEMMUZ 2024
MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

FATMA KURU tarafından hazırlanan **KIKIRDAK REJENERASYONU İÇİN DENTAL FOLİKÜL MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE TGFB-1 KATKILI 3B NANOFİBER DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ, İN VİTRO VE İN VİVO DENEYLERİ** başlıklı tezinin, 01/07/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda doktora derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Hüseyin ÇİÇEK (Jüri Başkanı)

İmza:

Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Hülya KARA SUBAŞAT (Danışman)

İmza:

Enerji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Deniz GENÇ (Üye)

İmza:

Çocuk Sağlığı Hemşireliği Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Zikriye ÖZBEK (Üye)

İmza:

Doku Mühendisliği Anabilim Dalı,
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale,

Doç. Dr. Pınar TERZİOĞLU (Üye)

İmza:

Polimer Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı,
Bursa Teknik Üniversitesi, Bursa

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Mehmet UĞURLU

İmza:

Kimya Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Hülya KARA SUBAŞAT

İmza:

Danışman, Enerji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Savunma Tarihi: 01/07/2024

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Fatma KURU

01.07.2024

ÖZET

KIKIRDAK REJENERASYONU İÇİN DENTAL FOLİKÜL MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE TGF β -1 KATKILI 3B NANOFİBER DOKU İSKELELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ, İN VİTRO VE İN VIVO DENEYLERİ

Fatma KURU

Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hülya KARA SUBAŞAT

Temmuz 2024, 136 sayfa

Kıkırdak dejenerasyonu artiküler kıkırdağın aşınmaya başlaması ile oluşmaktadır. Bu tip bir dejenerasyona her ne kadar yaş ile ilintili olsa da obezite, fiziksel egzersiz eksikliği, genetik yatkınlık, kemik yoğunluğu, yaralanmalar, travma ve cinsiyet gibi farklı faktörler de etkili olabilmektedir. En şiddetli kıkırdak kaybı vakalarında kemikler birbirlerine sürtünmekte, bu da ağrı ve hareketin kısıtlanmasına yol açmaktadır. Tez çalışması ile diz eklem kıkırdak hasarı için, **DF-MKH ve TGF β -1 katkılı PCL/GEL/HA 3B nanofiber doku iskelelerinin** üretimi ve hiyalin kıkırdakta hızlı doku rejenerasyonunun gerçekleştirilmesi, iyileşme süresinin kısaltılması amaçlanmıştır. ECM (doğal hücre dışı matris) analogu olarak 3B nanofiber iskeleler, geleneksel yöntemle tedavideki gibi sadece kıkırdak yapısını tedavi etmekle kalmaz aynı zamanda içerdiği biyouyumlu polimerler sayesinde kıkırdak dokusu oluşumunu da hızlandırır. Tez sonuçları *kıkırdak rejenerasyonu* alanında yapılan çalışmalara katkı sağlayacaktır. Elektroeğirme yöntemiyle elde edilen nanofiberlerin ECM yapısının taklit edilebilirliği, hücre proliferasyonu için uygun koşulların sağlanması, yüksek gözenekliliği ve geniş yüzey alanı gibi özellikler nedeniyle, doku iskeleleri ve biyomedikal uygulamalarında kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu tezde, bir polyster (polikaprolakton, **PCL**), bir protein (jelatin, **GEL**), bir glikozaminoglikan olan hyalüronik asit (**HA**), Transforme edici büyüme faktör-beta (**TGF β -1**) ve dental folikül mezenkimal kök hücre (**DF-MKH**) kullanılarak elektroeğirme yöntemi ile **DF-MKH ve TGF β -1 katkılı PCL/GEL/HA 3 adet FK1 (PCL/GEL/HA), FK2 (PCL/GEL/HA + DF-MKH), FK3 (PCL/GEL/HA + DF-MKH + TGF β -1) 3B nanofiber doku iskeleleri** üretilmiş ve karakterize edilmiştir. Son olarak tam kalınlıkta kıkırdak hasarı modeli oluşturulmuş ratlarda hızlandırılmış kıkırdak doku iyileşme potansiyelleri in vivo deneyler ile belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Elektro-eğirme yöntemi, Nanofiber, Kıkırdak Doku Rejenerasyonu, *Kök hücre*, TGF β -1

ABSTRACT

THE DEVELOPMENT OF DENTAL FOLLICLE MESENCHYMAL STEM CELL AND TGF β -1 ENRICHED 3D NANOFIBER TISSUE SCAFFOLDS FOR CARTILAGE REGENERATION: IN VITRO AND IN VIVO EXPERIMENTS

Fatma KURU

PhD THESIS

Institute of Natural and Applied Sciences, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Hülya KARA SUBAŞAT

July 2024, 136 pages

Cartilage degeneration occurs with the onset of articular cartilage wear. Although this type of degeneration is typically associated with age, various factors such as obesity, lack of physical exercise, genetic predisposition, bone density, injuries, trauma, and gender can also play a role. In cases of severe cartilage loss, bones rub against each other, leading to pain and restricted movement.

This thesis aims to expedite cartilage tissue regeneration for knee joint cartilage damage through the production of **DF-MSC and TGF β -1** supplemented **PCL/GEL/HA 3D nanofiber tissue scaffolds**, thereby reducing recovery time. As analogs of extracellular matrix (ECM), 3D nanofiber scaffolds not only treat the cartilage structure as in traditional methods but also accelerate cartilage tissue formation due to their bio-compatible polymers. The thesis findings will contribute to research in cartilage regeneration.

Nanofibers obtained by electrospinning mimic ECM structure, provide suitable conditions for cell proliferation, and are widely used in tissue scaffolds and biomedical applications due to their high porosity and large surface area. In this study, three types of **3D nanofiber scaffolds FK1 (PCL/GEL/HA), FK2 (PCL/GEL/HA + DF-MSC), and FK3 (PCL/GEL/HA + DF-MSC + TGF β -1)** were produced and characterized using electrospinning with polyester (polycaprolactone, **PCL**), protein (gelatin, **GEL**), hyaluronic acid (**HA**), Transforming Growth Factor-beta 1 (**TGF β -1**), and dental follicle mesenchymal stem cell (**DF-MSC**). Finally, the accelerated cartilage tissue healing potentials were determined in vivo experiments using a full-thickness cartilage defect model in rats.

Keywords: Electrospinning Method, Nanofiber, Cartilage Tissue Regeneration, *Stem cell*, *TGF β -1*

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Hülya KARA SUBAŞAT'a, tez çalışmamın başarılı bir şekilde tamamlanabilmesi için sağladığı desteklerinden ve bilimsel yönlendirmelerinden dolayı değerli hocalarım Doç. Dr. Uğur ERKARSLAN, Doç. Dr. Görkem OYLUMLUOĞLU ve laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Hayatımın her alanında maddi ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim Ayşe KURU, Yaşar KURU ve Dr. Recep BÖLÜKBAŞI'na minnettarım.

Bu tez TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı ve 100/2000 YÖK Doktora Burs Programı ile desteklenmiştir.

Tezimi oğlum Erdem Batu ve kızım Ayşe Melisa'ya ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
3. GENEL BİLGİLER.....	13
3.1. Kıkırdak Dokusu	13
3.2. Kıkırdak Tipleri.....	13
3.3. Eklem Kıkırdağı Genel Özellikleri	16
3.4. Eklem Kıkırdağı Bileşenleri.....	20
3.5. Eklem Kıkırdak Hasarı.....	24
3.6. Kıkırdak Hasarı Sınıflamaları	24
3.7. Kıkırdak Hasarında Uygulanan Güncel Tedavi Yöntemleri	26
3.8. Doku Mühendisliği.....	33
3.8.1. Kıkırdak doku mühendisliği	35
3.8.2. Kıkırdak doku mühendisliği iskeleleri	36
3.8.3. Kıkırdak doku mühendisliği iskeleleri için kullanılan yaklaşımlar.....	37
3.9. Doku İskele Tasarımı İçin Kullanılan Malzemeler	41
3.9.1. Polimerler	41
3.9.1.1. Doğal polimerler.....	42
3.9.1.2. Sentetik polimerler	45
3.9.2. Mezenkimal kök hücre	47
3.9.3. TGFβ-1	49
3.10. Nanofiberler Ve Uygulama Alanları.....	51

3.11. Nanofiber Üretim Yöntemleri.....	53
3.11.1. Elektroegirme yöntemi.....	53
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	59
4.1. Dental Follikül Mezenkimal Kök Hücre Üretimi (DF-MKH)	59
4.2. TGF β -1 Hazırlanması.....	60
4.3. Nanofiber Üretimi için Kullanılan Malzemeler	60
4.3.1. PCL/GEL/HA (FK1) Solüsyonunun hazırlanması;.....	62
4.3.2. PCL/GEL/HA + DF-MKH (FK2) Solüsyonunun hazırlanması;.....	63
4.3.3. PCL/GEL/HA+DF-MKH+TGF β -1 (FK3) Solüsyonunun hazırlanması; .	64
4.4. Nanofiber Doku İskelelerinin Üretimi	64
4.4.1. Üç Boyutlu Nanofiber Üretimi İçin Kullanılan Toplayıcının Tasarımı....	66
4.4.2. Nanofiber Üretimi İçin Kullanılan Parametreler.....	66
4.5. Nanofiber Doku İskelelerinin Karakterizasyonu.....	67
4.5.1. FE-SEM analizi.....	68
4.5.2. BET Gözeneklilik Analizi	68
4.5.3. FTIR analizi	68
4.5.4. Su temas açısı	68
4.5.5. DMA Mekanik Analizi	69
4.5.6. İn Vitro Biyobozunurluk Analizi	69
4.5.7. İn Vitro Hücre Canlılık Analizi	69
4.5.8. İn Vitro Kondrojenik Farklılaşma Analizi.....	70
4.5.9. İn Vivo Deneysel Çalışmalar.....	70
4.5.10. Mikro CT Görüntüleme Analizi	75
4.5.11. Histopatolojik İnceleme.....	76
5. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	78
5.1. FE-SEM Analiz Sonucu	78
5.2. BET Gözeneklilik Analiz Sonucu	86
5.3. FTIR Analiz Sonucu	89
5.4. Su Temas Açısı Analiz Sonucu	95
5.5. DMA Mekanik Analiz Sonucu	97
5.6. İn Vitro Biyobozunurluk Analiz Sonucu	99
5.7. Hücre Canlılık Analiz Sonucu.....	100
5.8. Kondrojenik Farklılaşma Analiz Sonucu	101
5.9. Mikro CT Görüntüleme Sonucu.....	103

5.10. Histopatolojik Bulgular	106
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	115
7. KAYNAKLAR	117
ÖZGEÇMİŞ.....	130



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Piyasadaki ticari ürünler	8
Çizelge 2. Kıkırdak doku tabakaları ve özellikleri.....	19
Çizelge 3. Kıkırdak yaralanmasının sınıflandırılması.....	25
Çizelge 4. Nanofiber doku iskelesi tasarımında kullanılan teknikler	37
Çizelge 5. Çözeltiyi etkileyen parametreler	56
Çizelge 6. İşlem parametrelerine ait değişkenler	57
Çizelge 7. Çevresel değişkenler	58
Çizelge 8. Nanofiber üretiminde kullanılan malzemeler ve kullanım amaçları.....	61
Çizelge 9. Elektroegirme yöntemi için kullanılan parametre değerleri	66
Çizelge 10. İn vivo model grup açıklamaları	71
Çizelge 11. Mankin'in histolojik kıkırdak hasarı skortlama sistemi.....	76
Çizelge 12. Nanofiberlerin ortalama fiber çapları.....	78
Çizelge 13. Nanofiberlerin BET analizi sonuçları	88
Çizelge 14. PCL, GEL ve HA ile FK1, FK2 ve FK3 nanofiberlerin katı formda FTIR spektrumları	91
Çizelge 15. Nanofiberlere ait su temas açısı ölçüm sonuçları	96
Çizelge 16. Sırasıyla PCL/GEL nanofiber ve FK3 Nanofiberlere ait su temas açısı. 96	
Çizelge 17. FK2 Nanofiberin canlılık analizi tablosu.....	101
Çizelge 18. Kontrol, G1, G2 ve G3 gruplarının Mikro CT sonuçları	104
Çizelge 19. Dolgu maddeleri ile dokuda oluşan lezyonlarının histopatolojik bulguları	107

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Literatür Taraması.....	12
Şekil 2. Normal insan eklemine bileşenleri	13
Şekil 3 Kıkırdak doku çeşitleri.....	14
Şekil 4. Hiyalin kıkırdak	14
Şekil 5. Elastik kıkırdak	15
Şekil 6. Fibröz kıkırdak.....	15
Şekil 7. Sinoviyal eklem gelişiminin şematik gösterimi.....	17
Şekil 8. Eklem kıkırdağının yapısının şematik gösterimi	19
Şekil 9. Kolajen yapısı	22
Şekil 10. Eklem kıkırdağı ekstraselüler matriks bileşenleri.....	23
Şekil 11. Kıkırdak hasarı sınıflandırılması şematik gösterimi.....	25
Şekil 12. Artroskopik debridman uygulaması.....	30
Şekil 13. Mikrokirik yöntemi şematik gösterimi	30
Şekil 14. ACI (Otolog Kondrosit İmlantasyonu) şematik gösterimi.....	31
Şekil 15. MACI (Matriks yardımcı otolog kondrosit implantasyonu) şematik gösterimi	32
Şekil 16. Mozaikplasti şematik gösterimi	33
Şekil 17. Doku mühendisliği uygulamasının şematik gösterimi.....	35
Şekil 18. Jelatin ve kimyasal yapısı	44
Şekil 19. Hyaluronik asit ve kiyasal yapısı	45
Şekil 20. PCL ve kimyasal yapısı	47
Şekil 21. Elektroğirme yöntemiyle üretilen tipik bir nanofiber FESEM görüntüsü	52
Şekil 22. Nanofiber üretim yöntemleri.....	53
Şekil 24. Elektroğirme yönteminin şematik gösterimi.....	54
Şekil 25. PCL/ GEL/ HA solüsyonu hazırlama aşamaları a) PCL solüsyonu b) GELsolüsyonu c) HA d) PCL/ GEL/ HA solüsyonu.....	62
Şekil 26. PCL/ GEL/HA + DF-MKH solüsyonu hazırlama aşamaları. a) PCL/ GEL/HA solüsyonu b) Liyofilize edilmiş DF-MKH c) PCL/ GEL/HA + DF-MKH Solüsyonu.....	63
Şekil 27. PCL/ GEL/HA + DF-MKH + TGFβ-1 Solüsyonu Hazırlama Aşamaları. a) PCL/ GEL/HA solüsyonu b) Liyofilize edilmiş DF-MKH + TGFβ-1 c) PCL/ GEL/HA + DF-MKH + TGFβ-1 solüsyonu.....	64

Şekil 28. Elektroeğirme Yönteminin Şematik Gösterimi	65
Şekil 29. Elektroeğirme cihazı	65
Şekil 30. Pamuk benzeri nanofiber üretilen toplayıcı ve üretilen nanofiber	66
Şekil 31. Elde Edilen 3B Nanofiberlerin Görüntüleri A) FK1, B) FK2 ve C) FK3 ..	67
Şekil 32. Deney hayvanlarının hazırlanması.....	71
Şekil 33. Cerrahi ekipmanlar.....	72
Şekil 34. Cerrahi prosedüre hazırlık.....	72
Şekil 35. A) Medial paramedian ensizyon B) Patellanın laterale devrilmesi	73
Şekil 36. A) Tam kat kontral hasar B) İmplant edilmek üzere hazırlanan nanofiberler C) Hasarlı bölgeye nanofiber uygulanması	73
Şekil 37. A) Cilt altı dokusu B) Cilt dokusu sütür edilme işlemleri	74
Şekil 38. Cerrahi işlem sonrası dönem.....	74
Şekil 39. A) Sakrifikasyon sonrası kontrol ve nanofiber tedavizi uygulanan kıkırdak örneği B) Formaldehit içindeki sakrifiye edilmiş kıkırdaklar	75
Şekil 40. FK1 Nanofiberin FESEM görüntüsü	79
Şekil 41. FK1 Nanofiberin IMAGE J programı gözeneklilik görüntüsü	79
Şekil 42. FK1 Nanofiberin IMAGE J programı gözeneklilik görüntüsü	80
Şekil 43. FK1 Nanofiberin ORIGIN PRO programı lif çapı dağılım histogramı	80
Şekil 44. FK1 Nanofiberin ORIGIN PRO programı lif çapı dağılım eğrisi	80
Şekil 45. FK2 Nanofiberin FESEM görüntüsü	81
Şekil 46. FK2 Nanofiberin IMAGE J programı gözeneklilik görüntüsü	81
Şekil 47. FK2 Nanofiberin IMAGE J programı gözeneklilik görüntüsü	82
Şekil 48. FK2 Nanofiberin ORIGIN PRO programı lif çapı dağılım histogramı	82
Şekil 49. FK2 Nanofiberin ORIGIN PRO programı lif çapı dağılım eğrisi	82
Şekil 50. FK3 Nanofiberin FESEM görüntüsü	83
Şekil 51. FK3 Nanofiberin IMAGE J programı gözeneklilik görüntüsü	83
Şekil 52. FK3 Nanofiberin IMAGE J programı gözeneklilik görüntüsü	84
Şekil 53. FK3 Nanofiberin ORIGIN PRO programı lif çapı dağılım histogramı	84
Şekil 54. FK3 Nanofiberin ORIGIN PRO programı lif çapı dağılım eğrisi	84
Şekil 55. FK1 nanofiberinin izoterm grafiği	86
Şekil 56. FK3 nanofiberinin izoterm grafiği	87
Şekil 57. PCL, GEL ve HA ile FK1 nanofiberin yapıların FTIR spektrumları	90
Şekil 58. PCL, GEL, HA ve DF-MKH ile FK2 nanofiberin yapıların FTIR spektrumları	90

Şekil 59. PCL, GEL, HA, DF-MKH ve TGF β -1 ile FK3 nanofiberin yapıların FTIR spektrumları	91
Şekil 60. Nanofiberlerin zamana göre esneme grafiği	98
Şekil 61. Numunelerin zamana bağlı ağırlık kayıpları.....	100
Şekil 62. FK2 Nanofiberin canlılık analizi grafiği.....	101
Şekil 63. Besiyerinde kıkırdak oluşumunun makroskopik görünümü	102
Şekil 64. İn vitro kıkırdak oluşumu mikroskop görüntüsü	102
Şekil 65. İn vitro oluşan kıkırdak hattı.....	103
Şekil 66. A) Nanofiberlerin invitro kıkırdak oluşumu mikroskop görüntüsü B) x5 Yakınlaştırılmış mikroskop görüntüsü	103
Şekil 67. Dekalsifiye edilen örnek	106
Şekil 68. Doku Kasetlerine Yerleştirilen Örnekler	106
Şekil 69. Akut granülasyon dokusu. HE - 200 Büyütme	110
Şekil 70. Yabancı Cisim Granülaston Dokusu. HE - 200 Büyütme	111
Şekil 71. Yabancı Cisim Granülaston Dokusu. HE - 200 Büyütme	111
Şekil 72. Dolgu Materyali (ok). HE - 200 Büyütme	112
Şekil 73. Dolgu Materyali (ok), Kronik Granülasyon Dokusu (yıldız). HE - 200 Büyütme.....	112
Şekil 74. Hasar dolgu alanı. HE - 200 Büyütme	113
Şekil 75. Hasar dolgu alanı. HE - 200 Büyütme	114

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Celcius
ml	Mikrolitre
mm	Mikrometre
cm	Santimetre
g	Gram
kV	Kilovolt
w/v	Ağırlık/Hacim
Ag ⁺	Gümüş İyonu
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
pH	Power Of Hydrogen (Hidrojen Gücü)
rpm	Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
ECM	Ekstrasellüler Matriks (Hücre Dışı Matris)
FDA	Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu)
FE-SEM	Field Emission Scanning Electron Microscope (Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu)
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Fourier Dönüştürücü Infrared Spektroskopisi)
TGFB-1	Transforming Growth Factor Beta-1 (Dönüştürücü büyüme faktörü beta-1)
DF-MKH	Dental Folikül Mezenkimal Kök Hücre
HA	Hyalüronik Asit
PRF	Trombositçe Zengin Fibrin
PRP	Trombositçe Zengin Plazma
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Tuz)
PCL	Polikaprolakton
PLA	Poli (laktik) asit
PGA	Poli (glikolik asit)
PLGA	Poli (L-Laktik-ko-glikolik asit)

1. GİRİŞ

Avasküler bir yapıya ve seyrek hücre popülasyonuna sahip olan kıkırdak, çeşitli büyüme faktörleri tarafından düzenlenen ekstraselüler matriks (ECM) ile çevrilidir (Holland ve Mikos, 2003). Bu nedenle, hücre temelli tedavi stratejilerinde doğal hücrenin yerine geçebilecek hücrelerin seçimi, birtakım büyüme faktörleriyle seçilen hücre faaliyetlerinin düzenlenmesi ve hasarlı bölgeyi taklit edebilecek özellikte bir doğal veya sentetik doku iskelesi seçimi kıkırdak lezyonlarının tedavi sürecinde oldukça önemlidir. Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF β ; Transforming Growth Factor Beta), son dönemlerde üzerinde yoğun araştırmalar yapılan kritik büyüme faktörlerinden biridir. TGF β -I, kıkırdak hücresinin proliferasyonunu, farklılaşmasını, DNA sentezini, kolajen ve non-kolajen proteinlerin üretimini teşvik etmektedir (Harbili, 2008). Öte yandan, hyalüronik asit, osteoartritli insan eklemlerinde özellikle ağrıyı hafifletmek ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak amacıyla kullanılmaktadır (Erdem ve Karatay, 2007). Rat modellerinde yapılan çalışmalar, hyalüronik asidin epifizyel büyüme plağı ve eklem kıkırdağında proteoglikan kaybını azalttığını, yapısal kıkırdak hasarını önlediğini ve artritlik eklemlerde akut inflamasyonu düşürdüğünü ortaya koymuştur (Dıraçoğlu, 2016).

Kıkırdak dokuda çeşitli yaralanmalar ve hastalıklar nedeniyle dejeneratif eklem hastalıkları sıklıkla görülmektedir. Kıkırdak hasarlarının tedavisi amacıyla çeşitli ortopedik ve hücre temelli tedavi teknikleri geliştirilmesine rağmen doğal dokunun yerini alabilen ve tam iyileşme sağlayan etkili bir tedavi bulunamamıştır (Zhao vd., 2005). Özellikle yaşlılıkta olmakla birlikte hemen her yaşta görülen eklem dejenerasyonları ve kıkırdak hasarlarının tedavisi, tam iyileşmeyi sağlayacak uygulamaların bulunmayışı nedeniyle palyatif olarak yapılmakta, uygulanan cerrahi protokoller ve hücre temelli yaklaşımlar bireyin yaşam kalitesini arttırmaya yönelik girişimler olmaktadır.

Tam kat kıkırdak hasarlarının onarılmasının hastalarda ağrıyı, limitli eklem fonksiyonunu ve eklem katılığı semptomlarını azalttığı bilinmektedir. Kıkırdak onarımının etkili olabilmesi için kullanılan kıkırdak onarım prosedürlerinin hiyalin kıkırdağa en yakın kıkırdak oluşturması tercih edilmektedir (Gugjoo vd., 2017).

Kıkırdak lezyonlarının tedavisinde; lezyon bölgesine progenitor hücrelerin gelmesini sağlayabilecek, kanlanmayı artıran teknikler (artroskopik subkondral drilleme, mikrokırık oluşturma, kondroabrazyon) gibi yöntemlerin yanı sıra allogreftler, otogreftler, sentetik polimerler, periosteal ve perikondral flepler gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır (Günay vd., 2005). Bununla birlikte, kıkırdak üzerine uygulanacak her türlü cerrahi işlemin, artrit sürecini hızlandırabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin Geleneksel tedavi yöntemlerinden biri olan mikrokırık küçük çaplı osteokondral lezyonların ($<2 \text{ cm}^2$) tedavisinde ilk tedavi seçeneği olarak uzun zamandır kullanılan, kolay uygulanan, ucuz, minimal invaziv bir tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır. Ancak mikrokırık sonrası oluşan fibrokıkırdak yapı sert olması, esnekliğinin az olması sebeplerden dolayı, hiyalin kıkırdağa yakın bir formda kıkırdak rejenerasyonu sağlamak için farklı yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur.

Kondral ve osteokondral hasarlarda, konak dokunun kendi kendini yenileme kapasitesinin sınırlı olması, araştırmacıları hasarlı bölgeye hücre transplantasyonu yöntemlerini keşfetmeye sevk etmiştir. Bu zorluğa çözüm bulmak amacıyla, kıkırdak doku mühendisliği alanı ortaya çıkmıştır ve bu alanda ilk tanımlama 1977 yılında Green tarafından yapılmıştır (Green,1977). 1990'ların ortalarında, Brittberg ve meslektaşlarının klinik sonuçlarını yayınlamasıyla bu alanda önemli bir ilerleme kaydedilmiştir (Brittberg vd.,1996). Yapay olarak geliştirilen kıkırdakların normal eklem kıkırdağı ile eşdeğer biyomekanik özelliklere sahip olması, yüksek stres altındaki in vivo koşullarda işlevselliğini sürdürebilmesi için kritik öneme sahiptir (Vacanti vd.,2000).

Çeşitli doğal ve sentetik biyomateryaller, potansiyel doku iskeleleri veya kıkırdak tamiri için terapötik ajanlar olarak değerlendirilmektedir. Rejeneratif etkisi büyük olan bir ajan da Trombositçe zengin fibrin (PRF) dir. PRF doğal kandan elde edilmekle birlikte, (Trombositçe zengin plazma) PRP'ye göre elde edilirken trombin veya antikoagülan gibi katkı maddelerine ihtiyaç duymaması ile ayrışır. Dolayısıyla elde edilmesi daha basit, hızlı ve ekonomik hale gelmiştir. PRP'ye göre birçok avantajı bulunmaktadır ve klinik kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Özetle; PRF'nin trombosit ve nötrofil hücrelerinde artış sağlamakla birlikte, büyüme faktörlerinin salınmasında uzamış ve artmış etkiye sahip olması gibi ek avantajları vardır (Miron ve Choukroun, 2017).

Bu nedenle kıkırdak dokunun biyomekaniğini taklit edebilen biyouyumlu ve biyobozunur üç boyutlu polimerlerin ve kıkırdak dokusunun üretimi için kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları hız kesmeden devam etmektedir. Bu doğrultuda farklı özellik ve yapılardaki polimerik malzemeler denenmekte ve kültür şartlarına optimizasyon faaliyetleri devam etmektedir. Doku mühendisliğinde kullanılan diğer nanoyapılı malzemeler gibi nanofiberler de, yüksek yüzey alanı/hacim oranıyla öne çıkar. Bu malzemeler, porozite, elastisite ve mekanik dayanım gibi özellikleri, içerisine katılan doğru materyallerle, kullanılacağı alana uygun şekilde rahatlıkla modifiye edilebilir. Özellikle, hücrelerin ekstraselüler matriksini mükemmel bir şekilde taklit edebilmesi, çeşitli hücre türlerinin tutunabilmesi için yeterli gözenekliliğe sahip olması ve kolay işlenebilir olması gibi birçok avantaj sunması nedeniyle nanotıp ve doku mühendisliği alanında tercih edilmektedir (O'Brien ve Jones, 2013).

Bu tezin sunulan sonuçları, rejeneratif kıkırdak doku mühendisliği bilimine inovatif ve özgün katkılar sunduğu düşünülmekte olup, elde edilen bulguların bir doktora sonrası araştırma projesi ile daha da geliştirilmesi planlanmaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Hyalin kıkırdak formundaki eklem kıkırdak hasarının onarımı, kıkırdak doku mühendisliğinin temel hedefidir; çünkü, doğal kıkırdak yapısını en iyi şekilde yeniden oluşturmayı ve kıkırdak dokusunun işlevselliğini ve dayanıklılığını maksimum düzeyde geri kazandırmayı amaçlamaktadır. Kıkırdak hasarı sonrası bildirilen en büyük sorunlardan biri de hasar noktasında fibröz ve fibrokartilaj oluşumudur. Fibrokartilaj doku, doğal ve eklem kıkırdağının mekanik ve fiziksel özelliklerine sahip değildir ve *in vivo* gerilim altında başarısız olarak kıkırdak bozukluklarına neden olabilir. Hücrelerin tasarlanmış matrikslere dahil edilmesinin, eklem kıkırdağı hasarlarında hyalin kıkırdak oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (W. J. Li vd., 2008).

Kıkırdak dejenerasyonu artiküler kıkırdağın aşınmaya başlaması ile oluşmaktadır. Bu tip bir dejenerasyona her ne kadar yaş ile ilintili olsa da obezite, fiziksel egzersiz eksikliği, genetik yatkınlık, kemik yoğunluğu, yaralanmalar, travma ve cinsiyet gibi farklı faktörler de etkili olabilmektedir (Yeşil-Çeliktas, 2020). En şiddetli kıkırdak kaybı vakalarında kemikler birbirlerine sürtünmekte, bu da ağrı ve hareketin kısıtlanmasına yol açmaktadır. Birleşmiş Milletler raporuna göre 2050 yılı itibari ile dünya genelinde 130 milyon kişinin kıkırdak hasarı tedavisi göreceği ve bunların içinde 40 milyon kişinin hastalıktan şiddetli biçimde etkilenerek iş yapamaz hale geleceği belirtilmiştir (Yeşil-Çeliktas, 2020).

Bilim insanları ve araştırmacılar, nano- ve mikrofiber polimer matrikslerin elektroegirme tekniği kullanılarak oluşturulmasıyla, dokunun hastaya etkili bir şekilde uygulanmasına yardımcı olurlar ve bu matrikslerle dokunun mümkün olan en doğal işlevlere sahip olmasını amaçlarlar. Genellikle odaklanılan alanlar, kıkırdak dokusunun en çok baskıya maruz kalan, özellikle de kıkırdağın yüzeyel alanı olan tanjansiyel bölge, kalsifiye bölge ve kemik veya kas ile bağlantı sağlayan geçiş bölgesini içerir, çünkü her biri kıkırdak fonksiyonu üzerinde kritik bir rol oynar.

Nano yapılı biyomimetik ve biyoaktif matriksler, kıkırdak rejenerasyonu için verimli bir doku iskele sistemidir. Biyomimetik mikro-nano yapılı spiral yapılar, mekanik ve

gözenek özelliklerinin yanı sıra kıkırdak rejenerasyonu için çok arzulanan biyoaktiviteyi de içerir. Hücre yönlendirmesinin ve ECM proteinlerinin üretiminin faydalı etkileri, kondroitin sülfat ve hiyalüronik asitin ve lif yöneliminin birleştirilmesi yoluyla mümkün olduğu gösterilmiştir (Lee vd., 2014).

Hücre büyümesi, çoğalması, göçü ve TGF β -1 salınımını araştırıldığında nanofiberli dokuya sahip bir PCL iskelenin biomimetik olduğu ve tek başına MKH'lerin agrekan üretimine olanak sağladığı bilinmektedir. Ayrıca, HA ve TGF β -1 ile desteklemenin, MKH'lerin kondrojenik diferansiyasyonu için yardımcı olduğu ve osteojenik yol boyunca bir diferansiyasyonu baskıladığı belirtilmiştir (Schagemann vd., 2013).

TGF β -1 ile desteklenmiş kondrojenik ortamın varlığında kültürlenen yapılar, tek başına kondrojenik ortamın varlığında kültürlenen yapılarla karşılaştırıldığında, agrekan ve Kolajen tip II'nin önemli ölçüde arttığını ve ayrıca bol miktarda proteoglikan açısından zengin ekstraselüler matriksi oluşturduğu bildirilmiştir (Li vd., 2005).

Elektrospun PCL nanofiberlerinden oluşan üç boyutlu matrikslerin, kondrositlerin korunması değerlendirildiğinde Gen ifadesi analizi, PCL nanofiber matrikslerine ekilen kondrositlerin kondrositik fenotiplerini koruduğunu göstermiştir. Sonuçlar, PCL nanofiber yapısının kondrositlerin farklılaşmasını ve korunmasını destekleyebileceğini göstermektedir (Li vd., 2003).

Çeşitli çalışmalar, nanofiber matrikslerin kıkırdak dokusu regenerasyonu için kullanımını araştırmıştır. Örneğin, Wise ve meslektaşları, insan mezankimal kök hücreleri ekleyerek kıkırdak rejenerasyonunu başarıyla gerçekleştirdiği nanofiber ve mikrofiber polikaprolakton matriksler geliştirmiştir (Wise vd., 2009).

Sharifi ve meslektaşları kıkırdak dokusu regenerasyonu için polikaprolakton ile birleştirilmiş jelatin/kondroitin sülfat nanofiber matrikslerini üretmişlerdir. Bu çalışma, önemli bir hücresel yapışma ve insan kemik mezankimal kök hücrelerinin nanofiber matriks üzerinde anlamlı bir hücresel yapışma ve yaşama yeteneği gösterdiği gibi kondrojenik belirteçlerin ifadesinin de iyileştiğini göstermiştir (Sharifi vd., 2020).

Farklı yetişkin hücre kaynaklarının kıkırdak onarımı için değerlendirildiği ve elektrospun nanofiber matriksler üzerinde çoğalma ve kondrojenik potansiyellerinin incelendiğinde hücrelerin benzer fenotipik özellikler sergilediği ve matrikslerin tüm hücre tiplerinin büyüme ve farklılaşma süreçlerini desteklediği sonucuna varılmıştır (Shafiee vd., 2016).

Birçok çalışmada MKH'ler hücre bazlı tedavilerde kullanılmış ve çeşitli doku ve organlardaki kusurlarda iyileşme olduğu gösterilmiştir (Shao vd., 2006). Bu tür raporlarda MKH'nin kusur bölgesinde lokalize olduğu ve çoğalma ve farklılaşma yoluyla neo-doku oluşumunu teşvik ettiği düşünülüyordu. Aksine, bazı yeni çalışmalar bu mekanizmayı dışlamış ve MKH tarafından salgılanan büyüme faktörlerinin iyileşme sürecine dahil olacak yerel progenitörleri ve olgun hücreleri etkileyeceği bir parakrin sinyalleme önermiştir (Zhang vd., 2010). Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşması, çevresel kimyasal ve yapısal etki tarafından güçlü bir şekilde etkilenmektedir. Doğal kıkırdak ekstrasellüler matriksinin yoğunluğu nanofiberli kollajen fibrillerden oluştuğundan, son dönemdeki kıkırdak doku mühendisliği araştırmalarının çoğu, benzer nano ölçekli mimariye sahip matriksler geliştirmeye ve kullanmaya odaklanmıştır (Chakraborty vd., 2015).

İn vitro üretilen nanofiber destekli kıkırdakların implant olarak geliştirilmesinin potansiyelini değerlendirildiğinde ve nanofiberler olmadan yetiştirilen kültürlerle karşılaştırıldığında daha yüksek bir ekstrasellüler matriks (ECM) / hücre oranına sahip olduğu bulunmuştur (Dahl vd., 2011).

Tek katmanlı matrikslerle karşılaştırıldığında, çok katmanlı matrikslerin hücre infiltrasyonunu ve gen ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir. Bununla birlikte, tek katmanlı yapılarla karşılaştırıldığında, çok katmanlı PCL yapılarının elastik modülü çok daha düşüktür. Bu veriler, çok katmanlı elektrospun yapılarına kök hücrelerin dahil edilmesinin kondrojenezle ilişkili biyoaktiviteyi uyardığını göstermektedir.

Kıkırdak türevli matrizen (CDM) oluşturulan makro ölçekli matriksler, kondro-indüktif veya kondro-endüktif özellikler gösterir, ancak birçok üretim yöntemi, nano ölçekli mimarinin kontrolüne izin vermez. Bu bağlamda, elektrospun matriksler kıkırdak doku mühendisliği için umut vaat etmektedir. Bununla birlikte, Nanofiberli

malzemeler genellikle nispeten küçük bir gözenek boyutu sergiler ve hücrel infiltrasyonu arttırmak için çok katmanlı liflerin dahil edilmesi gibi teknikler gerektirir (Garrigues vd., 2014).

Son on yılda, hücreli/hücretsiz implante edilmiş elektrospun PCL nanofibröz matrikslerinin etkinliği, **hayvan modellerinde** kıkırdak kusurlarının onarımı için değerlendirilmiştir. Tavşan kemik iliği-mezenkimal kök hücresi (BM-MKH) ile tohumlanan poli(vinil alkol)/polikaprolakton (PVA/PCL) nanofiber matriksler, MKH'lerin kondrojenik farklılaşmasını ve in vitro çoğalmasını desteklemekte, ve MKH'li matrikslerle tedavi edilen hayvanlarda kıkırdak kusurlarının daha iyi iyileştiği gözlemlenmiştir (Shafiee vd., 2011).

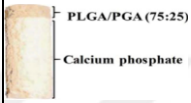
Ayrıca, allojeneik kondrositler veya ksenogenik insan mezenkimal kök hücreleri (MKH) ile tohumlanan biyolojik olarak parçalanabilir poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) elektrospun matriksler, domuz modelindeki kıkırdak kusurlarına implante edilmiş ve altı ay süresince değerlendirilmiştir. Bu yapılar, MKH'lerle tohumlandığında, diğer gruplara kıyasla daha tam bir onarım sağlayarak hiyalin kıkırdak benzeri doku yenilenmesini ve pürüzsüz bir kıkırdak yüzeyinin onarılmasını desteklemiştir (Li vd., 2009).

Kitosan kaplamalı ve kaplamasız PCL nanofiber matriksler üzerine yapılan bir çalışmada, 6 aylık tavşanlarda periosteum altına implantasyon sonrası hücre infiltrasyonu ve kıkırdak üretimi potansiyelleri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan periostal TGF β -1 enjeksiyonlarıyla mineral birikimi ve kıkırdak verimi önemli ölçüde arttırılmıştır (Casper vd., 2010).

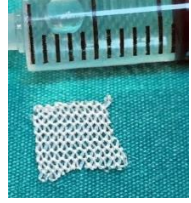
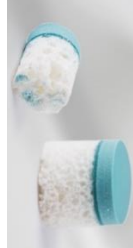
Doku mühendisliği greftlerinin üretimi, hükümet düzenleyici kurumlarının onayı öncesinde bir dizi Ar-Ge replikasyon adımını içerir. Bu adımlar, yerleştirilen greftlerin güvenliğini ve etkinliğini sağlamayı hedefler. Son on yılda, klinik deneme aşamasına geçen bazı doku mühendisliği greftleri, özellikle Avrupa Birliği'nde kıkırdak ve subkondral kemik onarımı için ticari kullanım onayı almıştır. İki yaygın strateji arasında otojenik kondrositlerin kullanılması ve kıkırdak tabakası ile subkondral tabakanın taklit edilmesi bulunmaktadır. Çizelge 1, bileşimi büyük ölçüde değişen bazı ticari olarak bulunan greftleri özetlemektedir (Zhou vd., 2020). Ticari greftlerin çeşitli

bileşenleri arasında kolajenaz türleri, PLGA, PGA, PLA, β -TCP, aragonit ve kondroitin sülfat yer almaktadır. Bu greftlerin farklı tasarımları monofazik, bifazik ve çok fazlı olarak sınıflandırılabilir. Şu ana kadar, Agili-C, BioMatrix CRD, ChondroMimetic, MaioRegen, TruFit Plug ve BST-CarGel gibi greftler Avrupa Birliği’nde klinik olarak onaylanmıştır.

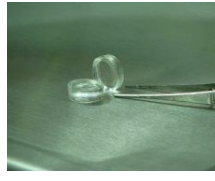
Çizelge 1. Piyasadaki ticari ürünler

Ürün adı	Şirket	Sınıf	Malzemeler	Görsel	Ürün bilgisi
TruFit™	Smith and Nephew	İki Fazlı	PLGA-PGA (75:25), Kalsiyum Sülfat		Avrupa onaylı, USA kısıtlı onay
MaioRegen™	Finceramica	Çok Fazlı	Tip I Kolajen, Magnezyum Enric Hed Hidroksiapatit		Avrupa onaylı
® KondroMimetik	Tigenix	İki Fazlı	Tip II Kolajen , Tip I Kolajen , Kondroitin Sülfat , Kalsiyum Fosfat		Avrupa onaylı
Çevik -C™	Cartiheal Ltd.	İki Fazlı	Aragonit, Stronsiyum ve Magnezyum (kemik)		Avrupa onaylı, USA Klinik test aşamasında (NCT0329 9959)
BioMatrix CRD	Kensey Nash	İki Fazlı	Sığır Kolajen, B-TCP, PLA		Avrupa onaylı

Çizelge 1. (devam)

Agili-C	CartiHeal	İki Fazlı	Aragonit ve Hyalüronik asit (kıkırdak)		Avrupa onaylı, USA Klinik test aşamasında (NCT0329 9959)
BST-CarGel	Piramal life Sciences	Tek Fazlı	Polisakkarit Kitosan Jeli, Gliserofosfat ve Otolog Kan		Avrupa onaylı
CartiFill	Sewon Cellontech	Tek Fazlı	Modifiye Edilmiş Domuz Kolajeni I (Telopeptitlerin Çıkarılmasıyla Sabitlenmiş)		Klinik deney (NCT0268 5917)
Hyalonect	Anika Therapeutics	Tek Fazlı	Hyalüronik asit		
Chondrofix Osteochondral Allograft	Zimmer Biomet	İki Fazlı	Hücreleştirilmiş insan subkondral kemik ve hyalin kıkırdak		

Çizelge 1. (devam)

DeNovo NT	Zimmer Biomet	Tek Fazlı	Canlı hücreler ve 13 yaşın altındaki bağışçılardan elde edilen doğal eklem kıkırdığı içeren parçacıklar		
Chondrotissue	BioTissue	Tek Fazlı	Hyaluronik asit		
NeoCart	Histogenics	Tek Fazlı	Otojen kültüre edilmiş hücrelerin yerleştirildiği sığır kaynaklı bir 3B kolajen matris		
VeriCart	Histogenics	Tek Fazlı	Kolajen		
GelrinC	Regentis	Tek Fazlı	Polietilen Glikol diakrilat (PEG- DA) ve denatüre fibrinojen		
CaReSR	Arthro	İki Fazlı	Kolajen tip I		

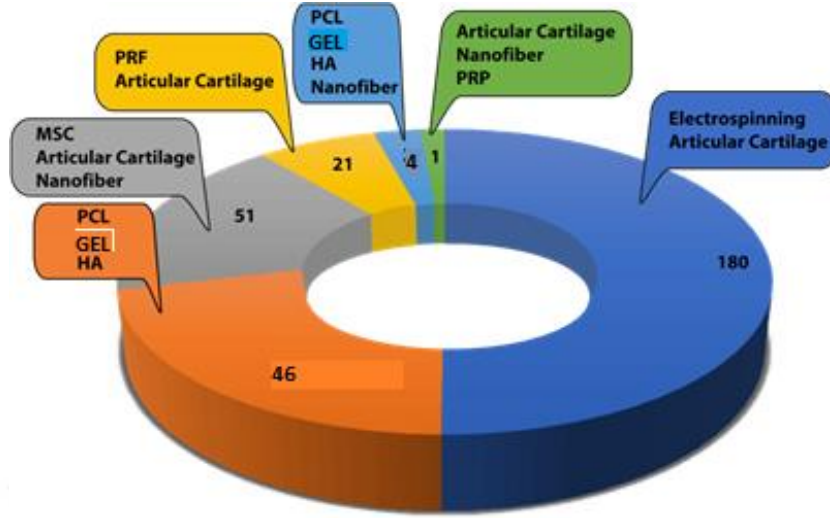
Çizelge 1. (devam)

Hyalofast®	Anika Therapeutics	Tek Fazlı	HYAFF® (benz yl ester of hyaluronic acid)		
Collagraft	Nuecoll Inc.	Tek Fazlı	Beta- Trikalsiyum fosfat (β -TCP), hyalüronik asit ve sığır kolajeni		
OsseoFit Plug	Kensey Nash	İki Fazlı	Kolajen I, ve 80% β - TCP+20% PLA		
BioSeed®-C	BioTissue, AG	Tek Fazlı	PGA-PLA iskelesi, PDS ile güçlendirilmiş ve otojenik kondrositlerle tohumlanmış fibrin		

Özetle, nanofiber matriksleri, kıkırdak doku regenerasyonunu kolaylaştırmada umut vaat eden bir potansiyele sahiptir. Bu matrikslerin çeşitli çalışmalar tarafından hücresel yapışma, yaşama ve kondrojenik diferansiyasyonu teşvik etme konusundaki etkinlikleri vurgulanmış ve kıkırdak doku mühendisliği ve yaralanma rejenerasyonu alanındaki uygulamalar için potansiyel taşıdığı gösterilmiştir (Sharifi vd., 2020).

Literatür Taraması sonuçları için Web of Science, Nature ve Pub Med dizinleri taranmıştır. Dizin aramasında “Polycaprolactone”, “hyaluronic acid”, “Gelatin”, “Nanofiber”, “MSC”, “PRF”, “Electrospun”, ve “Articular Cartilage” anahtar kelimeleri kullanılmıştır. Örneğin Web of science indeksinde “Electrospinning” ve

“Articular Cartilage” içeren 180 makale bulunmuştur. Aşağıdaki Şekil 1’de taranan kelimeler ve bulunan makale sayıları verilmiştir.



Şekil 1. Literatür Taraması

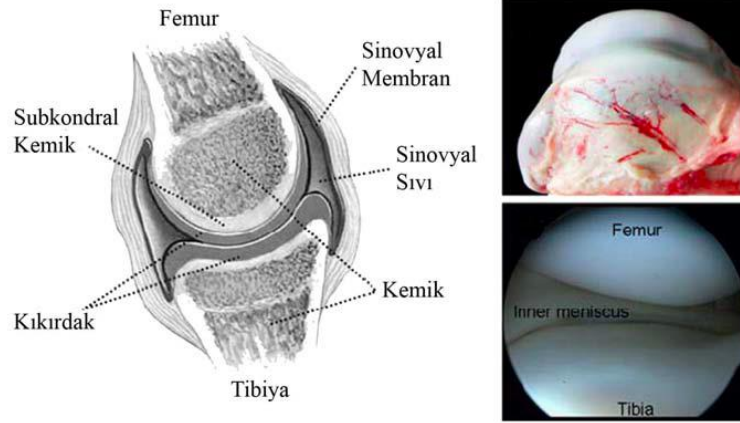
Tezde kullanılan DF-MKH lerin nanofiberlerin içerisine elektroegirme işlemi sırasında dahil edilmesi, nanofiberlerin kıkırdak hasarlarını boşluk kalmayacak şekilde doldurabilen üç boyutlu tasarımı ve seçilen malzemeler doğrultusunda rejeneratif doku mühendisliği bilimi için bu çalışmanın özgün ve inovatif olduğu düşünülmektedir.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Kıkırdak Dokusu

Kıkırdak, hayvansal bir doku olarak özel bir bağ dokusu tipini temsil eder ve embriyonun mezoderm tabakasından gelişir. Kemik hariç diğer bağ dokularından daha sert bir yapıya sahip olmasına karşın, belirli bir bükülebilirlik ve esneklik özelliğine sahiptir. İnsanda, eklem kıkırdağı hareket işlevini yerine getirmek üzere ileri derecede farklılaşmış bir dokudur. Şekil 2, normal bir insan eklem bileşenlerini göstermektedir (Timuçin vd., 2008).

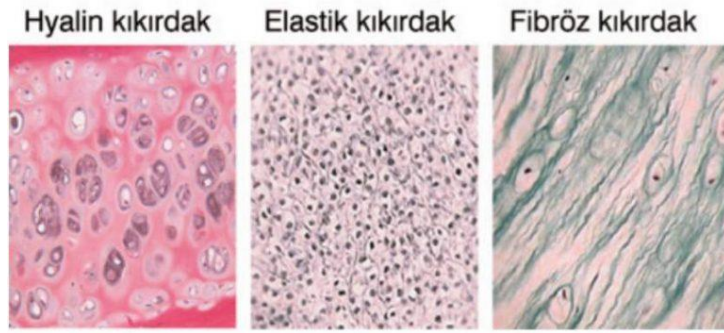
Kıkırdak dokusunda bulunan hücreler ve lifler, jel kıvamında bir temel madde içerisine gömülü halde yer alır. Burada var olan lif türlerine göre farklı kıkırdak tipleri tanımlanır; bu çeşitlilik, organizmanın farklı gereksinimlerinden kaynaklanan zorunluluktur. Kıkırdak dokusu, organizmada damar ve sinir içermeyen dokulara tipik bir örnek olarak gösterilir. Kıkırdak hücreleri bu dokudan difüzyon yoluyla madde alışverişini yaparlar.



Şekil 2. Normal insan eklemine ait bileşenleri

3.2. Kıkırdak Tipleri

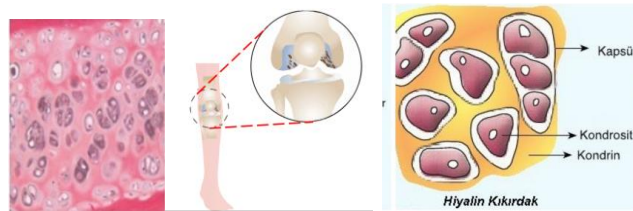
Kıkırdak tipleri hyalin, elastik ve fibröz kıkırdak olmak üzere Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3 Kıkırdak doku çeşitleri

Hyalin Kıkırdak: En fazla bulunan kıkırdak türü olup saydam camsı bir görünüme sahiptir. Yetişkinde kostaların ventral (karına doğru) uçlarında, solunum sisteminin burun, trake, bronş gibi bölgelerinde, kulak kepçesinde, eklem yüzeylerinde bulunan bir dokudur (Şekil 4). Mikroskop altında bakıldığında mavi-beyaz renktedir. Fetüste, hyalin kıkırdak geçici bir iskelet görevi görür ve bu iskelet, endokondral kemikleşme süreci ile kemik dokusu tarafından yer değiştirilir. Bu kıkırdak türü, basınca karşı oldukça dirençli bir yapıya sahiptir. Hyalin kıkırdak içindeki kolajenlerin %90-95'i, kıkırdağa gerilme kuvveti ve biçimini sağlayan Tip 2 kolajenlerden oluşur.

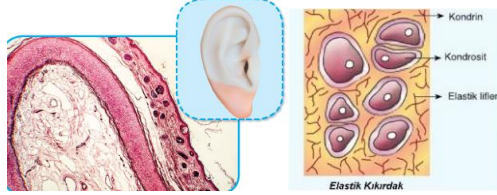
Anatomik olarak insan vücudunda incelendiğinde, oynar eklem yüzeyleri hyalin tip kıkırdak ile kaplanmıştır ve bu yapıya özel bir terim olan “eklem kıkırdağı” adı verilir. Eklem yüzeylerini kaplayan kıkırdak doku, yüksek basınca dayanıklıdır ve sürtünme katsayısını minimuma indirgeyerek, eklem kıkırdağının hasar görmesini önler (Buckwalter vd., 2005).



Şekil 4. Hyalin kıkırdak

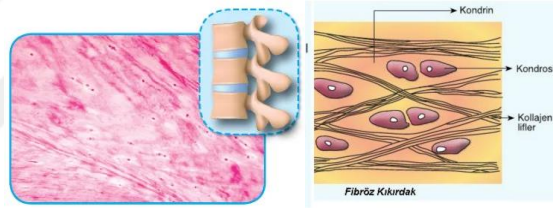
Elastik Kıkırdak: Yapısında baskın olarak elastik liflerin bulunduğu bir kıkırdak türüdür ve organizmada dış kulak, epiglottis (küçük dil) gibi bölgelerde yer alır (Şekil 5). Mikroskop altında incelendiğinde, sarımsı renkte olması nedeniyle hyalin kıkırdaktan kolayca ayırt edilir. Yapısal olarak hyalin kıkırdağa benzer özellikler taşır,

ancak içediği lifler açısından farklılık gösterir. Elastik kıkırdak, içeriğinde bulunan elastin sayesinde elastik özellikler gösterir ve özel boyalarla (örneğin, orsein) işaretlenerek mikroskop altında daha belirgin hale getirilebilir. Bu kıkırdak türünde hücreler yuvarlak ve kapsüllü yapıdadır.



Şekil 5. Elastik kıkırdak

Fibröz Kıkırdak (Fibrokartilaj): Yapısında yoğun kolajen lifler içerir ve sıkı bağ dokusu ile hiyalin kıkırdak dokusu arasında bir geçiş dokusu olarak sınıflandırılır. Bu doku tipi, vücuttaki belirli yerlerde bulunur; özellikle intervertebral diskler (omurlar arası diskler) ve simfizis pubis (göbeğin aşağısı) gibi alanlarda görülür (Şekil 6). Fibröz kıkırdak hücreleri, genellikle tekli veya ikili gruplar halinde yer alırlar.



Şekil 6. Fibröz kıkırdak

Kıkırdak dokusunun başlıca görevleri şu şekilde sıralanabilir:

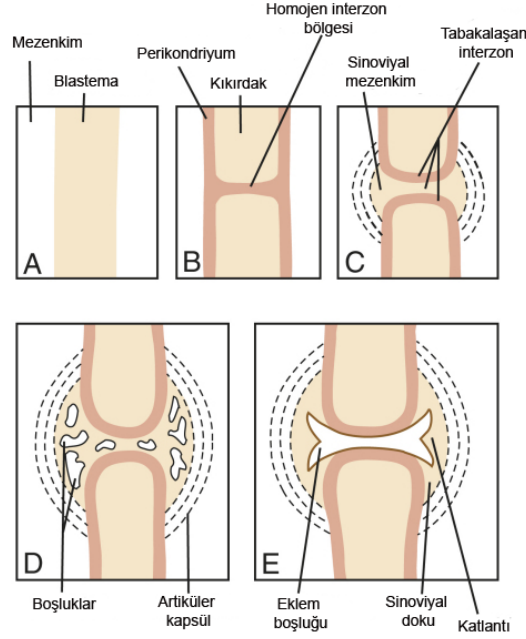
- Yumuşak dokuları koruma ve destek sağlama: Kıkırdak, vücudun yumuşak dokularını destekler ve çeşitli organları koruyarak mekanik hasarlara karşı bir tampon görevi görür.
- Eklem yüzeylerinde bulunarak kemik hareketlerini kolaylaştırma: Kıkırdak, eklem yüzeylerini kaplayarak kemiklerin birbirleri üzerinde düzgün ve ağrısız bir şekilde kaymasını sağlar, bu da hareketlerin daha akıcı olmasına yardımcı olur.
- Embriyoda kemiklerin ve iskelet sisteminin gelişimine yardımcı olma: Kıkırdak, fetüs döneminde iskeletin ilk taslağını oluşturur ve kemikleşme sürecinde kritik bir rol oynar.

- Büyüme çağında özellikle uzun kemiklerin büyümesine destek olma: Uzun kemiklerin büyüme plakalarında bulunan kıkırdak, kemiklerin uzamasını sağlayarak çocukların ve gençlerin büyümesine imkan tanır.
- Solunum sisteminde, trakea ve bronşlar gibi hava yollarının yapısına girerek bu yapıların kapanmasını önleme: Kıkırdak, solunum yollarının açık kalmasını sağlayarak, hava akışının sürekli olmasına ve solunumun etkin şekilde gerçekleşmesine yardımcı olur.

3.3. Eklem Kıkırdağı Genel Özellikleri

Sinovyal eklem yüzeylerini kaplayan kıkırdak türü hyalin kıkırdaktır. Hyalin kıkırdak, en sık karşılaşılan kıkırdak türüdür ve saydam, camsı, mavimsi beyaz ile sedef renginde bir görünüme sahiptir. Bu görsel özelliği, Sinovyal eklemlerin yüzeylerini kaplayarak, yapısındaki kolajen liflerinin içinde gömülü olduğu temel madde ile benzer kırılma indeksine sahip olmasından kaynaklanır. Fetal dönemde geçici bir iskelet işlevi gören hyalin kıkırdak, sonrasında endokondral kemikleşme süreciyle kemik dokusu tarafından yer değiştirilir (Gartner ve Hiatt, 2012).

Klasik embriyolojiye göre, eklem kıkırdağı kemik taslaklarının oluşumunu takiben, epifiz bölgesinde gerçekleşen endokondral kemikleşme sonrasında hayat boyu sürecek şekilde eklem yüzeylerini kaplayan kalıcı bir tabaka olarak işlev görmektedir. Bu durum, hyalin kıkırdağın vücuttaki önemli rollerinden birini vurgular ve onun eklem hareketlerindeki önemli rolünü ortaya koyar (Topaloğlu vd., 2017).



Şekil 7. Sinoviyal eklem gelişiminin şematik gösterimi

A. Yoğunlaşma: Eklem, çevre mezenkimden değil, yoğunlaşan blastemadan gelişir. Bu yoğunlaşma, eklem bölgesinde hücrelerin daha sıkı gruplar halinde bir araya gelmesiyle karakterizedir.

B. Kıkırdaklaşma ve İnterzon Oluşumu: İnterzon, avasküler (kan damarı içermeyen) ve yüksek hücre yoğunluğuna sahip bir bölgedir. Bu aşamada, eklem kıkırdaklarının temel yapısının oluşumu gerçekleşir.

C. Sinoviyal Mezenkimin Oluşması: Sinoviyal mezenkim, interzonun periferinden ve kan damarlarının bulunduğu bölgeden gelişir. Bu mezenkim hücreleri, eklem içi sinoviyal zarın oluşumunda önemli bir role sahiptir.

D. Kaviteleşme: Kaviteler, interzonun periferinde ve merkeze yakın bölgelerde oluşur. Bu kaviteler zamanla birleşerek eklem boşluğunu (eklem kapsülünü) oluştururlar.

E. Erişkin Eklem Yapısı: Bu son aşamada, eklem tamamen gelişmiş ve olgunlaşmış bir yapıya kavuşur. Eklem yüzeyleri kıkırdakla kaplıdır ve sinoviyal zar, eklem boşluğunu saran ve eklem sıvısını üreten yapıdır.

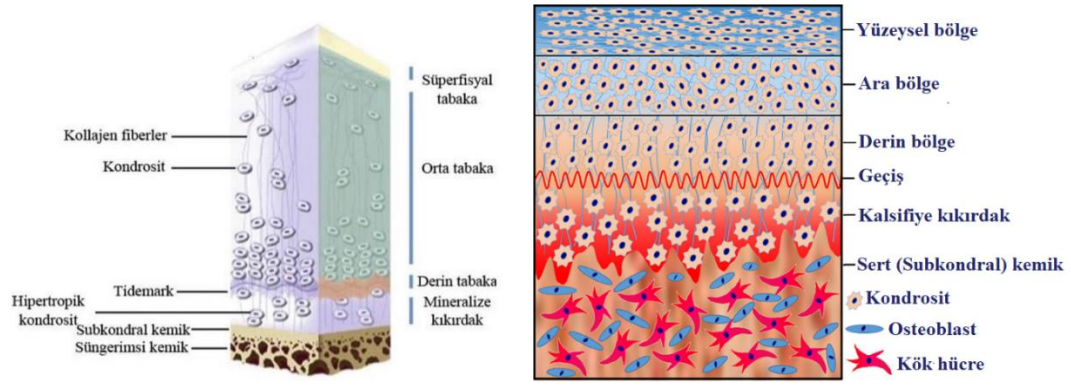
Bu aşamalar, eklem gelişiminin karmaşık ve aşamalı bir süreç olduğunu ve çeşitli hücre ve doku etkileşimlerinin bu süreçte önemli rol oynadığını gösterir (Şekil 7).

Eklem kıkırdakları, eklemlerdeki kemik yüzeylerini kaplayan beyaz, dayanıklı ve kaygan bir dokudur. Bu doku, kemiklerin birbiri üzerinde düzgün kaymasını, rotasyon

yapmasını ve yük transferini sağlar (Sophia Fox vd., 2009). Hücre içeriği düşük olan bu dokunun, asıl olarak aselüler olarak kabul edilen %1.7 hacimsel orana sahiptir. Ekstraselüler matriks, kolajenin gerilme kuvvetini sağlarken, proteoglikan yapısı sıkışmaya karşı direncini temin eder (Poole vd., 2001). Eklem kıkırdağı ince bir tabakadır ve lokalizasyona bağlı olarak kalınlığı değişebilir, ancak kompresif yüklere tamamen adapte olmuştur. Stres gevşemesi, eklem kıkırdağının viskoelastik özelliklerini gösterir ve uygulanan yükler karşısında direnç gösterir. Eklem kıkırdağının dayanıklılık ve fonksiyonları, ekstraselüler matriks moleküler düzenine bağlıdır, özellikle kolajen liflerinin mimarisi bu fonksiyonları belirlemede önemlidir. Kıkırdak dokusu, özgün yapısı sayesinde ağır yüklere maruz kalmasına rağmen eklem yüzeylerinde kayganlaştırma, şok emilimi ve aşınmaya dayanıklılık gibi temel fonksiyonları yerine getirebilir. Kıkırdak dokusunun düşük metabolik aktivitesi, matriks devamlılığını sürdürmeyi amaçlar, ancak genellikle dokuda oluşan hasarı tamir etme konusunda yetersiz kalabilir. Bu durum, kıkırdak dokusundaki hasarların genellikle tamir edilemediği ve çeşitli hastalıklara yol açabileceği anlamına gelmektedir (Flik vd., 2007).

Eklem kıkırdağı 4 farklı zondan oluşur: yüzeyel, orta, derin ve kalsifiye zon (Şekil 8). Bu tabakaların hücre tipleri ve moleküler bileşimleri çeşitlilik göstermektedir. Bu tabakalar arasındaki morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel farklılıklar, eklem yüzeyinden olan derinliklerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir ve özellikleri Çizelge 2’de verilmiştir (Zhang vd., 2020a).

Yüzeyel zonda kondrositler yassı, birbirlerine yakın ve kolajen lifler eklem yüzeyine paralel görülür. Orta zonda kondrositler oblik formda ve kolajen fiberler rasgele farklı yönlerde organize olmuştur. Derin zonda kolajen fiberler eklem yüzeyine göre dikleşmeye başlar ve kondrositler tek sıra kolon şeklinde sferik boyut kazanır. Derin zondaki kolajen fiberler tidemark ı geçerek kalsifiye kıkırdağa ulaşır ve bu sayede subkondral kemik üzerinde yapısal stabiliteyi sağlamaktadır (Newman, 1998).



Şekil 8. Eklem kıkırdağının yapısının şematik gösterimi

Çizelge 2. Kıkırdak doku tabakaları ve özellikleri

Kıkırdak Doku Tabakaları	Biyokimyasal Kompozisyon		Yapısal Özellikleri	Mekanik Özellikleri
	Hücreler	Malzemeler		
Kıkırdak	Kondrosit morfolojisi, kıkırdak yüzey bölgesinde düzleşir ve derin bölgede giderek yuvarlak ve elips şeklinde olur.	Tip 2 kolajen fibriller kıkırdak yüzey bölgesinde eklem yüzeyine paralel, derin bölgede ise giderek eklem yüzeyine dik hale gelirler.	Kıkırdak, %60-85 gözenekliliği ve 2-6 nm gözenek boyutuna sahip oldukça sıkı bağ yapısına sahip bir dokudur.	Kıkırdak sıkıştırma modülü, yüzeysel bölgeden derin bölgeye doğru 0.2-6.44 MPa'a yükselir.

Çizelge 2. (devam)

Kalsifiye Kıkırdak	Kalsifiye kıkırdaktaki kondrosit boyutu kıkırdaktakinden daha yüksektir.	Kolajen fibriller subkondral kemiğe sabitlenir, kıkırdak ve subkondral kemiği tutar.	Kalsifiye kıkırdak, kıkırdaktan kemiğe geçiş bölgesi olup; gözenek boyutu ve gözenekliliği kademeli olarak değişir.	Kıkırdak, kalsifiye kıkırdak ve kemiğin sıkıştırma modülü değerleri, anizotropik özellikler sergiler ve derinliğe bağlı bir şekilde değişir.
---------------------------	--	--	---	--

3.4. Eklem Kıkırdağı Bileşenleri

Eklem kıkırdağının yapısal bütünlüğü, kondrositler, matriks sıvısı ve makromoleküler yapılar gibi bileşenlerden meydana gelir. Kondrositler tarafından kontrol edilen matriks sentezi ve yıkımı arasındaki denge, normal doku metabolizmasını sağlar. Bu dengeyi etkileyen pek çok faktör vardır. Kompresif yükler, yaşlanma, travma, hormonlar ve sitokinler bu faktörler arasında sayılabilir.

Kondrositler: Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması sonucu oluşur. Yaklaşık sekizinci gebelik haftasında, bu mezenkimal kök hücreleri toplanarak kıkırdak matriksi üretir ve böylece kıkırdak dokusu ilk kez oluşur (Buckwalter vd., 1998). Mezenkimal kök hücrelerinden türeyen ilk genç kıkırdak hücreleri kondroblast olarak adlandırılır. Bu hücreler, yetişkin kondrositlerine göre daha küçük ve yassıdır, ayrıca çok sayıda hücresel uzantıları ile yoğun hücresel ara bağlantılara sahiptir. Bu bağlantılar, hücreler arasında matris oluşumu ve sonraki bölünmelerle hücreler

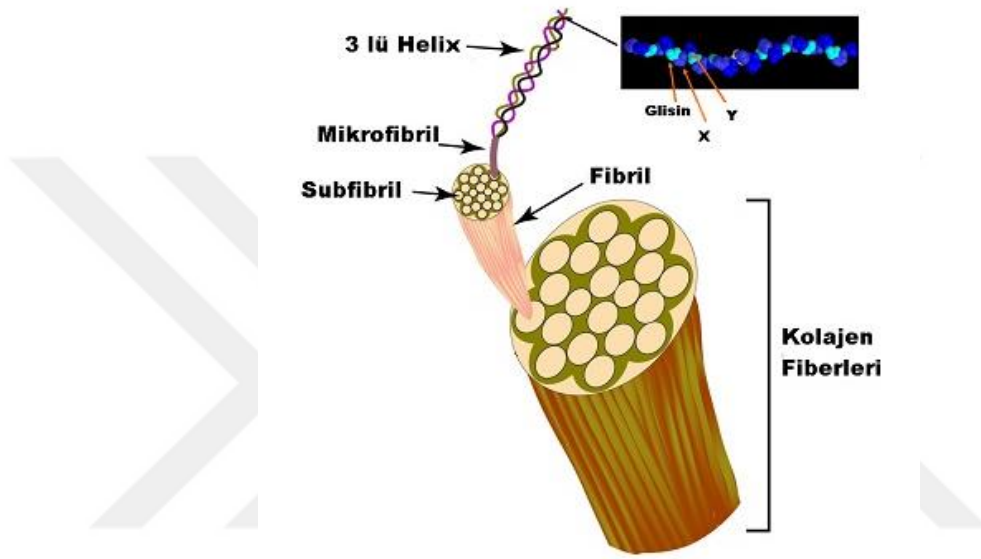
birbirinden ayrıldıkça kaybolur. Hücreler birbirinden ayrıldıkça ve daha yuvarlak bir form kazandıkça, kıkırdak dokusu mikroskopik olarak ayırt edilir bir hale gelir. Bu oluşum ve büyüme evresinde, hücre yoğunluğu maksimum düzeyde olup, kondroblastlar sürekli olarak hızla bölünür ve yüksek hacimlerde matriks üretir, bu da hücrelerin bu aşamalarda en yüksek metabolik aktivite düzeyine sahip olmalarını sağlar (Outerbridge, 1961). Bu hücreler olgunlaştıkça bölünme yeteneklerini yitirir ve metabolik olarak daha az aktif bir hale geçer; bu evredeki hücelere kondrosit adı verilir. Kondrositler olgunlaşırken büyüme ve daha yuvarlak bir forma bürünme eğilimindedir. İskeletin gelişim süreci boyunca metabolik aktivite, matriks sentezi hızı ve hücre bölünme oranı giderek azalır (Buckwalter, vd., 1998). İskelet gelişimi tamamlandıktan sonra, kondrositler genellikle bölünmez ve yalnızca matriks sentezine devam ederler.

Ekstraselüler Matriks: Eklem kıkırdak dokusunun kütlelerinin yaklaşık %65-80'ini su oluşturur. Su haricindeki ekstraselüler matriks (ECM) içeriği esas olarak kolajen ve proteoglikanlar tarafından sağlanmakta olup, ayrıca lipitler, fosfolipitler, kolajen dışı proteinler ve glikoproteinler de matriks içeriğinde mevcuttur.

Su: Kıkırdak dokunun yaş ağırlığının yaklaşık %80'ini su oluşturur. Bu oran, yüzeysel bölgede, derin bölgelere kıyasla daha yüksektir. Bu yüksek su oranı, yük bağımlı deformasyonların önlenmesine olanak sağlar. Ayrıca, metabolik aktivitenin sürdürülmesine yardımcı olur ve düşük sürtünmeli bir kayma yüzeyi oluşturarak hasarların en aza indirilmesine katkıda bulunur (Bhosale ve Richardson, 2008). Su miktarı, kolajen ağının organizasyonu ve şişme direnci ile ilişkilidir, bu da suyun matris molekülleriyle etkileşimi sonucu mekanik özelliklerin değişebileceğini göstermektedir (Seo vd., 2011). Normal yaşlanma sürecinde su içeriği azalırken, osteoartrit gibi patolojik durumlarda ise artış gözlemlenir. Artan su miktarı, geçirgenliği artırır, mekanik güçte kayba yol açar ve elastikiyeti azaltır.

Kolajen: Matriksin ana yapısal bileşenleri arasında kolajen molekülleri yer alır. Kondrositler tarafından çeşitli kolajen tipleri sentezlenir (Williams ve Niederauer, 2007). Eklem kıkırdağında %95 oranında tip 2 kolajen bulunurken, geri kalan %5'lik kısım tip 6, 9, 10 ve 11 kolajenlerden oluşur (Mollenhauer, 2008). Kolajen liflerinin her biri, birbirine çapraz kovalent bağlarla bağlanmış üç adet polipeptid zincirinden

meydana gelen üçlü heliks yapısına sahiptir. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde, birbirlerini çaprazlayan lifler arasında özellikle tip 2, 9, 11 kolajen liflerinin yaygın olduğu belirlenmiştir. Bu yapı, kıkırdağa ekstra gerginlik sağlar ve üzerine binen yükler karşısında dayanıklılık kazandırır (Tyyni ve Karlsson, 2000). Ayrıca, kolajen lifleri, oluşturdukları ağ yapısı sayesinde büyük proteoglikan moleküllerini hapsederek, kıkırdağın şok emici özelliklerinin ortaya çıkmasında kritik bir rol oynar (Williams ve Niederauer, 2007).



Şekil 9. Kolajen yapısı

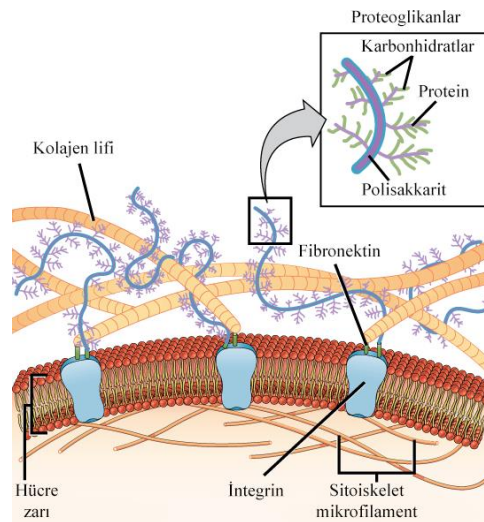
Kıkırdak dokusunun gerginliği, kolajenlerin sahip olduğu yaygın çapraz bağlar ve fibrillerin mimarisi ile doğrudan ilişkilidir. Kolajen fibriller, üç eş α -1(II) zincirinin heliks yapısında birleşerek oluşur ve kıkırdak matrisinin temel mimarisini teşkil eder (Şekil 9). Bu yapısal düzen, kıkırdak dokusunun mekanik özelliklerini belirleyici önemli bir faktördür.

Proteoglikanlar: Protein çekirdeklerine kovalent bağlar ile bağlanmış polisakkarit zincirlerinden oluşan makromoleküllerdir (Şekil 10). Bu moleküllerin temel yapı taşı karbonhidratlardır. Bu yapısal özellik, proteoglikanların hücresel matris içerisindeki biyolojik işlevlerini ve yapısal bütünlüğünü destekleyici rolü açısından kritik öneme sahiptir.

Eklem kıkırdağı, iki ana proteoglikan sınıfını içerir: majör ve minör proteoglikanlar. Agregan, hiyalin kıkırdağı belirleyen majör proteoglikandır ve güçlü negatif yük

taşıyan kondroitin sülfat ve keratin sülfat zincirlerini içerir. Agreganın N-terminal protein yapısı, hyalüronik asit ve bağlantı proteini için yüksek afinite gösteren bir protein parçasını içerir ve bu, moleküllerin bir araya toplanmasından sorumludur (Kiani vd., 2002). Minör proteoglikanlar olan dekorin, biglikan ve fibromodulin, matriksin sağlamlığına önemli katkılarda bulunur. Bu proteoglikanlar, tip II kolajene bağlanarak kolajen ağının organizasyonuna katılır. Bu proteoglikanlar ayrıca, tip VI kolajene bağlanarak matrikste küçük agregatlar oluşturur ve dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ile bağlanarak kıkırdak dokusundaki fonksiyonları düzenler (Buckwalter vd., 1998).

Kolajen matriks içerisinde bulunan büyük ve yüksek elektrik yüklü proteoglikan yumaklarının varlığı, eklem kıkırdağına belirgin biyomekanik özellikler kazandırır. Bu yapıların taşıdığı negatif yük, pozitif yüklü katyonları çekerek dokunun osmolalitesini artırır. Bu özellik, eklem kıkırdağının yüksek dokusal basıncına katkıda bulunur ve tip II kolajen matriksin şişmesini engelleyerek, doku bütünlüğünün korunmasını sağlar. Eklem kıkırdağı, sahip olduğu yüksek hidrostatik basınç ile aksiyal yüklere karşı dirençli hale gelir. Yüklenme esnasında, kıkırdaktan salınan su, sürtünmeyi azaltmak amacıyla ince bir sıvı tabakası oluşturur. Yük ortadan kalktığında, bu sıvı tekrar kıkırdak tarafından emilir. Bu dinamik süreç, kıkırdağın viskoelastik özelliklerini ortaya çıkarır ve sinovyal sıvı döngüsü aracılığıyla hücre beslenmesi ile atıkların uzaklaştırılmasını destekler.



Şekil 10. Eklem kıkırdağı ekstraselüler matriks bileşenleri

3.5. Eklem Kıkırdak Hasarı

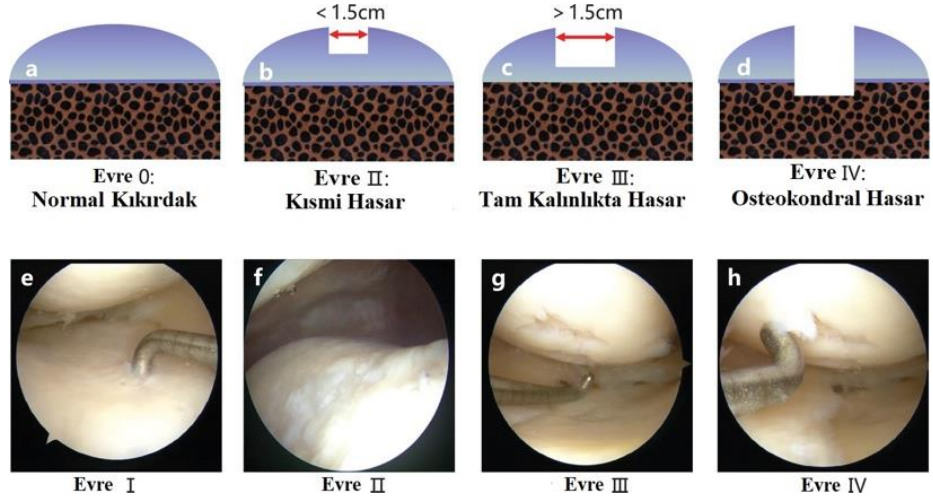
Artiküler kıkırdağın hastalıklı ve travmatik doku bozuklukları, yapısal ve fonksiyonel olarak doğal kıkırdak dokusunun özelliklerinin korunması amacıyla bir dizi deneysel ve klinik deney ile tedavi edilmeye çalışılmıştır. Bu süreç, hücre dışı matrikste proteoglikanların kaybıyla başlar ve bu durum kolajenöz fibriller ağının yapısında bozulmalara sebep olur. İlerleyen aşamalarda hücre metaplazisi ve hücre kaybı gibi ciddi değişiklikler görülür. Bu patolojik süreçler, tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için önemli bir odak noktasıdır (Lee vd., 2003).

Bu kayıplar, kemik iliği hücrelerine erişimden ötürü bir onarım tepkisi ortaya çıkarabilir. Bununla birlikte, bu yapılar tipik olarak fibrokartilaj ile doludur. Bu tip tamir dokusu, hiyalin kıkırdağa göre çok daha zayıftır ve zayıf basınç dayanımı ve dayanıklılığından ötürü zayıf uzun dönem performans gösterir ve yavaş yavaş dejenerasyona yol açar.

Tüm bu yaralanma türlerinin iyileşme süreleri farklılık gösterir. Lezyonun lokalizasyonu, iyileşme sürecinin prognozunu etkileyen önemli bir faktördür. Ayrıca, hasta yaşının, cinsiyetinin, aktivite düzeyinin, obezite durumunun ve mesleğinin de iyileşme sürecine etkisi bulunmaktadır. Bu faktörlerin her biri, tedavi sonuçlarını ve iyileşme hızını doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebilir.

3.6. Kıkırdak Hasarı Sınıflamaları

Kıkırdak hasarlarının sınıflamasında kullanılan ilk sınıflama sistemi Outerbrigde tarafından tanımlanmıştır (Şekil 11) (Outerbridge, 1961). Kıkırdak hasarı ve bu lezyonların tedavisine karşı artan ilgiyle beraber International Cartilage Repair Society (ICRS) fokal kıkırdak lezyonlarının sınıflamasında kullanılmak üzere günümüzde yaygın olarak kullanılan artroskopik bir sınıflama sistemi tarif etmiştir (Çizelge 3) (Redman vd., 2005).



Şekil 11. Kıkırdak hasarı sınıflandırılması şematik gösterimi

Çizelge 3. Kıkırdak yaralanmasının sınıflandırılması

Derece	Modifiye Outerbridge	ICRS	Outerbridge
0	Normal Kıkırdak	Normal Kıkırdak	Normal
I		Normale yakın kıkırdak	
IA	Kıkırdakta Yumuşama	Yüzeyel yumuşama	Yumuşama, şişme
IB		Yüzeyel çatlak, yarıklar	
II	Yüzeyel ülserasyon, fibrilasyon kıkırdak derinliğinin % 50'si etkilenmiş	Anormal kıkırdak etkilenmesi %50'nin altında	%50'den az fragmentasyon ve fissür

Çizelge 3. (devam)

III		%50 üzerinde lezyon	
IIIA	Derin ülserasyon fibrilasyon kemik ekpose olmadan %50 üzerinde kırıkta hasarı	Kalsifiye kırıkta kadar	%50'den fazla fragmentasyon ve fissür
IIIB		Subkondral kemiğe kadar	
IV	Ekspoz kemik; tam kat kırıkta lezyon	Şiddetli anormal kemik açıkta	Subkondral kemik açıkta
ICRS: Uluslararası Kırıkta Araştırma Derneği			

3.7. Kırıkta Hasarında Uygulanan Güncel Tedavi Yöntemleri

Eklem kırıktağının avasküler doğası nedeniyle, kırıkta dokusunun hasarı, rejenerasyon için sınırlı bir potansiyel gösterir (Fox vd., 2009). Dizdeki kırıkta kusurları ağrıya, şişmeye ve osteoartritin erken gelişimine neden olabilir. Kırıkta yaralanmaları ve osteoartritte kullanılan ya da araştırma aşamasında olan cerrahi tedavi yöntemlerinin tümü, kırıkta hasarlarının yapısal ve fonksiyonel olarak sağlıklı kırıktağın benzer bir yapı ile onararak uzun vadeli dayanıklılığı sağlama amacını taşır. Bu süreçlerin asıl hedefi, kırıkta yüzeyinin restorasyonunu gerçekleştirerek,

hastaların ağrı ve fonksiyon kısıtlılıklarını azaltmak ve eklem dejenerasyonunun daha ileri seviyelere ulaşmasını önlemektir.

Ameliyatsız Tedavi : Cerrahi olmayan tedaviler (aşağıda listelenmiştir) semptomları hafifletmek ve kıkırdak dejenerasyonunu önlemek veya yavaşlatmak için kullanılır. Genellikle bir yaralanmayı takip eden ilk dönemde veya artritte olduğu gibi kıkırdak kaybının yoğun olduğu durumlarda kullanılırlar.

- Şişliği azaltmak için etkilenen eklem her bir veya iki saatte bir 15 dakika boyunca buz uygulamak
- Şişmeyi azaltmak için eklemi yükseltmek
- Ağrıyı ve şişliği azaltmak için asetaminofen gibi reçetesiz satılan antiinflatuar ilaçların alınması
- Ağrıya neden olan veya etkilenen eklemde yoğun kullanımı içeren spor ve aktivitelerden kaçınmak
- Kıkırdak hasarını “boşaltmak” (veya üzerindeki ağırlığı azaltmak) için boşaltıcı desteği kullanmak
- Enflamasyonu ve ağrıyı azaltmak için kortikosteroid enjeksiyonları
- Viskosupplementasyon, doktorun etkilenen eklem **Hyaluronik Asit, PRP** enjekte ettiği bir tedavidir. Bu, etkilenen eklem yağlar, eklemdeki kemikler arasındaki sürtünmeyi azaltır ve ağrıyı azaltır.

Tedavi süreçlerinde kullanılan HA enjeksiyonlarının umut vaat eden özelliklerine rağmen, potansiyel riskler de göz ardı edilmemelidir. HA enjeksiyonlarının olası yan etkileri arasında enjeksiyon bölgesinde ağrı, şişlik, ısı ve nadir durumlarda alerjik reaksiyonlar veya enfeksiyon yer alabilir (Adams vd., 2000). Enjeksiyon bölgesinde ağrı, şişme veya enfeksiyon riski bulunmaktadır, bu yan etkiler nadiren ciddi olmakta ve tedavinin etkinliğini sürdürmek için periyodik enjeksiyonlar gerekebilmektedir. HA

enjeksiyonları, diğer OA tedavi seçeneklerine kıyasla daha maliyetlidir (Seçkin vd., 2024).

Eklem içi enjeksiyon tedavisi genellikle cerrahi operasyonlardan önce, ağrıyı hafifletmeyi, iltihabı azaltmayı ve eklem hareketliliğini arttırmayı amaçlayan kortikosteroidler, hyaluronik asit veya trombosit açısından zengin plazma gibi terapötik ajanların eklem boşluğuna doğrudan verilmesini içerir (Fusco vd., 2021).

Cerrahi tedavi : Kıkırdak lezyonlarının tedavisinde kullanılan çeşitli cerrahi teknikler, tam kat lezyonlar sonrası kıkırdağın kendi iyileşme mekanizmasını harekete geçirir. Ancak, daha ileri teknikler, eklem kıkırdak yüzeyinin rejenerasyonunu yeni kıkırdak oluşturabilme kapasitesine sahip dokular veya hücreler aracılığıyla sağlamayı hedefler (Hunziker, 2002). Hiyalin kıkırdağa en yakın iyileşme sonuçları osteokondral otogreft transferi, otolog kondrosit implantasyonu ve hem hücreli hem de hücresiz olarak kullanılan doku mühendisliği ile üretilen matris materyallerle elde edilmiştir. Buna rağmen, hâlâ yeterli hiyalin benzeri kıkırdak özelliği gösteren kıkırdak üretimi tam anlamıyla sağlanamamıştır (Iwasa vd., 2009).

Ancak belirli bir bölgedeki kıkırdak hasarını, özellikle de akut bir yaralanmanın sonucuysa, tedavi etmede oldukça etkili prosedürler vardır.

- **Mikro kırık :** Cerrah, hasar görmüş eklem kıkırdağının altındaki kemikte ve kemik iliğinde küçük delikler açar. Bu delikler kemiğin kendisini onarmasını teşvik eder ve kemik iliğindeki hücrelerin hasarlı kıkırdağı onarmasını tetikler. Ancak yeni oluşan kıkırdak dokusu fibrokıkırdaktır. Bu fibrokıkırdak, eklemdaki kemiklerin doğrudan birbirine sürtünmesini önleyebilir ancak normal, sağlıklı eklem kıkırdağı kadar etkili veya dayanıklı değildir.
- **Osteokondral Otogreft/Mozaikplasti :** Bu prosedürde cerrah, eklem ağrılı taşımayan kısmından küçük bir sağlıklı eklem kıkırdağı tıkaçını ve alttaki kemiği çıkarır. Daha sonra, küçük bir deliğin açıldığı yaralanma yerine, tıkaç (bazen birkaç tane) takılır. Bu prosedür, eklem kıkırdağının pürüzsüz yüzeyini onararak eklem ağrısız ve sorunsuz hareket etmesini sağlar. Dizdeki kıkırdak kaybının bu şekilde tedavi edilebilecek alanı sınırlıdır, çünkü dizde tıkaçların alınabileceği ağırlık taşımayan yalnızca birkaç bölge vardır.

- **Osteokondral Allograft** : Bu prosedür yukarıda açıklanan osteokondral otograft işlemine benzer ancak kadavradan (donör) alınan doku kullanılır. Özellikle büyük eklem kıkırdağı yaralanmalarının tedavisi için uygundur; ancak nakledilen kıkırdak hastanın kendi kıkırdağı kadar dayanıklı değildir.
- **Otolog Kondrosit İmplantasyonu (ACI)** : Bu prosedürde cerrah, sağlıklı eklem kıkırdağını eklem ağrılık taşımayan kısmından çıkarır. Bu doku, kondrosit adı verilen hücrelerinin toplandığı ve birkaç hafta boyunca büyütüldüğü bir laboratuvara gönderilir. İkinci bir cerrahi prosedürde, cerrah, hasarlı eklem kıkırdağının bulunduğu bölgeye kondrositleri yerleştirir ve bölgeyi bir yama veya yapıştırıcıyla kaplar. Kondrositler daha sonra yeni kıkırdak oluşturur.
- **Matris Otolog Kıkırdak İmplantasyonu (MACI)** : Bu prosedür, bir farkla ACI'ye benzer. MACI aynı yaklaşımı kullanır; yalnızca kondrositler, bir cerrahın daha sonra hasarlı eklem kıkırdağı alanına yerleştireceği bir kolajen membran (matriks veya iskele adı verilen) üzerinde büyütülür.

Kıkırdak hasarlarının tedavi edilme kapasitesine bağlı olarak klinik tedavi yöntemleri çeşitli kategorilere ayrılmaktadır. Geçici tedavi yöntemleri (palliative treatment methods), genellikle hasarlı kıkırdağı tam olarak iyileştirmemekle birlikte, ağrı ve semptomları hafifletmeye yöneliktir. Buna karşın, onarıcı tedavi yöntemleri (reparative treatment methods), hasarlı bölgeyi biyolojik malzemeler kullanarak iyileştirmeyi amaçlar. Bununla birlikte, kıkırdak, kemik ve kıkırdak-kemik ara yüzünün özgün yapısı nedeniyle, en ideal yöntem olarak güçlendirici tedavi yaklaşımı (restorative treatment) öne çıkmaktadır. Bu yaklaşım, hasarlı dokunun yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü restore etmeyi hedefler.

Geçici tedavi yöntemleri (palliative treatment methods) :

Kıkırdak hasarlarını minimal zararlarla tedavi edebilen klinik uygulamalardan biri artroskopik debridman prosedürüdür (Upmeier vd., 2007). Artroskopi, eklem hastalıklarının tanı ve tedavisi için minimal invaziv bir cerrahi teknik olarak, küçük insizyonlar kullanılarak gerçekleştirilir (Şekil 12). Bu yöntem, hasar görmüş kıkırdak veya kemik dokusunu etkilenen bölgeden uzaklaştırma işlemine dayanır. Ancak, çıkarılan hasarlı dokunun yerine yeni bir doku eklenmemesi, bu teknikle ilişkili başlıca

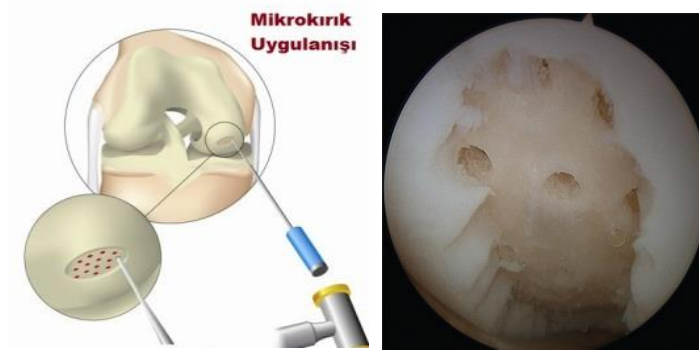
dezavantaj olarak kabul edilir. İşlem sürecinde, hasarlı bölgeden elde edilen tüm doku atıkları yıkama yoluyla temizlenir.



Şekil 12. Artroskopik debridman uygulaması

Onarıcı tedavi yöntemleri (reparative treatment methods) :

Geçici tedavi yöntemlerine kıyasla daha kapsamlı cerrahi müdahale gerektiren bir yöntem olan mikrokirik, kondral hasarların tedavisinde başvurulan ilk tekniklerdendir (Steadman vd., 2001). Bu yöntemde, hasarlı kıkırdak alanı öncelikle temizlenir. Ardından, alttaki kemiğe 1.5-2 mm çapında delikler açılarak kemik iliğine ulaşılır (Şekil 13). Tedavinin temel amacı, kemik iliğinde bulunan kök hücrelerin hasarlı kıkırdak bölgesine göç etmesini ve eklem ortamında kıkırdak benzeri bir tamir dokusu oluşturarak onarımını sağlamaktır.

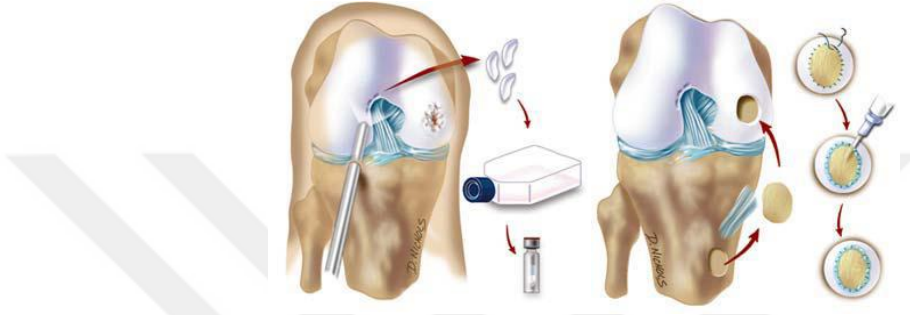


Şekil 13. Mikrokirik yöntemi şematik gösterimi

Güçlendirici tedavi yöntemleri (restorative treatment methods) :

Bu yöntem iki aşamalı cerrahi yöntem olup, öncelikle artroskopik cerrahi ile sağlam eklem kıkırdağından bir örnek alınır. İsteğe bağlı olarak, bu cerrahi sırasında eklem içinde mevcut olan diğer sorunlar (örneğin bağ yetmezliği veya menisküs yırtığı gibi) de giderilebilir. Alınan kıkırdak hücreleri, laboratuvar ortamında çoğaltıldıktan sonra, ilk işlemde yaklaşık 4-6 hafta sonrasında, ikinci bir cerrahi ile hasarlı kıkırdak

bölgesine implant edilir. İnsan hücrelerinin vücut dışında çoğaltılması yüksek standartları gerektirir. Hastalık taşınmaması, istenmeyen hücrelerin üretilmesinin önlenmesi ve hasta güvenliği açısından bu standartlara, GMP (İyi Üretim Uygulamaları) adı verilir ve uyulması şarttır. Geçmişte jöle kıvamında hazırlanan kıkırdak hücreleri, günümüzde çoğunluğu vücutta zamanla eriyen, kolajen veya hyalüronik asit temelli matrisler üzerine yerleştirilmektedir (Şekil 14). Bu hücre yüklü matrisler, şekillendirilebilir ve sağlam bir şekilde tespit edilebilir oldukları için günümüzde tercih edilen yöntemlerdendir



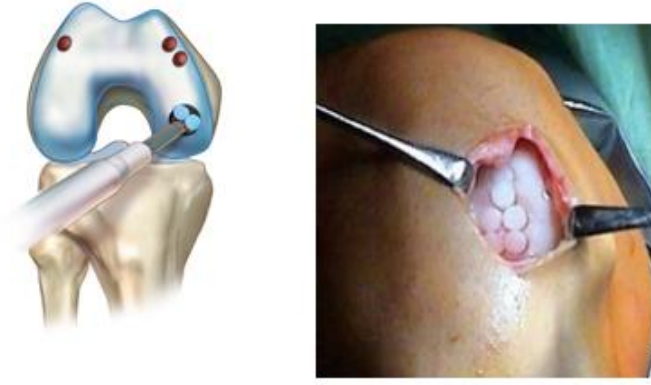
Şekil 14. ACI (Otolog Kondrosit İmlantasyonu) şematik gösterimi

ACI prosedüründe ilk basamak başlangıç biyopsisi ve ikinci basamak kültürde üretilmiş kondrosit hücrelerinin periost yama ile birlikte hasarlı bölgenin hazırlandıktan sonra transferidir (Dikmen ve Kılıçoğlu, 2012).

ACI sonuçlarını uzun dönemli inceleyen bir çalışmada ortalama 7,4 yıl, 61 hastanın 51 takip edilmiş sonuçlar iyi ve çok iyi olarak bildirilmiştir. Fu ve meslektaşları tarafından gerçekleştirilen düzey III retrospektif kohort çalışmasında, lezyon çapı dikkate alınmaksızın, otolog kıkırdak implantasyonu (ACI) ile artroskopik debridmanın karşılaştırılması yapılmıştır. Bu çalışmada, üç yılın sonunda fonksiyonel sonuç skorlarının ACI'da %81 oranında, artroskopik debridmanda ise %60 oranında daha iyi olduğu belirtilmiştir (Safran ve Seiber, 2010). Matris yardımcı otolog kondrosit implantasyonu (MACI) denilen bu yöntemde genellikle destek matriksi olarak kolajen tip I ve tip III içeren membranlar kullanılır (Şekil 15).

Klinik olarak en sık kullanılan kolajen membranlardan biri tip 1-3 kolajen matrikslerdir (Chondro-Gide®, Geistlich Biomaterials, Switzerland). Bu matriksler AMIC yöntem ile kolajen membranın kan pıhtısı ve mezenkimal hücreler içermesi için mikrokırık zemininde uygulanmıştır (Benthien vd., 2011). Doğal iyileşme tepkisinin

Mozaikplasti, hasarlı bölgeye nakledilmek üzere yük taşımayan sağlam bölgeden alınan kıkırdak ve kemik yamanın kullanıldığı bir tekniktir. Bu yöntem, tek seansta ya açık cerrahi ya da artroskopik olarak uygulanabilir (Şekil 16). Genel olarak, teknik 4-10 mm çapında silindirik şeklindeki kıkırdak ve kemik dokularının alınmasını içerir. Bu dokular, daha sonra aynı eklemden veya farklı bir eklemden (örneğin, ayak bileği, omuz, kalça gibi) hasarlı bölgedeki kemiğe açılan silindirik şeklindeki tünellere yerleştirilir. Bu yöntem sıklıkla diz ekleminde uygulanmakla birlikte, dirsek, ayak bileği ve kalça gibi diğer eklemlerde de uygulamaları rapor edilmiştir. Geniş kıkırdak yaralanmalarında, tek bir eklemden yeterli doku alınamayacağı durumlar için diğer dizden de doku alınabilir.



Şekil 16. Mozaikplasti şematik gösterimi

Bu çalışmada doku mühendisliği teknolojisi ile üretilen yeni doku iskelesi PCL/GEL/HA materyalinin rat kıkırdağında oluşturulacak tam kalınlıkta kıkırdak hasar alanına uygulayarak, etkilerini görmeyi ve halen klinik kullanımda olan diğer destek matriksi materyallerden üstünlüğü ele alınmıştır.

Uygulanan Güncel Tedavi Yöntemlerin Dezavantajları :

- Cerrahi olmayan tedaviler ağrıyı azaltarak, güç ve hareketliliği artırarak yaşam kalitesini artırabilir, ancak hasarlı eklem kıkırdağını onaramaz.
- PRP, PRF, MKH ve HA enjeksiyon tedavilerinde periyodik enjeksiyonlar gerekebilmektedir bu da diğer OA tedavilerine kıyasla daha maliyetli olduklarının kanıtıdır (Seçkin vd., 2024).
- Yöntemlerden en iyi tedavi şekli MACI gibi görünsede bu yöntemin uygulanması için de matrise eklenecek kondrositlerin hazırlanması için uzman yardımı gerekmektedir.

Ancak tezde uygulanan yöntem ile periyodik tedavi gerektirmeyen, kalıcı onarım sağlayan ve uygulama öncesi hazırlık aşamasında uzman gerektirmeyen tedavi planlanmıştır.

3.8. Doku Mühendisliği

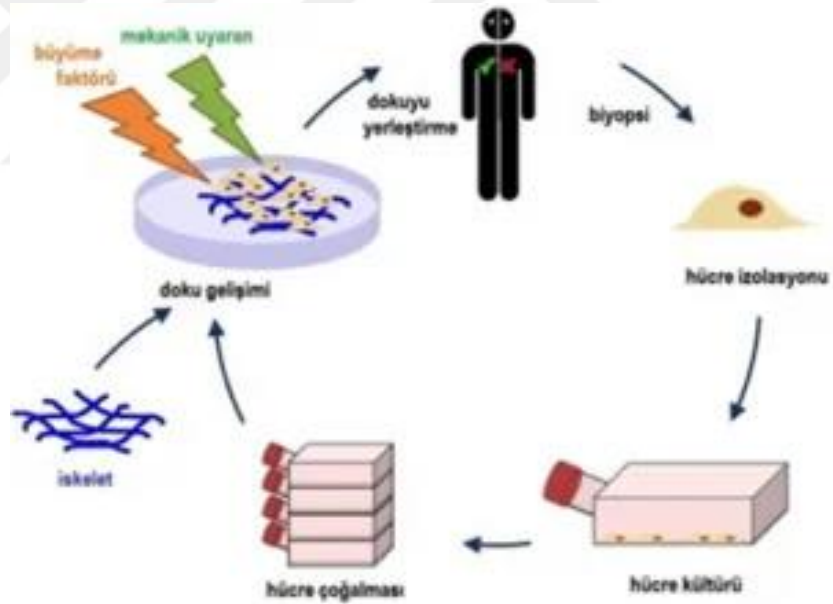
Doku mühendisliği, canlı hücreler, biyouyumlu malzemeler ve biyokimyasal faktörler kullanarak doku benzeri yapıları oluşturan multidisipliner bir alandır (Khademhosseini vd., 2009). Araştırmacıların nihai amacı, yaralanmış dokuların tedavisine veya hasar

görmüş organların işlevlerinin yerine getirilmesine olanak tanıyan doku iskelelerinin vücuda implante edilmesidir. Bu süreç, "Her doku yeniden şekillendirilebilir" felsefesini benimseyerek, uygun bir çevre sağlandığında izole edilmiş her hücrenin uygun yapay dokuyu oluşturma potansiyeline odaklanmaktadır. Bu yaklaşım, hücresel düzeyde yeniden yapılandırma ve organ fonksiyonlarının restorasyonu konusunda önemli bir noktaya işaret etmektedir (Harris vd., 1998). Rejeneratif tıp terimi, doku mühendisliği ile sıklıkla eşanlamlı kullanılsa da, aslında tedavi sırasında kök hücreleri hücre kaynağı olarak kullanır. İlk sentetik deri ve doku bileşenleri 1962’de kullanılmış, ancak başarılı doku mühendisliği ürünleri 1970’lerin sonları ve 1980’lerin başlarında ortaya çıkmıştır. 1990’lı yıllarda, deri ve kıkırdak gibi bazı doku mühendisliği ürünleri başarılı bir şekilde ticarileştirilmiştir. Ancak, doku mühendisliği hala çözüme kavuşmamış önemli problemlerle karşı karşıyadır, örneğin, fonksiyonel damar ağlarının doku içine oluşturulması ve çeşitli hücre tiplerinin 3B dokuda yerleşimi ve yayılımının kontrolü gibi sorunlar. 2000’lerin başında yatırımcı ilgisindeki düşüşle birlikte sektörde zorluklar yaşanmıştır (Mansbridge, 2009).

Kök hücre çalışmalarındaki artışla doku mühendisliği sektörü bir canlanma yaşamış, ancak 2008’den bu yana finansman sınırlamalarıyla karşılaşmıştır. Mesane, kornea ve bronş gibi bazı alanlarda önemli gelişmeler kaydedilmiş olsa da, kan damarları, kalp ve karaciğer gibi dokular için hala klinik olarak kabul edilebilir çözümler bulmak zordur. Doku mühendisliği, son 30 yılda moleküler ve hücresel biyoloji ile mikro ve nanosistem mühendisliği tabanlı birçok teknolojiyi geliştirmiştir. Ancak, bu teknolojilerin bazıları moleküler teşhis endüstrisinde çığır açan bir pazarın oluşumunu sağlamış olsa da, terapötik ürünlerin geliştirilmesi daha zor bir süreçtir. Doku mühendislerinin nihai hedefi, sektörün gerçek bir etkiye sahip olabilmesi için enerjilerini klinik problemlerin çözümüne odaklamaları gerektiğidir. Doku mühendisliğindeki yaklaşımları dört grupta toplamak mümkündür: biyomateriyallerden hazırlanan matrikslerin (Doku İskelesi) uygulanması, ortamda matriks olmaksızın canlı hücrelerin kullanılması, sadece matrikslerin ve biyosinyal moleküllerinin kullanılması, ve yapay-hücre ortam arasındaki farklılıkları en aza indirmek için matriksler, biyosinyal moleküller ve canlı hücrelerin bir arada kullanılması. Bu yaklaşımların temelini ise hücreler, matriksler ve biyosinyal moleküller (büyüme faktörleri) oluşturur.

Doku mühendisliği çalışmaları, üç ana yöntemle tanımlanmıştır (Ülker, 2013):

1. Bir molekülün hasarlı doku veya organa enjekte edilmesi; bu yöntem, molekül aracılığıyla sağlam hücrelerin yaralı bölgeye yönlendirilmesi ve bu sayede özellikle küçük doku hasarları durumunda iyileşmenin sağlanması prensibine dayanır.
2. İzole edilmiş hücrelerin polimerik bir taşıyıcı kullanılarak doku onarımı için uygulanması; bu süreçte hücreler doğrudan hasar görmüş dokuya nakledilir.
3. Hastanın kendisinden ya da uygun bir vericiden alınan hücrelerin, uygun bir besi ortamında çoğaltılması; bu metodoloji, Şekil 17’de açıklandığı üzere, çoğaltılan hücrelerin biyosinyal molekülleri varlığında bir doku iskelesi üzerine ekilmesi ve bu iskelelerin hasarlı doku bölgesine yerleştirilerek, biyobozunur yapısının vücut tarafından emilmesi sürecine kadar görev yapmasıyla gerçekleştirilir. Bu süreç, doku iskelesinin vücutla uyum sağlayıp, dokunun kendi işlevini yerine getirmeye başlamasıyla tamamlanır (Dvir vd., 2020).



Şekil 17. Doku mühendisliği uygulamasının şematik gösterimi

3.8.1. Kıkırdak doku mühendisliği

Kıkırdak doku mühendisliği, kıkırdak hasarlarını onarmayı amaçlayan bir alt bilim dalıdır. Bu alandaki gelişmelere rağmen, klinik seçenekler hala yetersizdir ve biyolojik çözümler araştırılmaktadır. Kıkırdağın tamamen başarılı bir şekilde tamiri büyük bir klinik zorluktur (Yu vd., 2014). Son 20 yılda biyomalzeme teknolojileri ve çeşitli

hücre kaynakları büyük ilerleme kaydetmiştir. Kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları, moleküler ve genetik manipülasyonlarla yapay kıkırdak üretimi konusunda umut vaat etmektedir. Bu çalışmalar genellikle otolog kondrositlerle yapılsa da, bu hücre kaynağının dezavantajları nedeniyle alternatif kaynaklara yönelinmiştir (Gobbi vd., 2006). Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler, doku mühendisliğinde kullanılan alternatif kaynaklardan biri olarak geniş bir uygulama alanına sahiptir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, embriyonik kök hücrelerin ve induklenmiş pluripotent kök hücrelerin kıkırdak hasarlarını tedavi etme potansiyelleri açısından önemli bulgular sunmuştur. Biyomalzemeler açısından ise, biyolojik olmayan hidrojel malzemeler ile doğal ve sentetik yapılardan oluşan biyolojik olarak parçalanabilir yapılar kullanılmaktadır. Bu malzemeler, hücrelerin doku içerisinde entegrasyonunu destekleyerek hasarlı bölgelerin onarılmasına yardımcı olur ve çeşitli uygulamalarda etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Matriksler, sentetik, doğal veya kompozit polimerlerden yapılabileceği gibi farklı yapılandırmalara sahip olabilirler. Kondrojenizi teşvik etmek için kök hücrelerle birlikte büyüme faktörleri kullanılabilir (Jeon vd., 2014). Günümüzde kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları, geniş bir hücresel, biyomalzemesel ve moleküler terapötik faktör yelpazesi içermektedir. Bu çalışmalar, biyoreaktörler kullanarak kıkırdağın mekanik uyarılması için ex vivo koşullarda yapılan yapay kıkırdak gelişimini artırmaktadır. Kıkırdak doku mühendisliği, temelde hücre kaynakları, biyomalzeme kaynakları ve kıkırdak dokusunun anabolik ve katabolik reaksiyonları olmak üzere temel parametreler üzerine kurulmuştur.

3.8.2. Kıkırdak doku mühendisliği iskeleleri

İnsan vücudu, oldukça kompleks bir yapıya sahiptir ve bu yapıda hücreler ve ekstraselüler matriks (ECM), dokuları; dokular organları; organlar ise sistemleri ve bu sistemler bütün olarak canlı vücudunu oluşturur. ECM, bu yapısal bütünlük içerisinde merkezi bir role sahiptir. Özellikle kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan hücreler, herhangi bir yapısal destek olmaksızın sıvı ortamda uzun süre hayatta kalamazlar. Bu nedenle, hücre ekiminin yapılacağı destekleyici bir iskeleye ihtiyaç duyulmaktadır. Vücut içerisinde, bu doğal destekleyici görevi ECM üstlenmektedir (Doğruok, 2019). ECM, hücre çoğalması, hücre büyümesi, hücre rejenerasyonu, metabolik faaliyetler

sonucunda ortaya çıkan atıkların atılması gibi işlevleri sağlar ve hücrelerin üzerinde gelişerek doku ve organ gibi yapıları oluşturacak bir sistem sunar (Kiremitler, 2016).

Artiküler kıkırdığın kan damarları, lenfatikler ve sinirlerden yoksun olması, yaralanmadan sonra dokuyu yeniden oluşturma yeteneğini sınırlıdır. Kıkırdaklardaki hasarlar genellikle değiştirilmesi gereken durumları gerektirir. Bu sorunu çözmek için araştırmacılar sentetik, doğal ve kompozit polimerlerden sentezlenen nanofiberler üzerine çalışarak, ECM ile benzerlikleri nedeniyle iyi sonuçlar elde ettiler. Nanofiberler, hücre-ECM etkileşimini teşvik eder ve kondrojenik diferansiyasyonu destekleyen nanofiberlerin toplam hacmine göre çok yüksek yüzey alanı, doku mühendisliği yaklaşımları kullanılarak artiküler kıkırdak mühendisliğinin potansiyelini ortaya koymaktadır (Nemati vd., 2019).

3.8.3. Kıkırdak doku mühendisliği iskeleleri için kullanılan yaklaşımlar

Doku mühendisliği uygulamalarında gözenekli iskele üretimi için çeşitli yöntemler kullanılmakta olup bu yöntemler Çizelge 4’de verilmiştir (Toptaş, 2014).

Çizelge 4. Nanofiber doku iskelesi tasarımında kullanılan teknikler

Kullanılan Yöntem	Gözenekliliği / Boyutu	Avantajları/Dezavantajları
Partikül Ayırıştırma	Gözenek; %90’dan küçük Gözenek boyutu; 5-100um	Avantajı: Bu yöntem basit ve kullanıcı dostu olmasıyla öne çıkar. Özel ekipman gerektirmeyen bu metod, kolayca hazırlanabilir ve uygulanabilir, böylece daha geniş bir kullanım alanına sahip olur. Dezavantajı: Yoğunluk farkı nedeniyle eşit olmayan gözenek dağılımı oluşur ki bu, tam ve geniş gözenek bağlantıları elde etmeyi zorlaştırır. Ayrıca, matrislerin dış yüzeyinde kabuklanma meydana gelir ve tipik organik çözücülerin kullanımını gerektirir. Bu durum, kullanımı sırasında bazı kısıtlamaları da beraberinde getirir.

Çizelge 4. (devam)

Termal Başlatılan Faz Ayırma	Gözenek; %70'den küçük Gözenek boyutu; 5-100um	Avantajı: Özel herhangi bir ekipman gerektirmeden basit bir şekilde hazırlanabilir. Spinodal ayrışma sağlanması durumunda, büyük gözenek bağlantıları imal edilebilir, bu da matrikslerin daha etkili bir şekilde kullanılmasını sağlar. Dezavantajı: Matrislerin dış yüzeyinde kabuklanma oluşmasıdır. Bu durum, yapısal bütünlüğü ve işlevselliği olumsuz etkileyebilir. Ayrıca, bu yöntem tipik organik çözücülerin kullanımını gerektirir, bu da çevresel ve sağlıkla ilgili endişelere yol açabilir.
Buz kristalleri üzerinde Elektroeğirme	Gözenek; %90'dan küçük Gözenek boyutu; 1-10um Gözenek; %95'den küçük Gözenek boyutu; 20-200um	Avantajı: Polimerlerden yüksek miktarda fiber yapılar üretmek için oldukça ekonomik bir seçenektir. Hücre ve kök hücreler için mükemmel doku uyumu sağlayarak biyolojik entegrasyonu kolaylaştırır. Ayrıca, toparlayıcı olarak kullanılan buz kristalleri, büyük gözeneklere sahip matriks üretimini mümkün kılar, bu da doku mühendisliği uygulamaları için ideal bir yapı sunar. Dezavantajı: Bu yöntemin kullanımı tipik organik çözücüler gerektirir ki bu da çevresel etkiler açısından dezavantaj oluşturabilir. Ayrıca, üretilen matrikslerin mekanik özellikleri genellikle yetersizdir, bu da bazı uygulamalar için sınırlayıcı bir faktör olabilir. Bu durum, matrikslerin daha dayanıklı uygulamalar için uygun olmayabileceğini gösterir.

Çizelge 4. (devam)

Kendiliğinden birleşen Nanofiberler	Gözenek; %95'den büyük Gözenek boyutu; 200-800nm	Avantajı: Tipik olarak su içerisinde hücrelerin biyoaktif işlevselliği ile birlikte kullanılarak matrisler oluşturulmasına olanak tanır. Bu özellik, hücrelerin doğal ortamını taklit eder ve bu sayede hücrelerin sağlıklı bir şekilde büyümesi ve gelişmesi desteklenir. Dezavantajı: Yöntemin üretimi maliyetlidir, bu da geniş ölçekli uygulamalar için ekonomik bir engel oluşturabilir. Ayrıca, üretilen matrislerin zayıf mekanik özellikleri nedeniyle, özellikle yük taşıyan veya mekanik dayanıklılık gerektiren yumuşak dokularda kullanımı sınırlıdır. Bu kısıtlamalar, yöntemin kullanım alanını belirli uygulamalarla sınırlandırabilir.
3 boyutlu Basım	Gözenek; 45-1600um Gözenek boyutu; 45-1600um	Avantajı: Özellikle karmaşık ve anatomik şekillerde yapıların imalatını sağlamak için son derece etkilidir. Bu, özellikle özelleştirilmiş tıbbi implantlar ve doku mühendisliği uygulamalarında büyük bir avantaj sunar, çünkü bu yapılar vücuda mükemmel bir şekilde uyum sağlayabilir. Dezavantajı: Yöntemin kullanımı ile ilgili olarak makinelerin yüksek maliyeti önemli bir dezavantajdır. Bu durum, teknolojiye erişimi kısıtlayabilir ve genel kullanımını sınırlandırabilir. Ayrıca, düşük gözenek boyutlarında çözünürlük sıkıntısı yaşanabilir, bu da daha ince ve detaylı yapıların üretiminde zorluklara yol açar. Bu, bazı tıbbi uygulamalarda gereken hassasiyeti sağlamada kısıtlamalar oluşturabilir.

Çizelge 4. (devam)

Stereolitografi	Gözenek; %90'den küçük Gözenek boyutu; 175+um	Avantajı: Bu yöntem, gözenek boyutu üzerinde hassas kontroller sağlar. Bu özellik, karmaşık ve anatomik şekilli yapıların doğru ve etkin bir şekilde imal edilmesini mümkün kılar, böylece doku mühendisliği ve tıbbi implantlar için ideal bir çözüm sunar. Dezavantajı: Makinelerin yüksek maliyeti nedeniyle sınırlıdır, bu da teknolojiye erişimi kısıtlar ve genel kullanımını azaltabilir. Ayrıca, bu yöntem UV ışığı kullanımına dayandığı için, kullanılan polimerlerin UV ile uyumlu olması gerekmektedir. Bu uyum sağlanamadığında, malzeme performansı ve dayanıklılığı olumsuz yönde etkilenebilir.
Seçici bir lazer ile sinterleme (SLS)	Gözenek; %70'den küçük Gözenek boyutu; 30-2500um	Avantajı; Gözenek boyutu ve bağlantıları üzerinde hassas kontroller sağlar. Dezavantajı; Çalışılacak biyomalzemenin toz halinde olmalıdır.
Kaynaşmış tortulanma ile Modelleme/3 boyutlu Grafikleme	Gözenek; %90'dan küçük Gözenek boyutu; 100-200um	Avantajı; ; Gözenek boyutu ve bağlantıları üzerinde hassas kontroller sağlar. Dezavantajı; Yöntem eriyik polimerlerin kullanılmasına dayandığı için sadece termoplastik malzemelerle sınırlıdır. Bu, kullanılabilecek malzeme çeşitliliğini azaltır ve sadece yüksek sıcaklıklarda eriyebilen polimerlerin kullanılmasını gerektirir. Ayrıca, bu teknik ile düşük gözenekli ürünler elde etmek zordur, çünkü eriyik polimerlerin doğası gereği, daha yoğun ve az gözenekli yapılar oluşturma eğilimindedir. Bu durum, yüksek gözeneklilik gerektiren uygulamalar için bu yöntemin uygun olmadığını gösterir.

Çizelge 4. (devam)

Doğrudan yazım	Gözenek; %90'dan küçük Gözenek boyutu; 5-100um	Avantajı; Gözenek boyutu ve bağlantıları üzerinde hassas kontroller sağlar. Dezavantajı; Teknikte, kullanılacak biyomalzemelerin özel bir işleminden geçirilerek polielektrik yüklü mürekkep haline getirilmesi gerekmektedir. Bu süreç, hem malzeme hazırlama aşamasında ekstra maliyet ve zaman gerektirir hem de teknik bilgi ve dikkatli bir uygulama zorunluluğu taşır. Polielektrik yüklemenin başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi, ürün kalitesi ve işlevselliği üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir, bu da sürecin hassasiyetini artırır ve uygulama kapsamını sınırlayabilir.
-----------------------	---	--

3.9. Doku İskele Tasarımı İçin Kullanılan Malzemeler

Nanofiber doku iskeleleri, özel büyüme faktörleri ve hücreler kullanarak üç boyutlu hücre kültürleri hazırlanmasını sağlayarak, hedeflenen bölgede yapay doku oluşturulmasına imkan tanır (Danišovič vd., 2011). Bu biyomateriyaller, kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında üç boyutlu yapısal çerçeveler olarak kullanılmakta ve dokunun yeniden yapılandırılmasını etkinleştirmektedir (Khan vd., 2010). İskele yapısının biyoyumlu ve mekanik olarak dayanıklı olması gerekmektedir. Ayrıca, başarılı bir hücre infiltrasyonu için, uygun bir hücre kaynağı ile birlikte biyolojik aktif moleküllerin kullanılması, hücrelerin farklılaşmasını ve olgunlaşmasını teşvik eder. İdeal olarak, bu iskeleler biyobozunur olmalıdır; böylece implant sonrası doku ile bütünleşebilir ve zamanla vücut tarafından emilebilir (Iwasa vd., 2009).

3.9.1. Polimerler

Polimerler, "monomer" olarak adlandırılan çok sayıda molekülün kimyasal bağlar kurarak bir araya gelmesi ve uzun zincirler oluşturması sonucu meydana gelir. Bu

zincirlerdeki monomerlerin birleşimi, polimerin yüksek molekül ağırlığına sahip olmasını sağlar. Bu yapısal özellik, polimerlerin mekanik dayanıklılık, esneklik ve diğer fiziksel özellikleri kazanmasına olanak tanır, bu da onları çok çeşitli endüstriyel ve tıbbi uygulamalarda vazgeçilmez kılar (Şentürk vd., 2012).

Günümüzde, polimerlerin çok yönlü kullanımı, onların birçok üstün özelliğinden kaynaklanmaktadır. Bu özellikler arasında, yüksek mekanik dayanıklılık, kimyasal etkilere karşı direnç, hafiflik, mükemmel şekillendirilebilirlik, düşük maliyetle üretim yapılabilme kapasitesi ve iyi yalıtkan olmaları sayılabilir. Ayrıca, polimerlerin lif, film, jel ve nanopartikül gibi çeşitli formlarda üretilmesi, onları çok geniş bir kullanım alanına sahip kılar. Bu özellikler, polimerleri otomotivden elektronik, tıbbi cihazlardan inşaatla kadar geniş bir yelpazede endüstriyel ve teknolojik uygulamalarda vazgeçilmez hale getirir (Eriskin vd., 2008).

Polimerler, oluşum yapılarına göre iki sınıfa ayrılır. Bunlar: doğal polimerler (**Jelatin**, **Hyaluronik Asit**, Kollajen, Fibrin, Aljinat , Kitosan..vb) ve sentetik polimerlerdir (**PCL**, poliglikolik asit, polilaktik asit, PHBV (poli [3hidroksibutirik asit-ko-3-hidroksivalerik asit]),..vb (Ergin vd., 2018).

3.9.1.1. Doğal polimerler

Doğal polimerler, biyolojik kökenleri ve biyoaktif özellikleri nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar genelde üç ana kategoriye ayrılır: polisakkaritler, proteinler ve nükleik asitler. Örnek olarak jelatin, selüloz, hyalüronik asit ve kolajen verilebilir. Bu polimerler, vücut ile reaksiyona girerek doku oluşumunu teşvik eden biyoaktif malzemeler olarak işlev görür (Edgar vd., 2016). Doğal yollarla üretildikleri için toksik olmayan ve biyouyumlu özelliklere sahip bu polimerler, hem deneysel hem de teorik uygulamalarda tercih edilmektedir (Ji vd., 2014).

Ancak, doğal polimerlerin zayıf mekanik özellikleri, yüksek biyobozunurlukları, sınırlı elde edilebilirlikleri, olası immünojenetik ve patojenik kirlilik riskleri gibi dezavantajları, kullanımlarını kısıtlamaktadır. Bu nedenle tezde doğal polimerler, bu dezavantajları dengelenmek amacıyla tek başlarına kullanılmayıp kompozit yapılar oluşturularak kullanılmışlardır. Bu yaklaşım, doğal polimerlerin avantajlarını

korurken, mekanik dayanıklılık ve diğer özelliklerini geliştirmeyi amaçlamaktadır (Oyar, 2015).

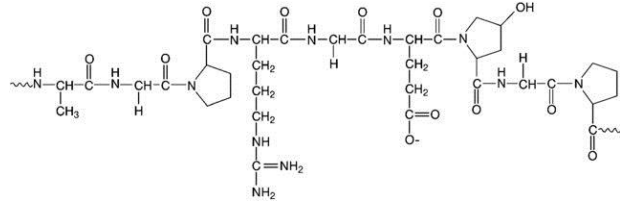
Jelatin (GEL) : Jelatin, kısmen hidrolize bir kolajen formu olup, amino asit zincirleri daha kısa olan bir protein türüdür (Şekil 18). Teknik olarak kolajenin bir türü olan jelatin, daha düşük maliyetli, daha yaygın bulunan, azaltılmış immunolojik risk sunan ve iyileştirilmiş hidrofiliklik ve hücre yapışma özelliklerine sahiptir (Mousavi vd., 2019). Bu iki protein arasındaki kimyasal farklılık, her birinin farklı davranmasına yol açar. Jelatin nanofiberleri, doku mühendisliği uygulamalarında etkili matriksler olarak kullanılabilecek iyi hücre yapışma aktivitesine sahiptir. Jelatinin sulu çözeltisinin termo-duyarlı özelliği, kritik çözelti sıcaklığının altına düştüğünde jel oluşturmaya neden olan önemli bir özelliktir (Arun vd., 2021).

Kolajenin üçlü sarmal yapısı, tek bir ipliğe indirgenğinde jelatini oluşturur. Jelatin, gözeneklilik ayarlanabilirliği, biyolojik olarak parçalanabilir ve osteoiletken bir proteindir. Ancak, düşük mekanik dayanma kapasitesine sahiptir. Elektroegirme tekniği ile gözenekli jelatin matrikslerinin işlevselliği artırılır (Raghav vd., 2022).

Sharifi ve meslektaşları, kıkırdak dokusu regenerasyonu için polikaprolakton ile birleştirilmiş jelatin/kondroitin sülfat nanofiber matriksleri ürettir. Bu çalışma, önemli bir hücresel yapışma ve insan kemik mezankimal kök hücrelerinin nanofiber matriks üzerinde anlamlı bir hücresel yapışma ve yaşama yeteneği gösterdiği gibi kondrojenik belirteçlerin ifadesinin de iyileştiğini gösterdi (Sharifi vd., 2020).

Semitela ve meslektaşları, kıkırdak dokusu onarımı için geliştirilmiş gözenek boyutu ve etkileşimli yapıya sahip biyoaktif polikaprolakton-jelatin nanofiber matriksleri (PCL + GEL) sentezlemiştir. İyileştirilmiş gözenek çapı ve etkileşimli yapıya sahip matriksler, artmış hücre infiltrasyonunu ve homojen hücre dağılımını sağlayarak potansiyel bir fonksiyonel doku oluşturma yeteneği yaratmıştır (Semitela vd., 2020).

Genel olarak, doğal iskeleler, polimer ağının büyük miktarda su tuttuğu bir jel olarak kullanılır. Bu ortam, hücrelerin çoğalmasını, diferansiyasyonunu ve adezyonunu destekler. Ancak, bu polimerlerin zayıf mekanik özelliklere, basınç ve gerilme direncine sahip olmaları gibi dezavantajları vardır (Sánchez-Téllez vd., 2017). Bu dezavantajların giderilmesi için tezde sentetik polimerlerle birleştirilerek kompozit bir yapı elde edilmiştir.



Şekil 18. Jelatin ve kimyasal yapısı

Hyaluronik asit: Hyaluronik asit (HA), su tutma kapasitesi yüksek, biyobozunur ve biyoyoumlu bir moleküldür. Onu doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında özel kılan özellikler, benzersiz viskoelastik özellikleridir (Movahedi vd., 2020).

Bazen hyaluronan olarak da adlandırılan HA, çeşitli vücut bölgelerinde, özellikle bağ dokuları ve eklemlerde bulunan negatif yüklü, sülfatsız glukozaminoglikan (GAG) moleküllerinden biridir. Benzersiz kimyasal yapısı ve tutarlılığı, Hyaluronik Asit molekülünü çevredeki hücreler ve ECM için önemli bir destekleyici bileşen haline getirir (Calabro vd., 2002).

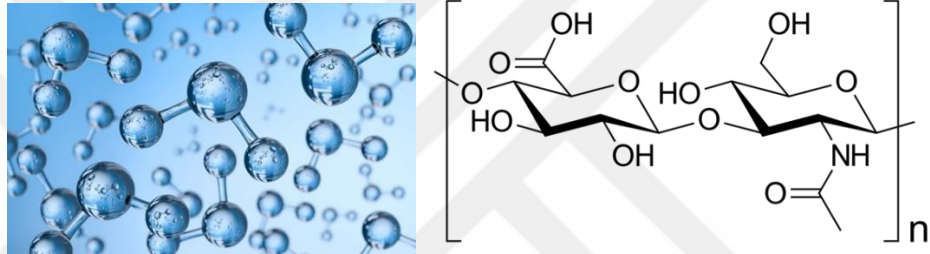
Ayrıca, HA'nın sahip olduğu kimyasal ve fiziksel özelliklere ek olarak, hücresel ve doku destekleme açısından da önemli bir rol oynar. HA'in, su moleküllerine ve sodyum gibi bazı iyonlarla bağ yapma yeteneğini sağlayan kimyasal yapısı sayesinde, büyük miktarda hücre dışı sıvı HA-(Na⁺) kompleksi ile çekilebilir, güçlü bir hidrat yapı oluşturur ve bu yapı sıkışma kuvvetlerine karşı direnç gösterir (Şekil 19). Ayrıca, bu moleküler kompleksleri birbirine yakın düzenleyerek, negatif yükleri sayesinde birbirlerini ittirirler ve bu da genel yapıya kaygan bir özellik kazandırır (Gartner ve Hiatt, 2006).

HA aynı zamanda herhangi bir iltihap sürecinde negatif bir geri bildirim faktörü olarak da düşünülebilir. Bu görevi, kendi radikal temizleme ve antioksidan özellikleri aracılığıyla gerçekleştirilebilir (Fakhari vd., 2013). Bunun yanı sıra, HA'in doku remodelleme ve onarımını etkileme yeteneği vardır, bu da herhangi bir hasardan sonra hücre proliferasyonunu aktive ederek fibroblast mitotik doyumluğunu artırarak (Barnhart vd., 1979), hücre göçü üzerindeki CD44 etkileri nedeniyle yeni oluşturulan ECM'e göç etmeye teşvik edilir (Tammi vd., 1989).

Osteoartrit hastalığı, 50 yaş üzeri insanların %70'inde gelişebilen ve diartrodial eklemlerde bulunan kıkırdak yüzeyinin dejenerasyonu ve güçsüzleşmesi ile karakterize olan bir hastalıktır. Forsey ve meslektaşları tarafından yapılan bir çalışma, osteoartrit hastalığına sahip etkilenen eklemlere uygulanan HA'in, kırılmış veya hasar

görmüş kıkırdak yüzeyinin kondrosit ile doğrudan etkileşim yoluyla iyileşmesini artırabileceğini gösterdi. Bu tür bir HA uygulaması, osteoartrit komplikasyonlarından muzdarip birçok hastaya büyük ölçüde yardımcı olabilir (Forsey vd., 2006).

Chen ve meslektaşları, nanofiber membranından türetilmiş kısa liflerden oluşan dondurularak kurutulmuş bir yapıdan termal olarak çapraz bağlı bir doku iskelesi geliştirdi. Elde edilen iskele, artiküler kıkırdakta kayganlık ve şok emme özelliklerini sağlayan hyaluronik asit ile fonksiyonelleştirilmiş ve kıkırdak rejenerasyonunu uyarmak için in vitro ve in vivo olarak değerlendirildi. Elde edilen iskelenin yüksek su emme kapasitesine, iyi mekanik ve basınç dayanımına sahip olduğu ve İn vitro deneylerde kondrositlerin iskele yüzeyine yapışarak nanofiberler boyunca çoğaldığı bulunmuştur (W. Chen vd., 2016).



Şekil 19. Hyaluronik asit ve kıyasal yapısı

3.9.1.2. Sentetik polimerler

Sentetik polimerler, tekrar eden monomerlerin bir araya gelerek oluşturduğu yapılar olup, kullanılacak uygulamalara göre çeşitli biçimlerde üretilebilir ve çözeltilerinde homojen bir yapıya sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı geniş bir kullanım alanına sahiptirler.

İnert yapıları, yüksek biyouyumlulukları, kolay işlenebilirlikleri ve ekstrasellüler matriks (ECM) ile benzer yapısal ve kimyasal özelliklere sahip lifler oluşturabilme kapasiteleri nedeniyle biyomedikal alanda özellikle tercih edilirler (Ji vd., 2014).

Yaygın kullanılan sentetik biyopolimerler arasında poli(laktik asit) (PLA), poliüretan (PU), poli(glikolik asit) (PGA), poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), poli(hidroksi bütirat) (PHB) ve poli 3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiperat (PHBV) bulunmaktadır. Özellikle poli(laktik asit), poli(glikolik asit), poli(laktik-ko-glikolik asit) ve poli(kaprolakton),

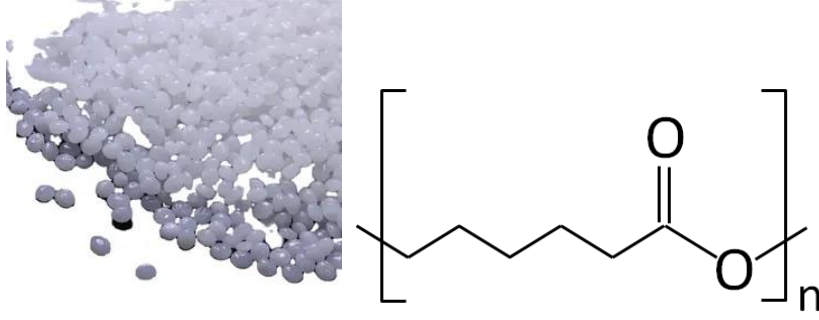
ECM'nin polisakkarit zincirlerini mükemmel bir şekilde taklit edebilmektedir (Darshan vd., 2022).

Bu polimerlerin kıkırdak doku iskele tasarımında yaygın kullanımı, bu özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu tez çalışmasında ise, özellikle PCL polimeri bu amaç için tercih edilmiştir.

Poli (ε-Kaprolakton) (PCL)

PCL (polikaprolakton), FDA tarafından onaylanmış bir polimer olup, hidrofobik özellikler gösterir ve yarı kristalin bir yapıdadır. Bu polimerin cam geçiş sıcaklığı (T_g) yaklaşık -60°C'dir, bu düşük değer malzemenin oda sıcaklığında esnek kalmasını sağlar (Şekil 20). Polikaprolakton (PCL), biyobozunur ancak yavaş bir bozunma hızına sahip olan alifatik bir polyesterdir, bu da onu kıkırdak doku mühendisliği gibi yük taşıma uygulamalarında uygun bir polimer yapar. Ancak, hidrofobik yapısı nedeniyle biyoaktivitesini artırmak için diğer malzemelerle kopolimerize edilmesi gerekmektedir. PCL (polikaprolakton), biyomedikal alanda geniş kapsamlı araştırmalar için ideal bir materyaldir. Bu polimerin düşük erime noktası (59-64°C), iyi çözünürlüğü ve olağanüstü karışım potansiyeli, çeşitli uygulamalar için uygun olmasını sağlar (Tinge vd., 2018).

Örneğin domuzda, PCL/BMKH'lerinin AC'nin tam kalınlığındaki kıkırdak hasarına yerleştirilmesi, hücre ekimden 6 ay sonra tam bir onarıma ve hiyalin kıkırdak benzeri doku oluşumuna yol açmıştır (Li vd., 2019). Dahl ve ark. PLGA/PCL elektrospun nanofiberlerin insan Umbilikal Kord MKH'lerinin kondrojenik diferansiyasyonu üzerindeki etkilerini rapor etmiş ve yüksek düzeyde proteoglikan ve sGAG seviyelerine neden olmuştur (Dahl vd., 2011). Kondrojenik ortamda kültüre edilen hücrelere kıyasla, nanofiber iskelelerinde kültüre edilen hücrelerde kolajen tip II ve sGAG içeriğinde önemli bir artış görülmüştür. Başka bir çalışmada, elektrospun PCL nanofiber üzerinde kültüre edilen MKH'ler fibroblast benzeri morfolojiyi uyarmış, ancak dinamik koşullar yuvarlak bir morfoloji ve yüksek kolajen tip I, II ve sGAG ile birlikte bir morfolojiye yol açtığı görülmüştür (Alves Da Silva vd., 2010).



Şekil 20. PCL ve kimyasal yapısı

PCL (polikaprolakton), biyolojik olarak parçalanabilen diğer polyesterlere göre daha yavaş bir bozunma sürecine sahiptir, bu özelliği ile uzun süreli implant edilebilir malzemeler olarak kullanımı için özellikle uygundur (Arakawa vd., 2017). Bu yavaş bozunurluk, implantların vücut içinde uzun süre fonksiyon görmesini ve kademeli olarak biyolojik olarak uyumlu bileşenlere ayrışmasını sağlar, bu da özellikle doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında önemlidir.

PCL'nin hidrofobik doğası ve zayıf yüzey ıslatma kapasitesi, hücre yapışması ve çoğalmasını zorlaştırabilir. Ancak, bu dezavantaj, PCL'yi diğer sentetik ve doğal polimerlerle karıştırarak giderilebilir. Bu tür karışımlar, PCL'nin yüzey özelliklerini iyileştirerek hücrelerin daha etkili bir şekilde yapışmasını ve çoğalmasını sağlayabilir. Bu yaklaşım, PCL'nin biyomedikal alandaki uygulama yelpazesini genişletir ve özellikle karmaşık doku iskeleleri ve ilaç salım sistemleri gibi teknolojilerde kullanımını artırır. Bu strateji, PCL'nin hidrofobik doğasını avantaja dönüştürerek, daha fonksiyonel ve verimli biyomedikal cihazlar ve implantlar geliştirme potansiyelini ortaya koymaktadır (Behere vd., 2021).

3.9.2. Mezenkimal kök hücre

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), başta kemik iliği olmak üzere çeşitli yetişkin dokulardan izole edilebilen multipotent progenitör hücrelerdir. Bu hücreler, geniş bir çoğalma kapasitesine sahip olup, uygun mikroçevre koşulları altında osteosit, kondrosit, adiposit veya miyosit gibi çeşitli hücre türlerine dönüşebilme yeteneğine sahiptirler (Pojda vd., 2013). Özellikle kemik iliği gibi zengin kaynaklardan alınan MKH'ler, laboratuvar ortamında hızlı bir şekilde çoğaltılabilir. Örneğin, 2 ml kemik

iliğinden izole edilen MKH'ler, üç hafta içinde yaklaşık 500 kat artış gösterebilir. Bu hücreler, 6-10 pasaj boyunca ve hatta daha uzun sürelerde pluripotent özelliklerini koruyabilirler, bu da onları doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları için özellikle değerli kılar (Magne vd., 2005). MKH'lerin bu adaptif ve esnek özellikleri, onları çeşitli tıbbi tedavilerde kullanılan önemli bir hücre kaynağı yapmaktadır.

Bu hücrelerin potansiyel avantajlarından bazıları şunlardır (Koga vd., 2009) :

- Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), doku kültürü uygulamalarında hızlı çoğalabilme yetenekleri sayesinde, tedavi amacıyla gereken hücre sayısını azaltarak kullanımı daha verimli hale getirir (Prockop, 1997).
- Bu hücreler, hem kemik hem de kıkırdak dokularına dönüşebilme yetenekleri sayesinde, osteokondral kayıpların tedavisinde kullanılan kompozit greftlerin alternatifi olarak değerlendirilebilir (Freed vd., 1999).

Ayrıca, MKH'lerin immunmodülatör, antiinflamatuvar ve multipotent özellikleri, kıkırdak iyileşmesinde özellikle önemli rol oynamaktadır. Bu özellikler, günümüzde araştırmacıların, özellikle rejeneratif hücre tedavileri, immünoterapi ve çeşitli insan hastalıklarının rejeneratif tedavisinde bu hücrelerin potansiyel kullanımına olan ilgisini artırmıştır. MKH'lerin bu geniş yelpazedeki uygulama potansiyeli, onları biyomedikal araştırmaların ilgi odağı yapmaktadır

DF-MKH

Özellikle diş pulpası, **diş folikülü**, periodontal ligament ve kemik iliği gibi insan diş dokuları, mezenkimal kök hücre (MKH) kaynağı olarak büyük bir potansiyel göstermektedir. Bu dokulardan elde edilen DF-MKH'ler, uygun şartlar altında nöral hücreler, osteositler ve kondrositler gibi çeşitli hücre tiplerine dönüşebilme kapasitesine sahiptir. Bu hücreler, terapötik ve rejeneratif tedavilerde kullanılma potansiyeli taşımaktadır (Rodas-Junco vd., 2017). Ancak, MKH'lerin elde edildiği dokuların donörlerinin yaşı, bu hücrelerin miktarını, kalitesini, farklılaşma potansiyelini ve proliferasyon kapasitesini etkileyebilmektedir. Yapılan araştırmalar, 80 yaşındaki bireylerden elde edilen MKH'lerin, yenidoğanlardan elde edilenlere kıyasla üç kat daha az olduğunu göstermektedir (Stolzing vd., 2008).

Bu dezavantajı tolere etmek için tez çalışması kapsamında tam gömülü 20 yaş diş folikülünden elde edilen mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır.

Yapılan bazı in vivo çalışmalarda bu hücrelerin hasarlı bölgede farklılaşabildikleri gözlenmiştir (Hunziker, 2002).

Løken ve meslektaşları, 11 tavşanın her iki dizinin medial femoral kondilinde 4 mm genişliğinde ve 1.5 mm derinliğinde osteokondral hasarlar oluşturmuşlardır. Her tavşanın bir dizine hyaluronan matriks (HYAFF-11, Fidia Advanced Biopolymers Laboratories, Abano Terme, İtalya) ile birlikte mezenkimal kök hücre (MKH) uygulamışlar, karşı dizine ise sadece matriks uygulamışlardır. 24 hafta süresince takip edilen hayvanların yaşamı sonlandırıldıktan sonra, histolojik değerlendirme yapılmış ve MKH grubunda kırıkdam tamirinin daha kaliteli olduğu bildirilmiştir (Løken vd., 2008).

Li ve meslektaşları 3B nanofiber iskelesinin, kondrosit benzeri hücrelerden daha yüksek bir kırıkdam ECM ürettiğini göstermiştir. Ayrıca, SC'lerin nanofiber yapılarına ekilen kondrojenik farklılaşmalarını biomoleküllerin etkilediği ortaya çıkmıştır (Li vd., 2005).

Nano ve mikrofiber elektrospun matriksler, kemik iliğinden türemiş kök hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını sürdürmekle kalmaz, aynı zamanda nanofiber PCL matriksleri daha büyük bir kırıkdam aktivitesine sahiptir. Bu, üretilen sGAG ve kollajen tip II ifadesi ile gösterilmiştir ve yüzeyel alanını onarmak için uygun olabilir. Diğer çalışmalar, nanofiber iskelelerle, mikrofiber iskelelere veya düz (film) Poli(L-laktid) (PLLA) veya poli(L-ko-D,L-laktid) (PLDLA) iskelelere kıyasla benzer sonuçları rapor etmiştir (Shanmugasundaram vd., 2011).

Domuzlarda, polikaprolakton (PCL) / kemik iliği mezankimal kök hücreleri (BMKS'ler) implantasyonu, eklem kırıkdamının tam kalınlığında oluşan hasarların tamamen onarılmasına ve 6 ay sonra hiyalin kırıkdam benzeri doku oluşumuna yol açmıştır (Li vd., 2019).

Farelerde, kondrositler kolajen/PLCL (Poli(L-laktid-ko-ε-kaprolakton)) matrikslere ekilerek, katman katman sandviç yapılar oluşturulması, nakledilen bölgelerin %83'ünün doğal kırıkdam elde edilmesine neden olmuştur (He vd., 2015).

3.9.3. TGFβ-1

Büyüme faktörleri, proliferasyon, migrasyon, matriks sentezi ve farklılaşma gibi çeşitli hücrel aktiviteleri etkiler. Fibroblast büyüme faktörü (FGF), insülin benzeri büyüme

faktörü (IGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β)'nın kondrosit metabolizmasını ve kondrojenезisi etkilediği gösterilmiştir. Büyüme faktörleri, proteoglikanları, agrekan, Tip II kolajeni sentezleyen kondrositlerin yanı sıra sinoviyositlerin ve mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonunu da destekler.

Kıkırdak rejenerasyonunda ve doku mühendisliği yaklaşımlarında kullanılan en önemli büyüme faktörleri, özellikle TGF β -1 ve TGF β -3 gibi transforming growth factor β (TGF- β) aile üyeleridir. Çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, TGF-beta kullanımının kondrosit fenotipinin korunmasına yardımcı olduğunu ve bir kollajen II-zengin ECM sentezini uyardığını göstermiştir.

TGF- β , hücre proliferasyonu, farklılaşma, embriyonik gelişim, kanser oluşumu, bağışıklık fonksiyonu, iltihaplanma ve yara iyileşmesi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol alan geniş bir büyüme faktörleri ailesinin ilk örneklerinden biridir. Bu büyüme faktörleri ailesinin 35'ten fazla üyesi bulunmaktadır (Kraan vd., 1992).

TGF- β , mezenkimal yoğunlaşma, kondrosit proliferasyonu, ekstraselüler matriks birikimi ve terminal farklılaşma gibi kondrojenезin tüm aşamalarında aktif bir rol oynar ve ayrıca mezenkimal öncül hücreler aracılığıyla kondrojenезin en önemli başlatıcısıdır (Song vd., 2007). Kondroblastların çoğalması ve kıkırdağa özgü hücre dışı matriks molekülleri olan agrekan ve tip II kollajenin birikimi de TGF- β tarafından uyarılır.

Eklem kıkırdağında mezenkimal kök hücrelerin varlığı gösterilmesine rağmen hücrelerin olası bir kıkırdak hasarında kıkırdağı yenileme kapasitelerinin yetersiz olduğu görülmüştür.

Transforme edici büyüme faktörü- β 3 (TGF β -3) ve deksametazon içeren ortamda kemik iliğinden köken alan mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* ortamda uygun şartlarda kondrositlere dönüşebildiğini gösteren çalışmalar vardır (Ciuffreda vd., 2016).

Diğer bir çalışmada büyüme faktörleri bulunan ortamda, nanofibröz matrikslerin kemik iliğinden köken alan mezenkimal kök hücrelerin kondrositlere dönüşme yeteneği olduğu görülmüştür. Mezenkimal kök hücrelerin TGF β -1 ile uyarılmasının kondrositlere dönüşümü indüklediği ve mRNA sentezini artırarak agrekan ve tip II kollajen sentezini artırdığı gösterilmiştir (Wise vd., 2009).

Wang ve meslektaşları başka bir çekirdek-kabuk nanofiber doku iskelesi oluşturmak için çekirdek içine bovine serum albumin ve rekombinant TGF β -3 ekledi. TGF β -3, kondrositler tarafından tip II kollajen ve glikozaminoglikan üretimi ile belirlenen biyolojik etkinliğe sahip olduğu gösterilen iki aylık bir süre boyunca salındı. Ayrıca, göbek kordonu içinde büyük ölçüde mukopolisakkaritlerden oluşan jelatinimsi bir madde olan Wharton jelinden elde edilen mezankimal kök hücrelerinin matriks üzerine ekimi sonucunda proliferasyon, morfolojik analizler ve diferansiyasyonu, matriksin biyouyumlu olduğunu ve kondrojenik diferansiyasyonu teşvik ettiğini gösterdi. Bu veriler, TGF β -3 salınan matriksin, mezankimal kök hücreleri ile birlikte kullanılarak doku mühendisliği trakea kıkırdakları inşasında kullanılabileceğini göstermektedir (Wang vd., 2017).

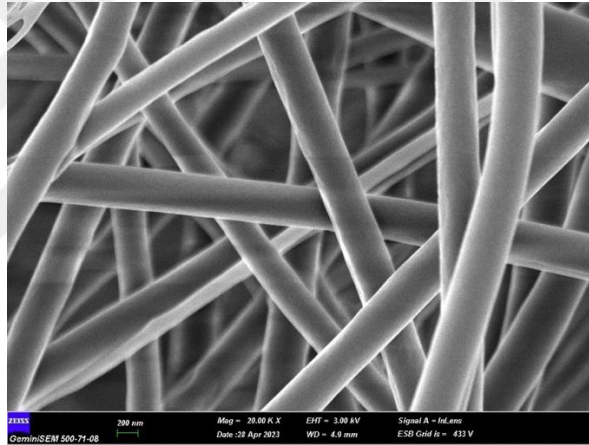
Martin ve meslektaşları kıkırdak onarımını artırmak için stromal hücre türetilmiş faktör-1 α (SDF-1 α) ve dönüştürücü büyüme faktörü- β 3 (TGF β -3) içeren elektroegirmeyle elde edilmiş hücresiz lifli hiyalüronik asit matriks geliştirdi (Martin vd., 2021).

Hsieh ve meslektaşları, metoksi polietilen glikol-poliepsilon kaprolakton (mPEG-PCL) ve HA'dan oluşan matriksler ürettir ve bunları Transforming Growth Factor- β 1 ile yüklenmiş hiyalüronik asit ile infiltrasyona tabi tuttular. Bu çalışmanın domuz dizlerinde gerçekleştirilen in vivo testleri, 1 yıl sonra matriksin artiküler kıkırdak regenerasyonu sağlandığını ve oluşan kıkırdağın morfolojisinin kontrol grubuna kıyasla belirgin bir şekilde hiyalin kıkırdağa daha yakın olduğunu gösterdi (Hsieh vd., 2018).

3.10. Nanofiberler Ve Uygulama Alanları

Nanometre boyutunda çaplara sahip nanofiberler, düz, boncuklu, içi boş veya boru şeklinde olmak üzere isteğe ve çalışılacak duruma göre üretilmektedir. Üretim sırasında kullanılan malzeme içeriğine bağlı olarak, bu nanofiberler çeşitli fiziksel ve kimyasal özellikler (örneğin, yüksek mukavemet, küçük boyutları sayesinde dar alanlarda kullanım, yumuşak tutum) kazanır. Bu özellikler, nanofiberlerin farklı uygulama alanlarında kullanılmasını mümkün kılar (Özek vd., 2015).

Nanofiberler, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olabilirler ve bu özellikler sayesinde farklı uygulama alanlarında kullanılabilirler. Morfolojik yapıları hafif, gözenekli ve geniş yüzey alanına sahiptir, bu da işlevselliklerini ve mekanik dayanımlarını artırır. Yüksek yüzey alanı/hacim oranları, nanofiberlerin fonksiyonel grupları, iyonları ve nano seviyedeki partikülleri tutma veya yayma kapasitelerini artırarak çeşitli avantajlar sağlar. Nanoteknoloji, nano boyutundaki yapıların tasarlanması ve kullanılmasına odaklanan bir bilim dalıdır ve malzemeleri nanoboyutlarda sınıflandırırken, en az bir boyutunun 100 nm altında olması esastır. Nanoteknoloji, maddelere yeni fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler kazandırabilir. Nanoteknolojinin bizlere sunduğu avantajlardan biri de kaliteli, uzun ömürlü, ucuz maliyetli, hafif ve istenilen boyutta üretim yapılabilir bir alan olmasıdır (Ates vd., 2015). Bu teknolojinin çeşitli alanlarda kullanımı, geniş bir yelpazede çalışma faaliyetlerini içerir ve tıp alanında da çeşitli uygulamaları bulunmaktadır.



Şekil 21. Elektroegirme yöntemiyle üretilen tipik bir nanofiber FESEM görüntüsü

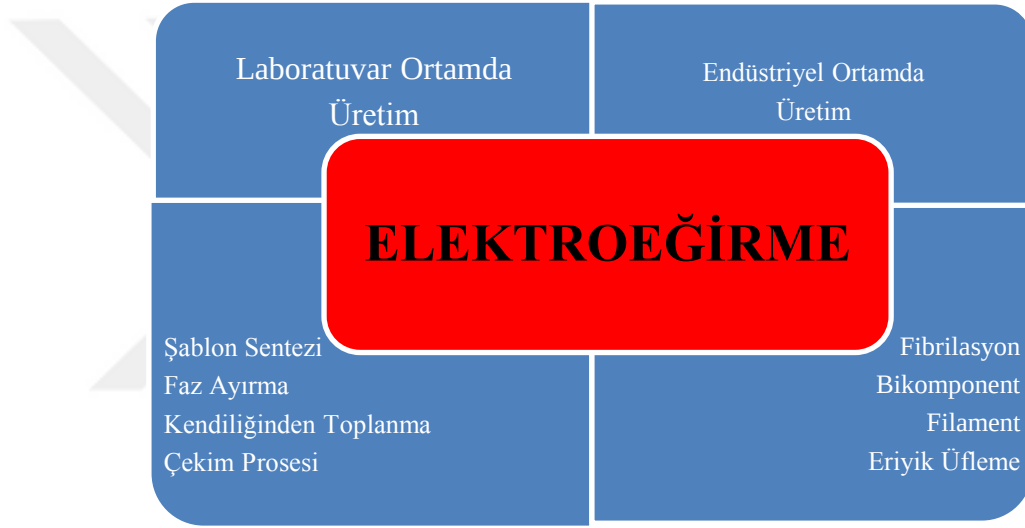
Şekil 21’de Fesem görüntüsüyle gösterilen nanofiberler, hafiflikleri, yüksek gözeneklilikleri ve geniş yüzey alanlarıyla dikkat çeken, işlevsel ve mekanik olarak dayanıklı yeni nesil malzemelerdir. Bu benzersiz özellikleri sayesinde nanofiberler, çeşitli alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Nanofiberlerin başlıca kullanım alanları arasında doku mühendisliği uygulamaları, filtreleme sistemleri, sensör üretimi, koruyucu maskeler ve giysiler, ilaç salınımı ve kompozit malzeme destekleyicileri bulunmaktadır (Li ve Xia, 2004).

3.11. Nanofiber Üretim Yöntemleri

Nanofiber üretimi çeşitli yöntemlerle sağlanmakta olup bu yöntemler iki ana başlıkta toplanmaktadır: laboratuvar ortamında üretim ve endüstriyel ortamda üretim. Bu yöntemlerin detaylı gösterimi Şekil 22’de sunulmuştur (Üstündağ ve Karaca, 2009).

Laboratuvar ölçekli üretimde endüstriyel uygulamalar bulunmamaktadır. Elektroeğirme yöntemi, hem laboratuvar hem de endüstriyel ortamda nanofiber üretimi gerçekleştirebilen en avantajlı yöntemlerden biridir (Karahan, 2017).

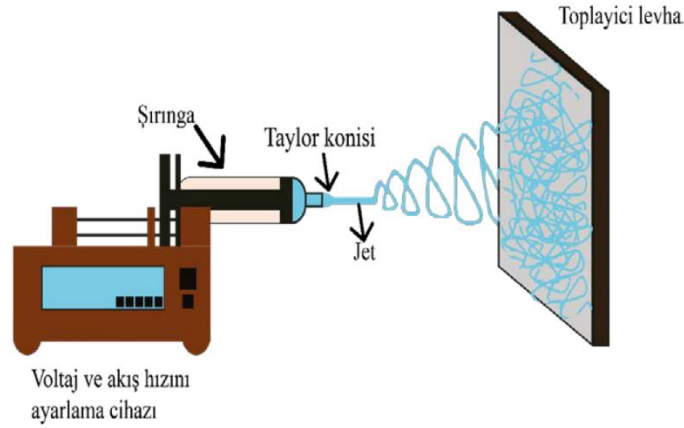
Bu tez çalışmasında da elektroeğirme yöntemi kullanılacağından, bu yöntem tezin yöntem kısmında detaylı olarak açıklanmaktadır.



Şekil 22. Nanofiber üretim yöntemleri

3.11.1. Elektroeğirme yöntemi

Elektro-eğirme 1934 yılında Formhals tarafından elektrostatik kuvvetler yardımıyla, çok küçük debilerde viskoz sıvılara kilovolt boyutunda gerilim verilerek polimerlerden lif üretimi işlemi olarak tanımlanan kolay kontrol edilebilir ve çok yönlü üretim sağlayan bir yöntemdir (Suepueren vd., 2007).



Şekil 23. Elektroeğirme yönteminin şematik gösterimi

Elektro-eğirme, 1934 yılında Formhals tarafından elektrostatik kuvvetler yardımıyla, düşük debilerdeki viskoz sıvılara kilovolt seviyesinde gerilim uygulanarak polimerlerden lif üretimi olarak tanımlanmıştır. Bu yöntem, kolay kontrol edilebilir ve çok yönlü üretim kapasitesi sunan bir tekniktir (Suepueren et al., 2007). Elektro-eğirme yönteminin ayrıntılı bir şeması Şekil 23'te sunulmaktadır. Bu teknikle, polimer, kompozit ve seramik içeren çeşitli çözeltiler kullanılarak oldukça ince fiberler elde edilmektedir.

Elektro-eğirme süreci, damlacık oluşumu, Taylor konisi oluşumu, elektroçekim jetinin oluşumu, kararlı bölgede jetin uzaması, kararsız bölge oluşumu ve lif formunda katılaşma aşamalarından oluşmaktadır (Şenocak, 2021). Elektro-eğirme yöntemi, ilaç dağıtımı, doku mühendisliği, biyomedikal uygulamalar, filtreler, koruyucu giysiler, akıllı tekstiller, kapasitörler, gaz sensörleri ve gaz katalizörleri gibi geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir.

Elektro-eğirme, ECM içindeki fibrilleri taklit etme yeteneği yüksek yapay kıkırdak matrislerin üretimini sağladığından doku mühendisliği alanında yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu tez çalışmasında da tercih edilmiştir.

Elektro-eğirme cihazı şu bileşenlerden oluşmaktadır:

- Yüksek voltajlı güç kaynağı (DC voltajlı bir tedarikçi sistem tarafından sağlanır)
- İğne veya pipetli bir kılcal boru (besleme sistemi)
- Elektriksel olarak iletken bir toplayıcı

Elektro-eğirme cihazının çalışma prensibi şu şekildedir: Elektro-eğirme için hazırlanan çözeltinin akış hızı bir şırınga pompası ile düzenlenir. Uç ve plaka üzerine uygulanan elektrik alanının gücü, hazırlanmış çözeltinin yüzey gerilimini aşacak derecede yüksek olduğunda, Taylor konisi adı verilen bir sıvı jeti oluşur ve plakaya doğru hareket eder. Bu sıvı jetinin hareketi sırasında çözücü buharlaşır ve belirli çaplara sahip katı nanofiberler, topraklanmış bir metal toplayıcı üzerinde rastgele yönlendirilmiş olarak birikir (Üstündağ ve Karaca, 2009).

Elektro-eğirme süreci, nanoteknolojinin önemli bir alanında, özellikle polimer nanofiberlerin üretiminde kullanılan kritik bir yöntemdir. Bu süreç, çeşitli parametrelerin karmaşık etkileşimini içerir ve başarılı sonuçlar elde etmek için dikkatli bir şekilde kontrol edilmelidir. Bu parametreler genellikle üç ana grupta incelenir: polimer çözeltisi özellikleri, işlem koşulları ve çevresel faktörler.

Polimer çözeltisi özellikleri, elektro-eğirme sürecinin temelini oluşturur. Bu özellikler, polimerin konsantrasyonu, çözgenin tipi ve konsantrasyonu, polimerin moleküler ağırlığı ve dağılımı gibi faktörleri içerir (Çizelge 5). Bu parametreler, nanofiberlerin morfolojisini, boyutunu ve homojenliğini etkileyebilir. Örneğin, düşük polimer konsantrasyonları genellikle daha ince nanofiberlerin üretilmesine yol açar, ancak aynı zamanda fiberlerin mekanik özelliklerini de etkileyebilir.

İşlem koşulları, elektro-eğirme sürecinde kullanılan elektrik alanının şiddeti, çözeltinin akış hızı, elektrotlar arasındaki mesafe gibi faktörleri içerir (Çizelge 6) (Kamaz, 2020). Bu koşullar, nanofiberlerin çapını, dağılımını ve yönelimini etkileyebilir. Örneğin, yüksek elektrik alanı şiddetleri genellikle daha ince ve düzenli nanofiberlerin üretilmesine yol açabilir, ancak aynı zamanda sürecin istikrarını da etkileyebilir.

Çevresel faktörler de elektro-eğirme sürecini etkileyebilir. Laboratuvar ortamının sıcaklık ve nem seviyeleri, hava akışı ve elektrostatik bozunma gibi faktörler, sürecin tekrarlanabilirliğini ve ürün kalitesini etkileyebilir (Çizelge 7) (Kiremitler, 2016). Bu nedenle, sürecin gerçekleştirildiği ortamın kontrol altında tutulması önemlidir.

Sonuç olarak, elektro-eğirme sürecindeki bu parametrelerin dikkatli bir şekilde optimize edilmesi, istenen özelliklere sahip homojen ve düzgün nanofiberlerin üretilmesini sağlar. Bu, çeşitli uygulamalarda kullanılan nanoteknolojik malzemelerin geliştirilmesinde önemli bir adımdır.

Çizelge 5. Çözeltiyi etkileyen parametreler

Çözeltiyi Etkileyen Parametreler	
Polimer Konsantrasyonu	Polimer konsantrasyonu, nanofiberlerin şekli, ortalama lif çapı ve boncuklu yapı oluşumunda önemli bir faktördür. Bu durum, polimer konsantrasyonundaki değişikliklerin viskozite özelliklerini etkilemesinden kaynaklanmaktadır. Düşük polimer konsantrasyonları, nanofiberlerin boncuklu yapıda olmasına neden olur; bu, elektrik alanın düşük viskozite ile karşılaşmasından kaynaklanmaktadır. Çok yüksek polimer konsantrasyonları ise sarmal şekilli oluşumlara yol açar ve lif oluşumu gerçekleşmez. Ancak, uygun konsantrasyon değeri sağlandığında, pürüzsüz nanofiber yapıları elde edilebilir. (Sunar ve Haşçıçek, 2017).
Viskozite	Çözelti viskozitesi, üretilen nanofiberlerin çapını ve morfolojisini etkileyen önemli bir parametredir. Yüksek viskozite ile çalışmak zordur çünkü polimer çözeltisinin beslenmesi zorluk yaratır. Öte yandan, çok düşük viskozite ile çalışıldığında sürekli fiber elde edilmesi zordur. Bu nedenle, optimal viskozitede çalışmak gereklidir. Yapılan araştırmalar sonucunda, elektroegirme işlemi için en uygun viskozite değeri 1 ile 215 μ arasında bulunmuştur. (Alpaydin, 2018).
Yüzey Gerilimi	Uygulanan voltaj da elektroegirme işlemi için önemli bir parametredir. Düşük voltaj ile egirme işlemi gerçekleştirildiğinde, çözelti yüzey geriliminin düşük olması gereklidir. Düşük voltaj, püskürtme akışının daha stabil ve kontrollü olmasını sağlar, bu da nanofiberlerin homojen ve yüksek kaliteli olmasına katkıda bulunur. Sonuç olarak, elektroegirme işleminin etkinliği ve elde edilen nanofiberlerin kalitesi, çözelti yüzey gerilimi ve uygulanan voltaj gibi parametrelerin dikkatli bir şekilde kontrol edilmesine bağlıdır. Yüzey gerilimi ve voltajın optimize edilmesi, boncuklu fiber yapısından düz ve pürüzsüz fiber yapısına geçişi mümkün kılarak, nanofiberlerin doku mühendisliği, filtrasyon, ilaç salınımı ve diğer biyomedikal uygulamalar gibi çeşitli alanlarda etkin bir şekilde kullanılmasını sağlar (Alpaydin, 2018).

Çizelge 5. (devam)

Polimer ve Çözücü iletkenliği	Elektroeğirme işleminde, besleme çözeltisine elektriksel yük aktarımı elektrotlar aracılığıyla sağlanmaktadır. Bu nedenle, çözelti iletkenliğinin belirli bir aralıkta olması kritik öneme sahiptir. Çözeltinin iletkenliğinde meydana gelen artış, nanofiberlerin çapında düşüşe neden olmakta ve bu şekilde daha ince nanofiberlerin oluşumu sağlanmaktadır. Yapılan araştırmalar, elektroeğirme ile nanofiber üretimi için optimal iletkenlik değerinin 0-5 mS/cm aralığında olması gerektiğini göstermektedir. Bu aralık, nanofiber üretimi için en uygun koşulları sağlamaktadır. Çözelti iletkenliğinin 5 mS/cm değerinin üzerine çıkması veya sıfır iletkenlikte olması durumunda, nanofiber üretimi mümkün olmamaktadır (Zong vd., 2002.)
Polimer Molekül Ağırlığı	Moleküler ağırlığın artması, istenen viskozite değerinin sağlanmasına katkıda bulunur ve bu durum, pürüzsüz fiberlerin elde edilmesini sağlar. Yüksek moleküler ağırlık, düşük konsantrasyonda bile düzgün fiber oluşumunu destekler. Bu özellik, elektroeğirme işlemi sırasında daha homojen ve kaliteli nanofiberlerin üretimine olanak tanır (Zhao vd., 2005).

Çizelge 6. İşlem parametrelerine ait değişkenler

İşlem Parametresine Ait Değişkenler	
İğne ile Toplayıcı Arası Mesafe	İğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe, nanofiberlerin yapısal morfolojisini önemli ölçüde etkiler. Mesafenin kısalması durumunda, uygulanan elektrik alanın gücü artar, bu da fiber çapında artışa ve boncuklu yapı gibi morfolojik bozulmalara yol açar. Optimal mesafe, homojen ve pürüzsüz nanofiberlerin elde edilmesi için kritik bir parametredir.

Çizelge 6. (devam)

Çözelti akış hızı	Polimer çözeltisinin şırınga içerisinden akış hızı, elektro-eğirme sürecinde önemli bir parametredir. Çok yüksek akış hızı, çözeltinin toplayıcıya ulaşmadan önce kısa sürede kurummasına neden olur, bu da kalın çaplı ve boncuklanma gösteren fiberlerin oluşmasına yol açar. Bu nedenle, optimal akış hızının belirlenmesi, düzgün ve homojen nanofiberlerin elde edilmesi için kritik öneme sahiptir.
Uygulanan gerilim (voltaj)	Elektro-eğirme işleminde, uygulanan gerilim polimer çözeltisine enerji vererek fiberlerin oluşumunu ve yönlendirilmesini sağlar. Voltaj değeri artırıldığında, daha ince yapıda nanofiberlerin elde edilmesi mümkün olur. Elektro-eğirme sürecinde, Taylor konisi ve jet oluşumu için belirli bir kritik voltaj gereklidir; jetin kararlılığını artırmak için bu kritik voltajın üzerinde bir gerilim uygulanması gerekir. Bu şekilde, fiberlerin düzgün ve tutarlı bir şekilde üretilmesi sağlanır.
İğne çapı	Şırınga içerisindeki polimer çözeltisinin dışarıya verildiği kısmı oluşturan iğne ucu, dışarı çıkacak eriyik miktarını, damla boyutunu ve besleme pompasının uygulaması gereken kuvveti doğrudan etkiler. Kullanılan polimer yüksek viskoziteye sahip bir sıvı ise, küçük çaplı iğne kullanımı eriyiğin dışarı çıkmasını zorlaştırır. Benzer şekilde, çok büyük çaplı iğne kullanımı fazla miktarda eriyik malzemenin dışarı akmasına neden olur. Bu nedenle, elektro-eğirme işleminde optimal iğne ucu seçimi kritiktir. İğne iç çapındaki optimal azalma ile daha ince nanofiberlerin elde edilmesi mümkündür.

Çizelge 7. Çevresel değişkenler

Çevresel Değişkenler	
Sıcaklık	Sıcaklık artışı, viskozitenin ve yüzey geriliminin azalmasına neden olarak ince fiberlerin elde edilmesine katkı sağlar.
Nem	Nem artışı fiber yapısında porlu görünüme neden olmaktadır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

Tezin bu kısmında, tez boyunca yürütülen deneysel çalışmalar ve bu çalışmalarda kullanılan malzeme ve cihazların açıklaması verilmiştir.

4.1. Dental Follikül Mezenkimal Kök Hücre Üretimi (DF-MKH)

İnsan Diş Folikül (DF) Doku Örneklerinin Elde Edilmesi: Diş folikül dokuları, MSKÜ, Diş Hekimliği Fak., Ağız, Diş Çene Cerrahi Anabilim Dalı polikliniklerinde, inflamatuvar/otoimmün hastalığı olmayan, basınç ağrısı, dişin pozisyonunun bozuk olması veya ortodontik sebepler ile hastaneye başvuran 19-25 yaş arasında olan ve diş çekim endikasyonu uygun görülen beş sağlıklı gönüllünün tam gömülü yirmi yaş dişi çekimi sırasında *tıbbi atık olarak* ortaya çıkan folikül dokulardan elde edilmiştir. Diş folikülü diş çekimi sonrasında 15 ml, steril %1 penisilin/streptomisin içeren fosfat tampon solüsyon (PBS) içinde 2 saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmıştır.

cDMEM Hazırlama: 50 ml falkona %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 penisilin/streptomisin/amplimisin ve %1 penisilin/streptomisin eklenerek, üzeri DMEM (Dulbeccos' Minimum Essential Medium) ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

DF-MKH'lerin İzolasyonu ve Tanımlanması: DF-MKH'lerin diş folikülerinden izolasyonu ekibimizin önceki çalışmalarındaki protokollere uygun olarak yapılmıştır (Genç vd., 2018). DF-MKH izolasyonu, immünolojik çalışmalar ve analizler MSKÜ-ALM- İmmünoloji Ve Kök Hücre Biyolojisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Kültür çalışmaları kontaminasyonun önlenmesi amacı ile laminar flow (biosafety cabinet class II) cihazı içerisinde yapılmıştır.

DF-MKH izolasyonu: Diş folikül dokuları petri kaplarına yerleştirilerek, mekanik olarak steril bistüri ucu ile 0,1-0,5 mm²'lik parçalara kesilerek ve 0.45'lik filtreden geçirilen PBS içinde çözülmüş kollajenaz tip-1 (3 mg/ml) solüsyonunda 37°C'lik inkübatörde 45 dakika-1 saat enzimatik parçalanmaya bırakılmıştır. Fiziksel ve enzimatik olarak parçalanan dokuların üzerine yaklaşık 3-5 ml cDMEM eklenerek 1500 rpm devirde 5 dakika santrifuj edilmiştir. Daha sonra süpernatant atılarak, kalan hücre pelleti üzerine 3-5 ml cDMEM ile süspanse edilerek 1500 rpm devirde 5 dakika

santrifüj edilmiştir ve süpernatant atılarak hücre pelleti üzerine 5 ml cDMEM eklenip, hücre kültürleri T25 kültür kabında inkübe edilmiştir.

İzole edilen DF-MKH'lerin pasajlanması: DF-MKH'lerin tabana yapışması ve çoğalması için hücreler başlangıçta T25 kültür kabında 37°C de %5 CO₂'li inkübatörde 5-10 gün boyunca kültür solüsyonu ilk 2 gün değişmeden sonrasında ise 2 günde bir kere taze hazırlanmış besiyeri ile değiştirilerek kültür edilmiştir. Hücreler, toplam yüzey alanının %80'i üzerine ulaştığında pasajlama yapılmıştır. Yüzeydeki süpernatant atılarak, dipte kalan hücre pelleti 1 ml DMEM solüsyonda süspanse edilerek hücre sayısı hesaplanmıştır. Her 5x10⁵ hücre için 1 adet T75 kültür kabı kullanılarak hücre sayısı arttırmaya devam edilmiştir. Hücreler kültür kabı yüzeyinde yaklaşık %80 yoğunluk gösterdiğinde %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu ile pasaj işlemi yapılarak, birinci kültür sıfırncı pasaj olarak kabul edilmiştir ve birinci kültürü takip eden her kültür işlemi sonrası pasaj sayıları devam etmiştir.

4.2. TGFβ-1 Hazırlanması

TGFβ-1, İmmünoloji ve Kök Hücre Laboratuvarı'nda 100ng/ml oranında fosfat tampon solüsyon çözeltisi içerisinde hazırlanıp liyofilize edildi.

4.3. Nanofiber Üretimi için Kullanılan Malzemeler

Kıkırdak rejenerasyonu için dental folikül mezenkimal kök hücre katkılı nanofiber doku matrikslerinin üretimi için doğal polimerler olarak jelatin ve hyaluronik asit, FDA onaylı sentetik polimerlerden PCL kullanılmıştır.

80,000 g/mol moleküler ağırlığına sahip PCL polimeri Sigma-Aldrich firmasından, Jelatin 240 bloom MM Ingredients firmasından(C₁₄H₂₁NO₁₁)_n molekül formülüne sahip Hyaluronik asit polimeri Aromel Kimya Firmasından temin edilmiştir.

Jelatin ve PCL solüsyonlarının hazırlanmasında çözücü olarak 2,2,2,- Trifluoroethanol (TFE) kullanılmıştır. C₂H₃F₃O kimyasal formülüne sahip renksiz bir çözücü olan Trifluoroethanolün molekül ağırlığı 100.04 g/mol, yoğunluğu 1.38 g/cm³, kaynama noktası 73.6°C'dir. Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Dental follükül mezenkimal kök hücre, MSKÜ Diş Hekimliği Fakültesinde tıbbi atık olarak değerlendirilen tam gömülü yirmi yaş diş çekimi ile elde edilmiştir.

30 kDa moleküler ağırlığa sahip yaklaşık saflığı %98 olan Recombinant Human TGFβ-1 PeproTech firmasından temin edilmiştir.

Fosfat tamponlu salin (PBS) pH değeri (7.2-7.6) uygunluğu nedeniyle çalışmalarda kullanılmıştır. Sigma-Aldrich Kimya firmasından sağlanmıştır.

Nanofiber üretiminde kullanılan malzemeler ve kullanım amaçları Çizelge 8’de verilmiştir.

Çizelge 8. Nanofiber üretiminde kullanılan malzemeler ve kullanım amaçları

Kullanılan malzeme	Kullanım Amacı
PCL (Polikaprolakton)	• Sahip olduğu mekanik ve kimyasal özellikleri, kolay işlenebilirliği ve biyobozunur olması • FDA onaylı doku mühendisliği alanında destek matrisi olarak kullanılabilir olması • Mekanik olarak zayıf özellik gösteren doğal polimer jelatinin bu özelliğini ortadan kaldırması
GEL (Jelatin)	• Gözenekliliği ayarlanabilir, biyolojik olarak parçalanabilir bir proteindir. • Hidrofiliklik ve hücre yapışmasını sağlayan özellikleri, • PCL sentetik polimerinin sahip olduğu hidrofobik ve zayıf yüzey ıslatmasından kaynaklanan zayıf hücre yapışması ve hücre çoğalmasının desteklenmesini sağlamak

Çizelge 8. (devam)

HA (Hyalüronik asit)	• <i>Biyobozunur, biyouyumlu, güçlü su tutma yeteneği benzersiz viskoelastik özellikleri,</i> • <i>Bağ dokuları ve eklemlerde bulunan sülfatsız glukozaminoglikan (GAG) moleküllerinden biri olduğundan hücresel ve doku destekleme açısından da önemli bir rol oynaması,</i>
DF-MKH (Dental follikül mezenkimik kök hücre)	• <i>Doku onarımını düzenleme, inflamasyonu azaltmak ve immün düzenleyici etkisi,</i> • <i>Kondrojenin uyarılması,</i>
TGFβ-1 (Dönüştürücü büyüme faktörü beta)	• <i>Kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını etkili bir şekilde aktive etmesi,</i>

4.3.1. PCL/GEL/HA (FK1) Solüsyonunun hazırlanması;

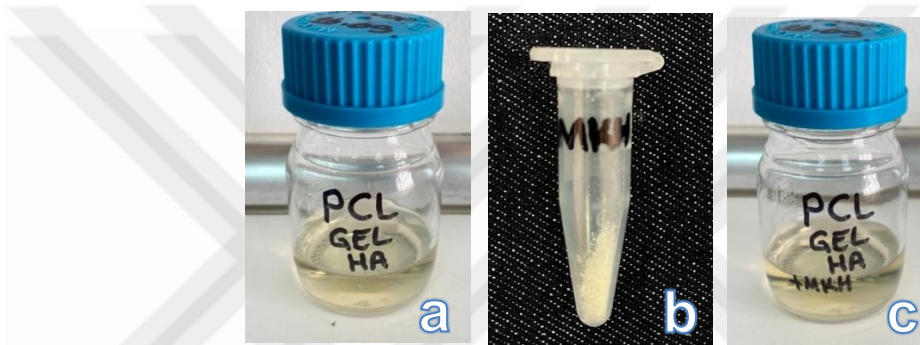


Şekil 24. PCL/ GEL/ HA solüsyonu hazırlama aşamaları a) PCL solüsyonu b) GEL solüsyonu c) HA d) PCL/ GEL/ HA solüsyonu

Solüsyon hazırlanmasına ait aşamalar Şekil 24'te verilmiş olup detayları şu şekildedir: Solüsyonlar hazırlanırken öncelikle çözücü olarak Trifluoroetanol (TFE) kullanıldı.

PCL solüsyonu hazırlamak için 20 ml TFE çözücüsü içerisine %10 w/v PCL polimeri ilave edildi ve solüsyon homojen hale gelene kadar 6 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. GEL solüsyonu hazırlamak için 20 ml TFE çözücüsü içerisine %12 w/v Jelatin ilave edildi ve solüsyon homojen hale gelene kadar 6 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. PCL ve GEL solüsyonlarından 1:1 oranda olacak şekilde 15 ml PCL solüsyonu, 15 ml GEL solüsyonu ve toplam karışımın %1'ine karşılık gelen 0.3 gr HA eklenerek cam behere ilave edilerek homojen hale gelinceye kadar 6 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılarak elektro-eğirme işleminin gerçekleştirileceği karışım elde edildi.

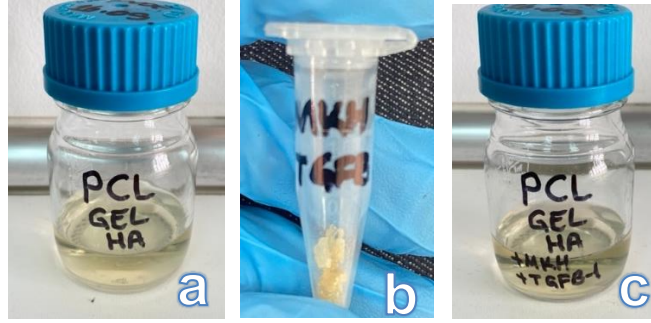
4.3.2. PCL/GEL/HA + DF-MKH (FK2) Solüsyonunun hazırlanması;



Şekil 25. PCL/ GEL/HA + DF-MKH solüsyonu hazırlama aşamaları. a) PCL/ GEL/HA solüsyonu b) Liyofilize edilmiş DF-MKH c) PCL/ GEL/HA + DF-MKH Solüsyonu

4.3.1’de elde edilen PCL/ GEL/HA solüsyonundan 3 ml alınarak liyoflize edilmiş 2 milyon DF-MKH ile cam beher içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırılarak elektro-eğirme işleminin gerçekleştirileceği karışım elde edildi.

4.3.3. PCL/GEL/HA+DF-MKH+TGFβ-1 (FK3) Solüsyonunun hazırlanması;

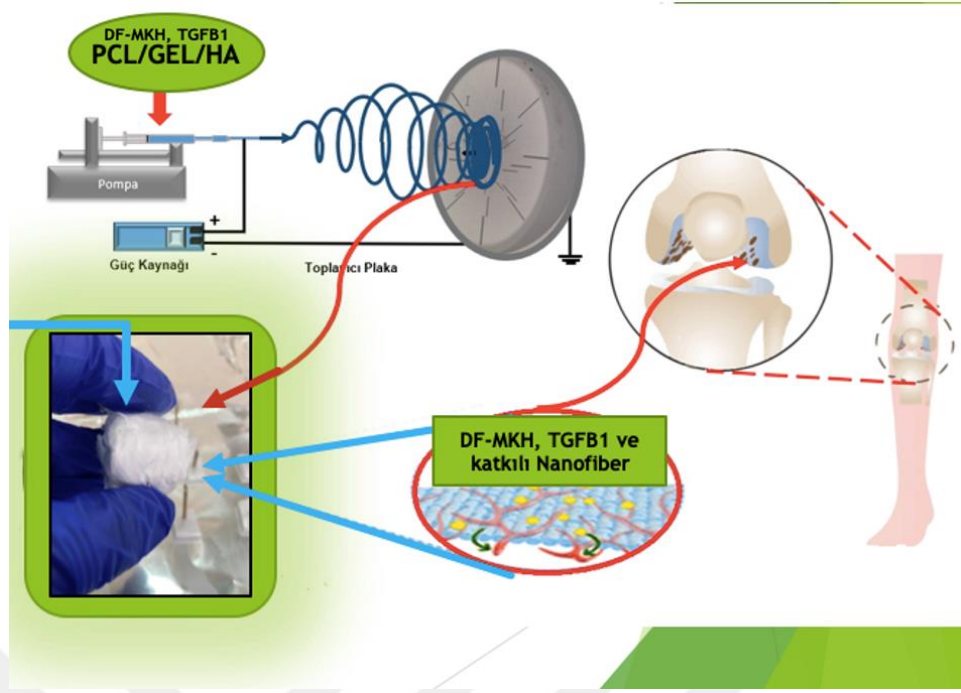


Şekil 26. PCL/ GEL/HA + DF-MKH + TGFβ-1 Solüsyonu Hazırlama Aşamaları. a) PCL/ GEL/HA solüsyonu b) Liyoflize edilmiş DF-MKH + TGFβ-1 c) PCL/ GEL/HA + DF-MKH + TGFβ-1 solüsyonu

4.3.1’de elde edilen PCL/GEL/HA solüsyonundan 3 ml alınarak liyoflize edilmiş 2 milyon DF-MKH ve 40 ng TGFβ-1 ile cam beher içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırılarak elektroegirme işleminin gerçekleştirileceği karışım elde edildi.

4.4. Nanofiber Doku İskelelerinin Üretimi

Hazırlanacak çözeltideki malzeme tartımı için RADWAG marka AS220,R2 model hassas terazi, çözeltilerin karışımı için TOPO marka HSD 120-03P model manyetik karıştırıcı, numune kurutma işlemleri ve biyobozunurluk testi sırasında insan vücut sıcaklığında ortam sıcaklığı ayarlamak için MEMMERT marka UN55^{PLUS} etüv cihazı kullanıldı. Nanofiber üretimi için ise 0-30 kV voltaj kapasitesine sahip Spingenix marka SG1 model elektro-eğirme cihazı kullanıldı (Şekil 28).



Şekil 27. Elektroğirme Yönteminin Şematik Gösterimi

Elektroğirme cihazı toplayıcı, yüksek voltaj kaynağı, şırınga pompası ve iğne uçlarından oluşmaktadır (Şekil 27).



Şekil 28. Elektroğirme cihazı

4.4.1. Üç Boyutlu Nanofiber Üretimi İçin Kullanılan Toplayıcının Tasarımı

Kıvrımda yapıda ihtiyaç duyulan kolay şekil alabilen (Pamuk görünümlü) üç boyutlu (3B) nanofiberleri elde etmek için topraklanmış içi boş yarım daire çanak ve bir dizi 2 cm boyunda çelik çiviler kullanılmıştır. Plakada çelik çiviler 1cm²'lik yalıtkan köpüklere yerleştirilerek plastik çanağın merkezine ve merkezinden eşit uzaklıklara sırayla yerleştirilmiştir. Pamuk görünümlü 3B elektroğirilmiş nanofiberler Şekil 30'daki gibi çelik çivilerin üzerinde biriktirilerek bir cam çubukla toplanmıştır.



Şekil 29. Pamuk benzeri nanofiber üretilen toplayıcı ve üretilen nanofiber

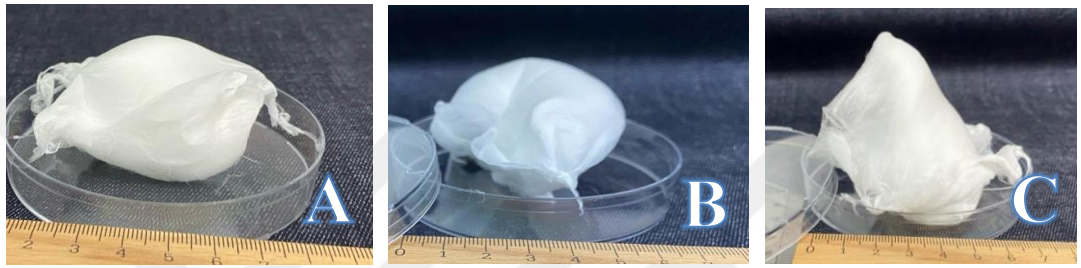
4.4.2. Nanofiber Üretimi İçin Kullanılan Parametreler

Elektroğirme sürecinde kullanılan parametrelerle ilgili açıklamalar Çizelge 9'da verilmiştir.

Çizelge 9. Elektroğirme yöntemi için kullanılan parametre değerleri

Nanofiber Çeşidi	Voltaaj	Toplayıcı mesafe	Akış hızı
FK1	23 kV	17 cm	0,08 ml/dk
FK2	23 kV	15 cm	0,08 ml/dk
FK3	23 kV	16 cm	0,07 ml/dk

Elektroeğirme yöntemi için hazırlanan çözeltiler hava kabarcıkları gözlemlendiğinde ultrasonik banyo yardımıyla karıştırılmıştır. 5 ml lik şırıngalar kullanılarak 4ml çözelti çekilmiştir. 4 şırınga, şırınga kılıflarına konularak pompalama sistemine yerleştirilmiştir. Şırıngalar ucuna iletim için borular takılmış ve sabitlenerek uçlarına iğne uçları yerleştirilmiştir. Kv değerinden çözelti için uygun voltaj değeri ayarlanmıştır. İğne uçları ve toplayıcı arası ayarlanmış ve optimum akış hızında çalışılmıştır. Şırıngalardaki çözeltiler bitene kadar spinleme işlemi gerçekleştirilerek nanofiberler elde edilmiştir (Şekil 30).



Şekil 30. Elde Edilen 3B Nanofiberlerin Görüntüleri A) FK1, B) FK2 ve C) FK3

4.5. Nanofiber Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Malzeme karakterizasyon testleri FE-SEM, DMA, BET Gözeneklilik Erciyes Üniversitesi TAUM'da, Su Temas Açısı Erciyes Üniversitesi ERNAM'da, FTIR ve biyobozunurluk Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi'nde gerçekleştirildi.

Biyobozunurluk, su tutma testleri Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Moleküler Nano Malzeme Laboratuvarında, FTIR analizi Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Kimya bölümünde, kök hücre elde edilmesi ve deneysel çalışmaları Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi İmmünoloji ve Kök Hücre Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Karakterizasyon analizleri için FESEM, DMA-Mekanik ve Gözeneklilik analizleri Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde (TAUM), su temas açısı analizi Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Uygulama ve Arştırma Merkezi (ERNAM) da Hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

4.5.1. FE-SEM analizi

ZEISS EVO LS10 marka ve model alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu ile nanofiberlerin çap dağılımları, yüzey morfolojileri, yerleşim açısı, geçirgenliği ve biyobozunma sonrası oluşan morfolojik bozunmalar incelenmiştir.

FE-SEM analizi için üretilen nanofiberlerden 1x1 cm² boyutlarda numuneler alınmıştır. Numuneler 5.31 nm altın paladyum ile kaplanarak analizi gerçekleştirilmiştir.

4.5.2. BET Gözeneklilik Analizi

Üretilen nanofiberlerin yüzey alan ölçümleri ve yüzey gözenek boyutu lm MICROMERITICS marka, GEMINI VII SURFACE AREA AND POROSITY marka cihaz ile Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde (TAUM) N₂ adsorpsiyon-desorpsiyon izotermi kulllanarak llmştir. Spesifik yüzey alanları, adsorbat olarak ultra-yüksek saflıkta azot ve kriyojen olarak sıvı azot ile çok noktalı BET analizi ve gözenek boyutu ölçümüyle belirlenmiştir.

4.5.3. FTIR analizi

Thermo Scientific – Nicolet iS-10 marka/model cihaz ile FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. FTIR analizi 400 – 4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında gerçekleştirilmiş olup bu analiz ile fonksiyonel gruplar ve kimyasal karakterizasyon saptanmıştır.

4.5.4. Su temas açısı

Temas açısı katı formda bir numunenin bir sıvı tarafından ıslatılma miktarının belirlenmesidir (iğdemir 2015). Biolin Scientific Attension – Theta Lite 101 cihazı ile su temas açısı ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

4.5.5. DMA Mekanik Analizi

Üretilen nanofiberlerin mekanik olarak tepkisinin ölçülmesi için PERKİN ELMER DMA 8000 marka/model cihaz ile test gerçekleştirilmiştir. Üretimi yapılan 4 çeşit elektro-eğirme sonucu oluşturulan nanofiberlerden 1x5 cm ölçülerinde kesilerek hazırlandı, 5mm/dak hızda işlem gerçekleştirildi.

4.5.6. İn Vitro Biyobozunurluk Analizi

Biyobozunurluk analizi bağışçı kanının santrifüj edilmesiyle oluşan plazma kullanılarak gerçekleştirildi. Nanofiberler 1x1 cm² ebatlarında kare boyutlarda kesilerek plazma içerisinde 37 °C sıcaklıkta inkübe edildi. Kesilen parçaların ilk ağırlık ölçümleri alınmış plazma içerisinde bekletilerek bozunması gerçekleştirilmiş ve haftalık periyotlarla ağırlık kayıpları ölçülmüştür. İnkübe edilen numunelerin ölçümünden önce etüvde kurutulma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bozunma oranları aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\%Bozunma = \frac{(İlk Ağırlık - Son Ağırlık)}{İlk Ağırlık} \times 100 \text{ Eşitlik (1)}$$

4.5.7. İn Vitro Hücre Canlılık Analizi

Annexin V 7AAD hücre canlılık analizi ile nanofiberlere yüklenen DF-MKH'lerin canlılık oranını analiz etmek için BD Annexin V kiti kullanılmıştır. Kit üreticisinin protokolüne göre analizler yapılmıştır. Özetle; Nanofiberden PBS ile salınan hücreler flow sitometri tüpüne aktarıldı, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek dipteki pellet Annexin V (5 mikrolitre) ve 7AAD (5 mikrolitre) antikorlarla işaretlenmiş, 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Süre sonunda 400 mikrolitre kit solüsyonu eklenerek flow sitometri cihazında analiz edilmiştir.

Hücre canlılık analizi Üniversitemiz öğretim üyesi Doç. Dr. Deniz GENÇ tarafından Annexin V-7AAD kiti ile flow sitometri cihazında yapıldı.

4.5.8. İn Vitro Kondrojenik Farklılaşma Analizi

Üniversitemiz öğretim üyesi Doç. Dr. Deniz GENÇ tarafından yapılmış olan kondrojenik farklılaşma analizi nanofiberlere yüklenen DF-MKH'lerin kondrojenik farklılaşma potansiyelini değerlendirmek için nanofiberden PBS ile salınan hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Dipteki pellet önce %1 penisilin/streptomisin (100 IU) ve %10 FBS içeren DMEM besiyeri ile 48-72 saat 6 kuyulu kültür plaklarının kuyusunda en az %80 taban yapışması sağlanana kadar kültürlenmiştir. Kültür süresi sonunda hücrelerin üzerinden DMEM besiyeri atılarak, kondrojenik farklılaşma besiyeri eklenerek 14-21 gün her üç günde bir besiyeri değiştirilerek kültürlenmeye devam edilmiştir. Süre sonunda hücreler %10 formaldehid ile fiks edilmiştir (Şekil 66). Hücrelerin bulunduğu her bir kuyuya 2 ml Kondrojenik Farklılaşma Besiyeri eklenmiştir (StemPro Chondrogenic Differentiation Kit, Thermofisher, Katalog No: A1007101).

4.5.9. İn Vivo Deneysel Çalışmalar

Hayvanların Hazırlanması (Anestezi)

Çalışmada 40 adet 3-4 aylık erkek Wistar Albino rat (ortalama 350gr) kullanılmıştır. Ratlar Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Çalışma boyunca, hayvanlar 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde tutulmuş ve ad libitum gıda/su sağlanmıştır. Araştırma Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 06/06/2023 tarih ve 2023/04 - 19/23 nolu karar sayısı ile çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna toplantıya katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

İn Vivo Model

Çalışmada kullanılan ratlar her grupta 6 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır (Çizelge 10).

Çizelge 10. İn vivo model grup açıklamaları

Grup Numarası	Grup Adı	Kullanılan Malzeme Kodu	Kullanılan Malzeme
G1	Kontrol	-	-
G2	Hücresiz Nanofiber	FK1	PCL/GEL/HA Nanofiber
G3	Hücreli Nanofiber-1	FK2	PCL/GEL/HA +DF-MKH Nanofiber
G4	Hücreli Nanofiber-2	FK3	PCL/GEL/HA Nanofiber +DF-MKH +TGFβ-1 Nanofiber

Tüm ratlarda anestezi protokolü olarak periton içi 10mg/kg Xlazine hydrochloride (Rompun, Bayer 23.32mg/mL) takiben 10 dakika sonra periton içi 70mg/kg Ketamin hydrochlorur (Ketalar, Parke-Davis, 50 mg/mL) uygulanmıştır.



Şekil 31. Deney hayvanlarının hazırlanması

Anestezi uygulaması sonrasında ratların sağ genu eklemleri yıkanıp traş edilmiş ve operasyon için hazırlanmıştır (Şekil 30). Operasyonda kullanılacak olan cerrahi ekipmanlar steril olarak temin edilmiştir (Şekil 31).



Şekil 32. Cerrahi ekipmanlar

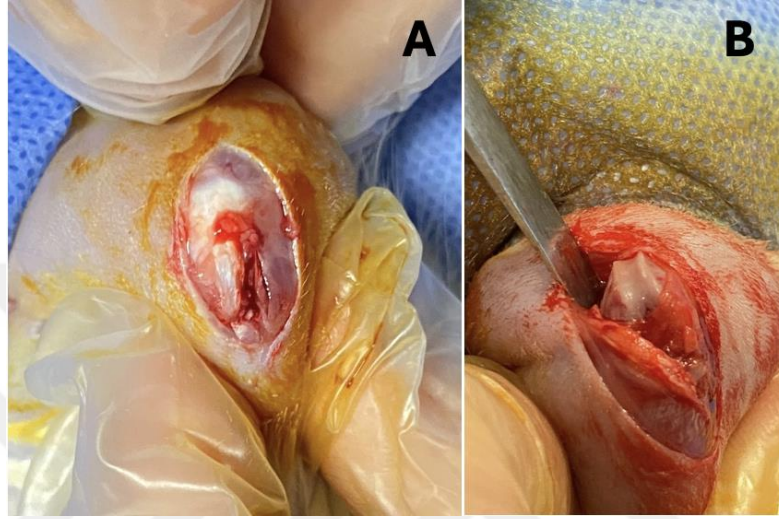
Tıraş sonrası ilgili bölge antiseptik (Batikon %10) ile yıkanıp steril serviyetler ile sınırlandırılmıştır (Şekil 32).



Şekil 33. Cerrahi prosedüre hazırlık

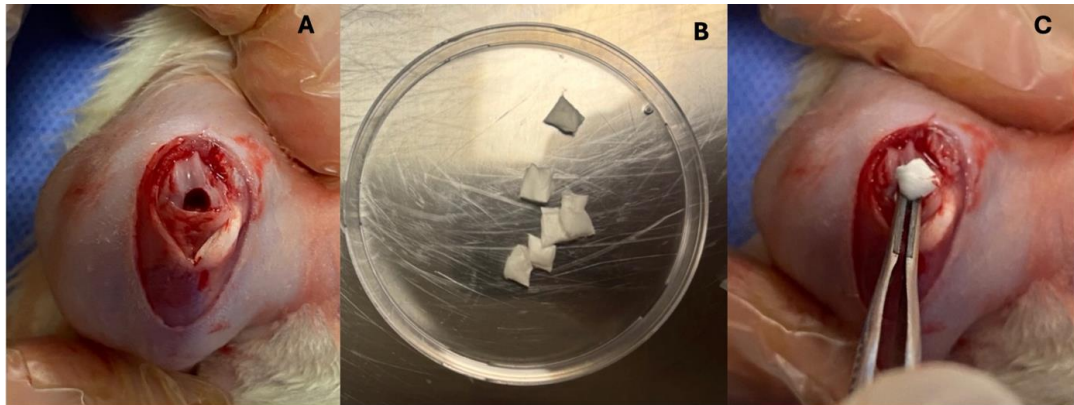
Cerrahi prosedür için sağ genu eklemine medial paramedian ensizyon ile yaklaşılmıştır (Şekil 33). Deri ve deri altı dokular ayrıldıktan sonra patellar tendona ulaşılmıştır

(Şekil 34A). Quadriseps tendonunun medial 1/3'lük kısmından başlayarak patellanın medialinden distale doğru tuberositas tibianın medialine uzanacak şekilde ensizyon yapıldı ve patella laterale deviye edildi. Femurun distal kondilleri açığa çıkarıldı (Şekil 34B). Medial femoral kondil açığa çıkartıldıktan sonra yük alan orta 1/3'lük kısmına 2,5 mm çaplı ve 2 mm derinlikte tam kat kondral hasarlar mikrodriill aracılığıyla oluşturuldu (Şekil 35A).



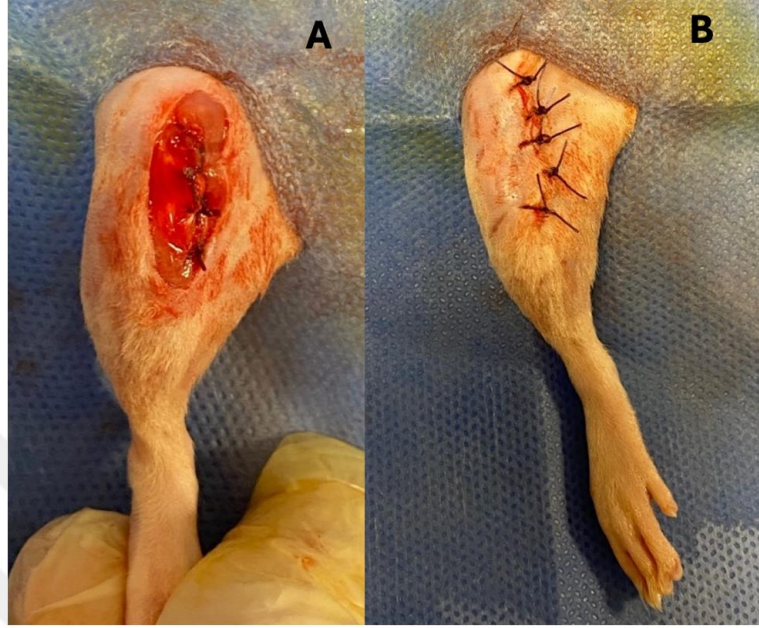
Şekil 34. A) Medial paramechanical ensizyon B) Patellanın laterale devrilmesi

Yaklaşık 2 mm derinliğinde ve 2.5 mm çapında nanofiber matrisler hazırlandı (Şekil 35B). 1. grup kontrol grubu olmak üzere 3 grup için oluşturulan hasar boyutlarında hazırlanan PCL/GEL/HA, PCL/GEL/HA+DF-MKH, PCL/GEL/HA+DF-MKH +TGF β -1, nanofiberler itici ile kürete edilen hasarlı alana uygulandı (Şekil 35C).



Şekil 35. A) Tam kat kontrol hasar B) İmplant edilmek üzere hazırlanan nanofiberler C) Hasarlı bölgeye nanofiber uygulanması

Salin solüsyonu ile lavaj yapıldıktan sonra ciltaltı dokular, emilebilir keskin uçlu 3-0 Vicryl yardımıyla suture edildi (Şekil 36A). Cilt dokusu ise keskin uçlu 3-0 Prolen ile usulüne uygun olarak (Per primum intervention) kapatıldı (Şekil 36B).



Şekil 36. A) Cilt altı dokusu B) Cilt dokusu suture edilme işlemleri

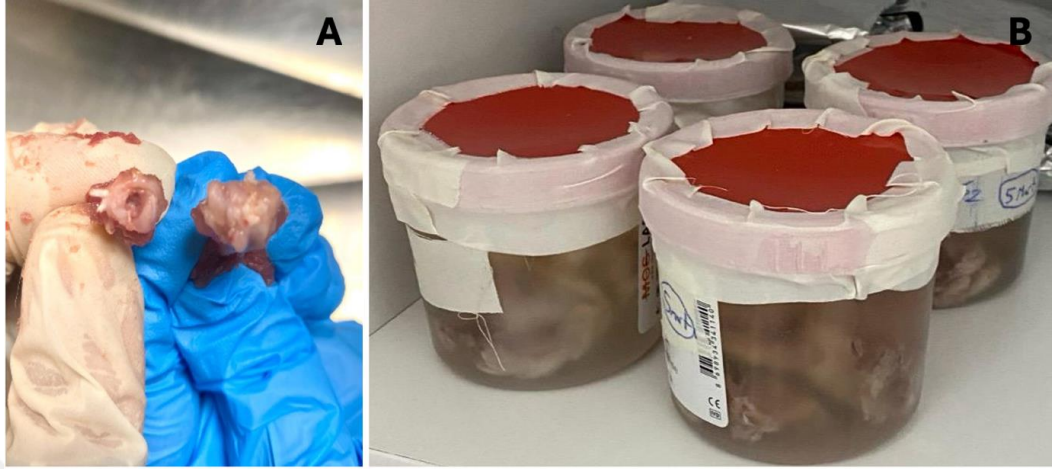
Post-operatif dönemde hayvanların rahat olabilmeleri için ılık ortamda bakımları sağlanmış, yara yerleri pansuman sonrası açık bırakıldı (Şekil 37).



Şekil 37. Cerrahi işlem sonrası dönem

Denekler cerrahi işlem sonrası sakrifikasyon sürecine kadar kafes içinde aktif mobilizasyona izin verilerek takip edildi. Her grup takip süresi sonunda (6. haftada) anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edilerek femur kondilleri uyluk distal

yarısı ile birlikte kısmi çıkartıldı. Femoral kondiller diseke edildi (Şekil 38A). %10 formol solüsyonuna alındı. Histopatolojik inceleme sürecine geçildi (Şekil 38B).



Şekil 38. A) Sakrifikasyon sonrası kontrol ve nanofiber tedavizi uygulanan kıkırdak örneği B) Formaldehit içindeki sakrifiye edilmiş kıkırdaklar

Cerrahi sonunda tek doz intraperitoneal 40 mg/kg sefazolin sodyum uygulandı. Anajezik olarak metamizol sodyum (Novalgin 1g/2ml IM/IV ampul) intramüsküler olarak uygulandı. Postoperatif dönemde ratlara immobilizasyon yöntemi uygulanmadı. Denekler cerrahi işlem sonrası sakrifikasyon sürecine kadar kafes içinde aktif mobilizasyona izin verilerek takip edildi. Her grup takip süresi sonunda (6. haftada) anestezi altında dekapitasyonla sakrifiye edilerek femur kondilleri uyluk distal yarısı ile birlikte kısmi çıkartıldı (Şekil 38A). Femoral kondiller diseke edildi. %10 formol solüsyonuna alındı. Histopatolojik inceleme sürecine geçildi (Şekil 38B).

4.5.10. Mikro CT Görüntüleme Analizi

İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Merkezi (İBTAM)'dan hizmet alımı yapılmıştır. Malzemeye zarar vermeden, X- ışınları kullanılarak malzemenin kesitlerinden aldığı görüntülerle üç boyutlu (3B) model oluşturabilen bu analiz yöntemiyle, kompozit, polimerler, biyolojik materyaller olan kemik, diş, kıkırdak doku, vb... dokuların içerisindeki boşluklu yapının incelenmesi ve bir materyalin içerisindeki 4 farklı maddeye kadar mikron düzeyinde görüntüleme gibi işlemler in-vitro koşullarda gözlemlenmiştir.

4.5.11. Histopatolojik İnceleme

İzmir A Patoloji Laboratuvarı'ndan hizmet alımı yapılmıştır. Histopatolojik incelemeler patolog Prof. Dr. S. Serap BİRİNCİOĞLU tarafından yapılmıştır. Elde edilen analiz verileri gözlemlenmiştir.

Gözlemler Mankin Skor tablosuna göre değerlendirilmiştir (Çizelge 11) (Moussavi-Harami vd., 2009).

Çizelge 11. Mankin'in histolojik kırkırdak hasarı skorlama sistemi

Yapı	Skor
Normal	0
Yüzey düzensizlikleri	1
Pannus	2
Tranzisyonel zona yarık	3
Radyal zona yarık	4
Kalsifiye zona yarık	5
Tümör disorganizasyonu	6
Tidemark/ sınır bütünlüğü	
Intakt	0
Kan damarları tarafından geçilmiş	1

Çizelge 11. (devam)

Proteoglikan boyanması	
Normal	0
Hafif azalma	1
Orta derecede azalma	2
Ciddi azalma	3
Hiç boyanmama	4
Hücresellik	
Normal	0
Diffüz hiperselülarite	1
Cloning	2
Hiposelülarite	3

5. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Tez kapsamında üretimi gerçekleştirilen 3 çeşit nanofibere ait PCL/ GEL/HA (FK1), PCL/ GEL/HA + DF-MKH (FK2), PCL/ GEL/HA + DF-MKH + TGFβ-1 (FK3) karakteristik özellikler, mekanik özellikler, biyobozunurluk ve antibakteriyel özelliklere ait analiz sonuçları kapsamında FE-SEM, FTIR, Su temas Açısı, Gözeneklilik, DMA, in vitro biyobozunurluk, ve in vitro kırıldak oluşumu analizleri aşağıda verilmiştir. Ayrıca in vivo deneyler sonrası elde edilen dokuların Histopatolojik incelemeleri ve Mikro CT analizleri verilmiştir.

5.1. FE-SEM Analiz Sonucu

Tezin bu bölümünde üretimi yapılan 4 çeşit nanofiberin hepsinden ölçümler alınarak analiz gerçekleştirilmiştir. SEM analiziyle üretilen nanofiberlerin ortalama çap değerleri, morfolojik yapısı hakkında bilgi alınmıştır.

Elektro-eğirme yöntemi ile üretilen nanofiber yapısında boncuk oluşumu görülmesi büyük sorun teşkil etmektedir (Bülbül 2019). Bu tez çalışması kapsamında üretimi yapılan nanofiber yapıların SEM analizleri incelendiğinde boncuksuz yapıda düzgün fiber oluşumlar elde edildiği görülmüştür. Ayrıca morfolojik yapı analiziyle üretilen nanofiber üzerindeki hücre çoğalması ve yapışması hakkında da önemli bilgiler elde edilmektedir (Chen vd., 2021).

Nanofiberlerin ortalama fiber çapları saf FK1, FK2 ve FK3 Çizelge 12’de verilmiştir.

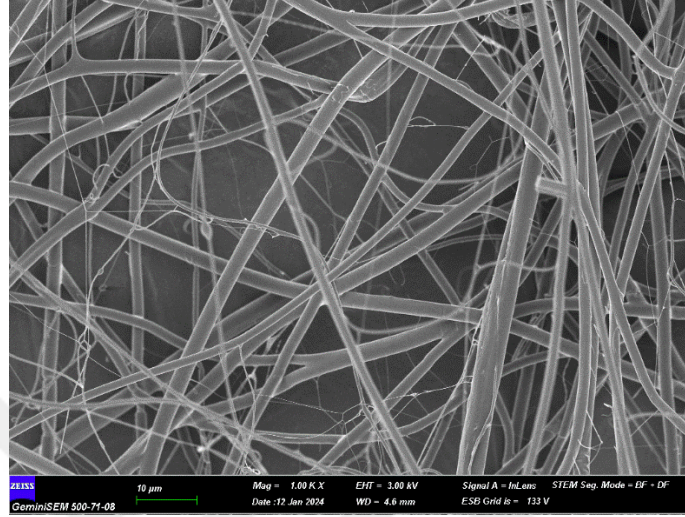
Çizelge 12. Nanofiberlerin ortalama fiber çapları

Nanofiber İçeriği	FK1	FK2	FK3
Ort Fiber Çapı (nm)	245.5	249.9	93.7

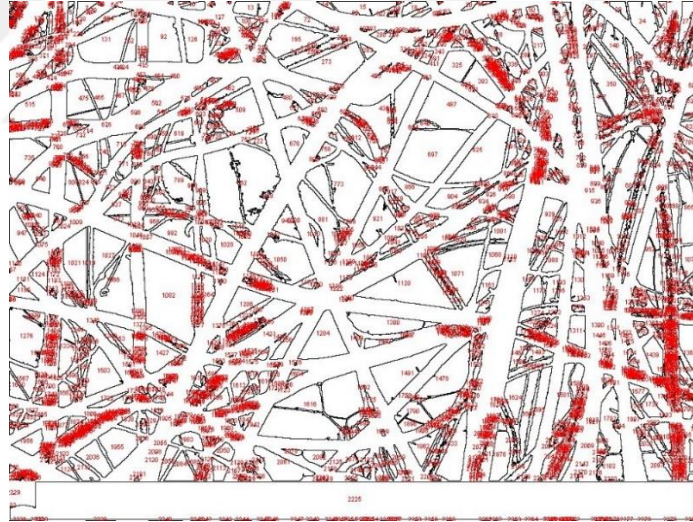
ImageJ programı yardımıyla Nanofiberlerin SEM görüntüleri kullanılarak ve nanofiber çapları belirlendi ve ardından OriginPro programı kullanılarak Nanofiber

aplarının dağılımını gösteren histogram grafikleri çizildi ve ortalama nanofiber çapları hesaplandı.

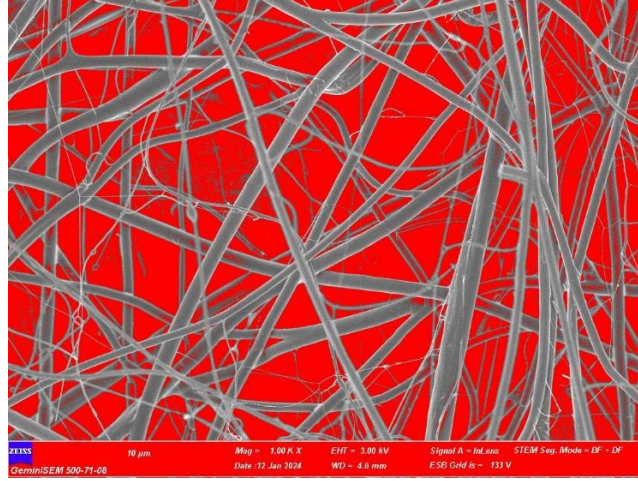
FK1 Nanofiberi için ; sırasıyla SEM görüntüsü, image J resimleri ve origin pro programıyla elde edilen histogramları ve lif çapı ortalamaları verilmiştir (şekil 39-43).



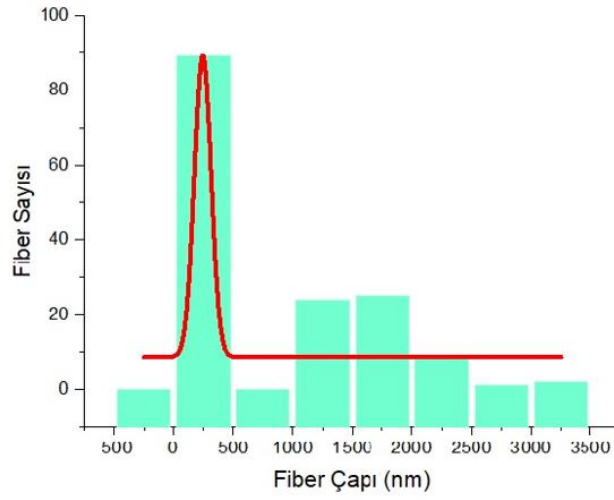
şekil 39. FK1 Nanofiberin FESEM görüntüsü



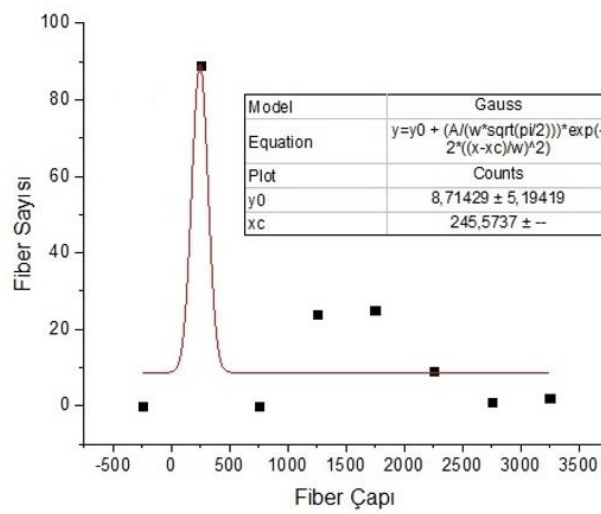
şekil 40. FK1 Nanofiberin IMAGE J programı gözeneklilik görüntüsü



Şekil 41. FK1 Nanofiberin IMAGE J programı gözeneklilik görüntüsü

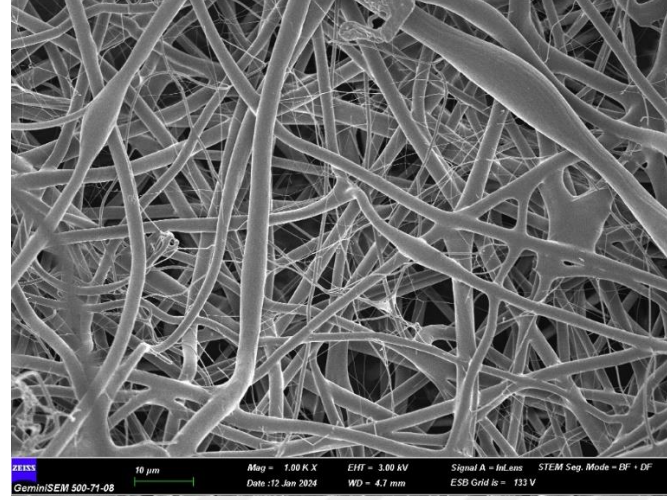


Şekil 42. FK1 Nanofiberin ORIGIN PRO programı lif çapı dağılım histogramı

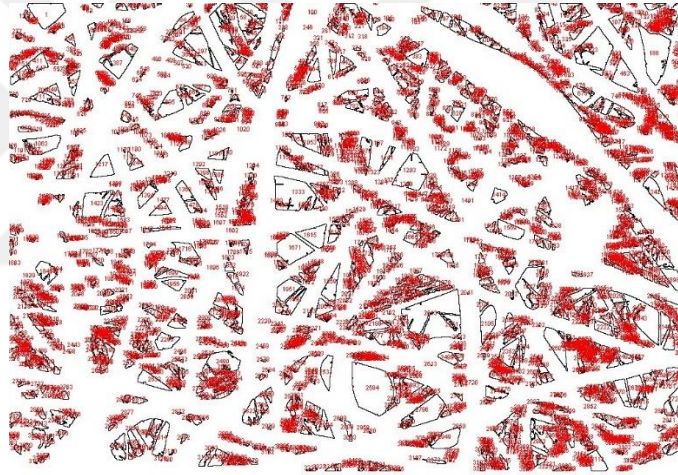


Şekil 43. FK1 Nanofiberin ORIGIN PRO programı lif çapı dağılım eğrisi

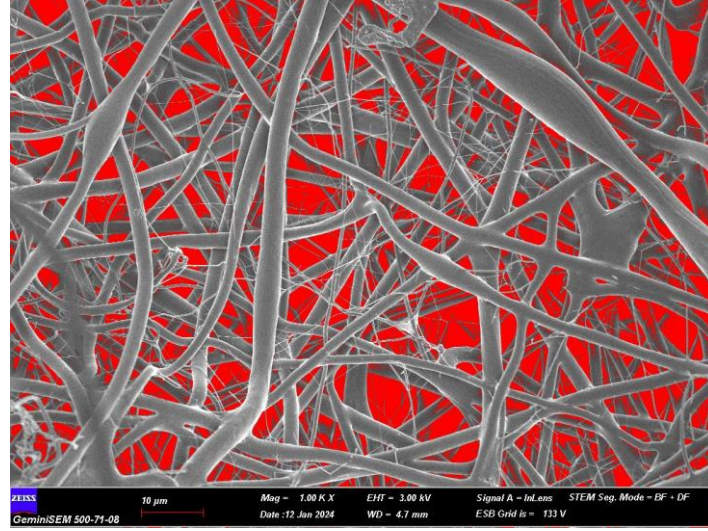
FK2 Nanofiberi ; sırasıyla SEM görüntüsü, image J resimleri ve origin pro programıyla elde edilen histogramları ve lif çapı ortalamaları verilmiştir (Şekil 44-48).



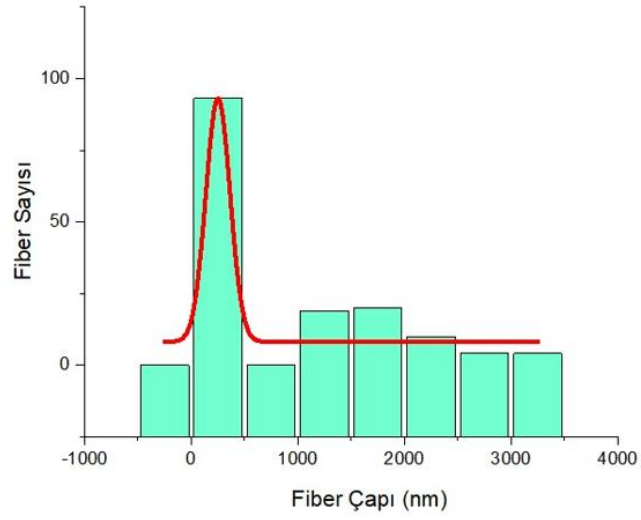
Şekil 44. FK2 Nanofiberin FESEM görüntüsü



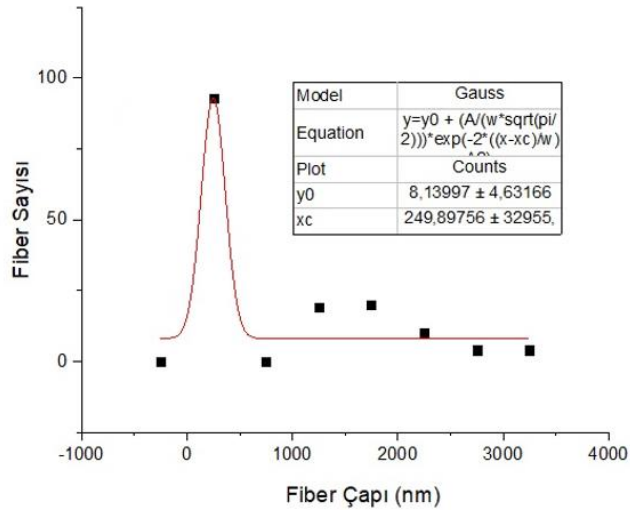
Şekil 45. FK2 Nanofiberin IMAGE J programı gözeneklilik görüntüsü



Şekil 46. FK2 Nanofiberin IMAGE J programı gözeneklilik görüntüsü

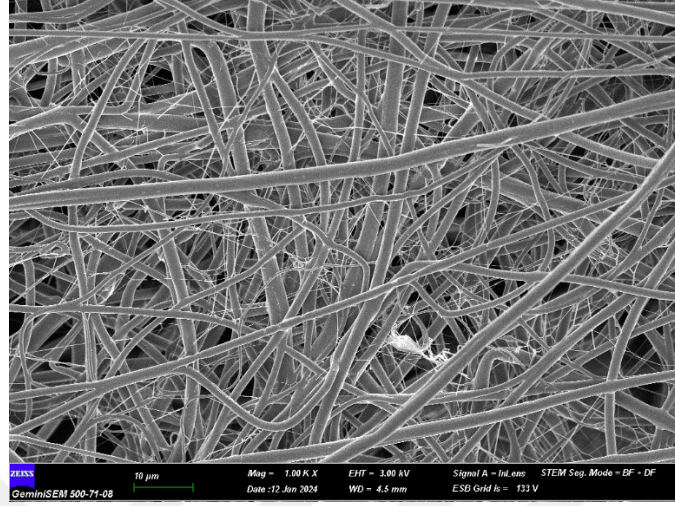


Şekil 47. FK2 Nanofiberin ORIGIN PRO programı lif çapı dağılım histogramı

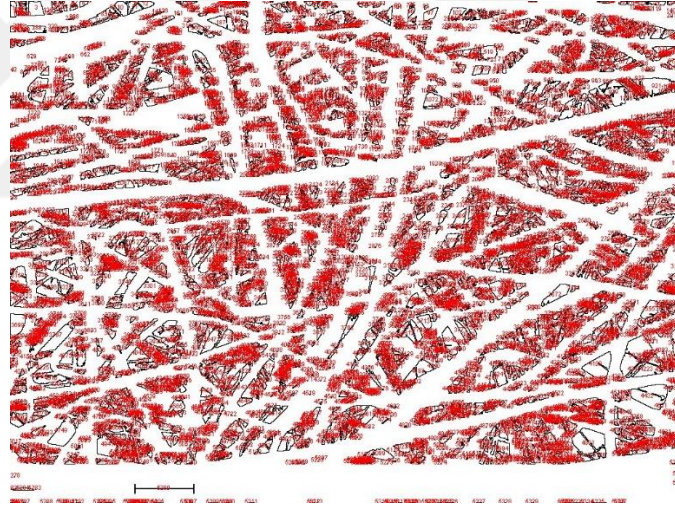


Şekil 48. FK2 Nanofiberin ORIGIN PRO programı lif çapı dağılım eğrisi

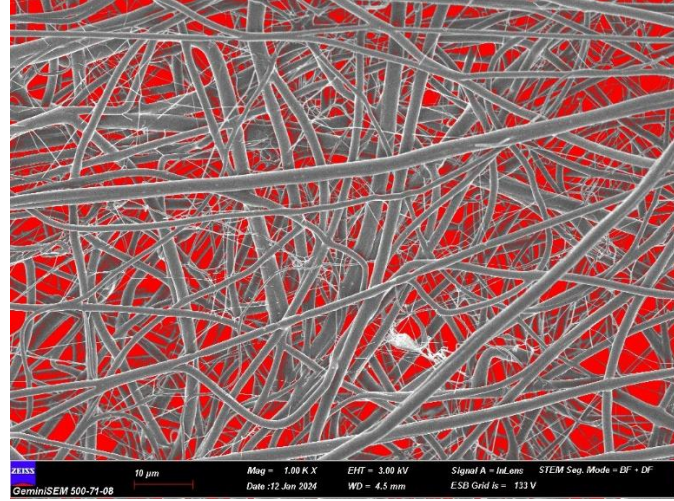
FK3 Nanofiberi ; sırasıyla SEM görüntüsü, image J resimleri ve origin pro programıyla elde edilen histogramları ve lifçapı ortalamaları verilmiştir (Şekil 49-53).



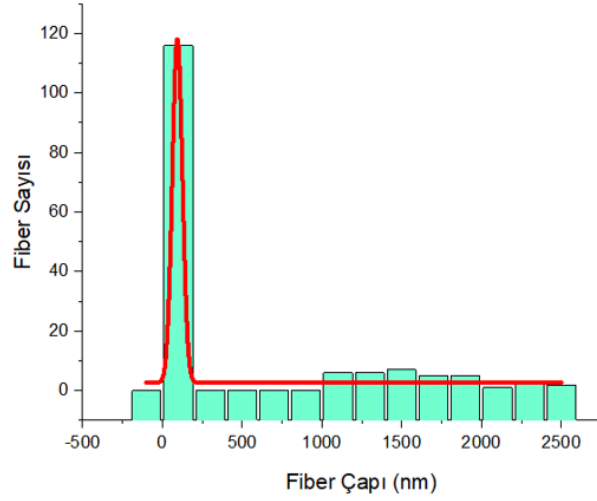
Şekil 49. FK3 Nanofiberin FESEM görüntüsü



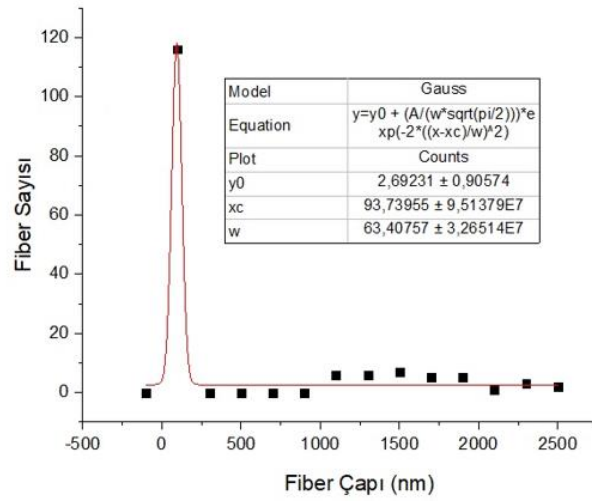
Şekil 50. FK3 Nanofiberin IMAGE J programı gözeneklilik görüntüsü



Şekil 51. FK3 Nanofiberin IMAGE J programı gözeneklilik görüntüsü



Şekil 52. FK3 Nanofiberin ORIGIN PRO programı lif çapı dağılım histogramı



Şekil 53. FK3 Nanofiberin ORIGIN PRO programı lif çapı dağılım eğrisi

Ortalama fiber çapı literatürde yaklaşık 517 ± 198 nm olan PCL fiberlerinin, PCL/GEL nanofiberlerinde 330 ± 110 nm ye düşmesi eklenen jelatine bağlanmıştır. GEL'nin yoğunluğu (1.3 g/cm^3) PCL'den (1.13 g/cm^3) daha yüksek olduğundan, GEL'in PCL çözeltisine eklenmesi optimum viskoz davranışın korunmasına izin vererek iğnenin ucundaki jetin kapiller kararsızlıklarını önlemiştir (Toptaş, 2014).

HA'nın güçlü su tutma yeteneği nedeniyle elektrospinning sırasında nanofiberlerin yetersiz kuruması, elektrospun nanofiberlerin toplayıcıda sorunlu bir şekilde birleşmesine neden olabilir (Hsu, 2010). SEM görüntülerinden gördüğümüz gibi, elektroğirme çözeltisindeki polimer konsantrasyonu, nanofiberin şekli, ortalama çapı ve hatta boncukların oluşumu üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Daha düşük polimer konsantrasyonunun, çekim işlemi sırasında boncuk oluşturma eğiliminde daha fazla olduğu bulunmuştur, çünkü elektrik alanı jet başlatma sırasında düşük viskozite ve dolayısıyla düşük dirençle karşılaşır. Bu, daha fazla miktarda çözeltinin Taylor konisinden patlamasına neden olur ve farklı çaplarda boncuklar olarak toplanır. Bu, sıcaklık ve nem gibi tam olarak kontrol edemediğimiz bazı parametrelerin, nanofiberin çapını büyük ölçüde etkileyebileceği sonucuna ulaşılabilir (Bachimam, 2017). Bu bilgi bazı SEM görüntülerinde gözlemlenen boncuk şeklindeki fiber görünümünün nedenini açıklamamıza yardımcı olmaktadır. Solüsyondaki iletkenliğin HA içeriği ile arttığı düşünülmektedir. HA bir polielektrolittir ve PCL/GEL çözeltisine HA eklenmesi, genellikle asidik koşullarda veya nötr pH'da hidrolize olabilen birçok iyonlanabilir amino grubuna ve karboksil gruplarına sahip olan doğal bir polielektrolittir. Bu durum, iletkenliğin artmasına neden olabilir. PCL, organik bir çözücüde çözündüğünde çözeltide iyon üretmez, diğer yandan doğal bir polielektrolittir ve genellikle asidik koşullarda veya nötr pH'da hidrolize olabilir. Elde edilen nanofiberlerin, HA katkısız nanofiberlere göre daha ince bir nanofiber çapına sahip olduğu gözlemlenmiştir (Unal vd., 2020).

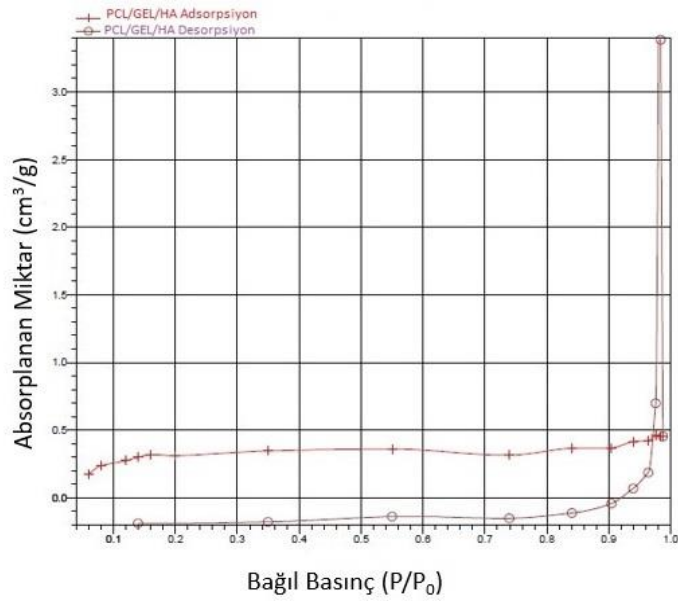
Lif morfolojisinin değerlendirildiğinde, DF-MKH ve TGFβ-1 katkılı nanofiberler (FK2, FK3) ile katkısız PCL/GEL/HA (FK1) nanofiberler arasında lif çapında önemli bir fark olmadığını gözlemlenmiştir (Şekil 54).

Hücre bağlanma için çıkıntı noktaları sağlayan ve genel doku/organ şeklini ve yapısını koruyan ECM yapısal liflerinin çapının genellikle 50 ila 300 nm arasında olduğu bilindiğine göre tez çalışmasında literatürle uyumlu bir şekilde DF-MKH ve TGFβ-1

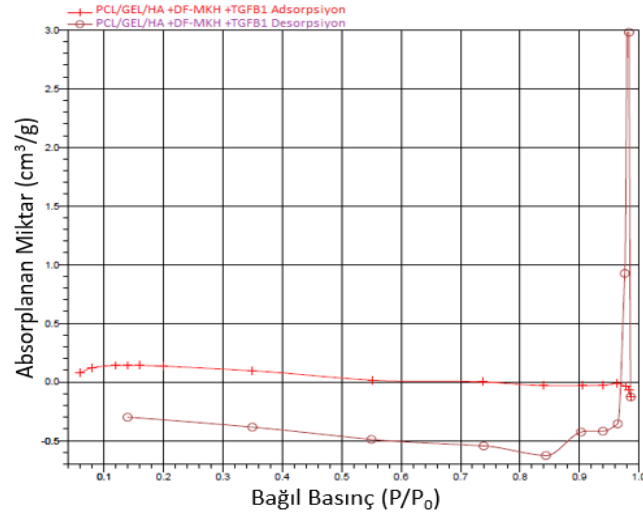
varlığında nanofiberler kıkırdak doku rejenerasyonu için istenilen özelliktedir (Martin vd., 2021).

5.2. BET Gözeneklilik Analiz Sonucu

BET ölçümü, bağıl basınç (relative pressure, P/P_0) ve bu basınç değerlerinde absorbe edilen azot gazı hacmine (cc/g) göre doğrusal bir grafik verir. Bu grafikten de numunenin yüzey alanını direk olarak belirlenir. Şekil 61-62’de nanofiberlerin BET grafikleri verilmiştir. Şekildeki grafikler sırasıyla FK1 ve FK3 nanofiberlerine aittir.



Şekil 54. FK1 nanofiberinin izoterm grafiği



Şekil 55. FK3 nanofiberinin izoterm grafiği

PCL/GEL/HA (FK1): Belirgin bir platoya sahip olmayan, adsorbat-adsorbent etkileşimlerinin zayıf olduğunu veya malzemenin gözeneksiz olduğunu gösteren tip III bir izoterm gösterir. PCL/GEL/HA + DF-MKH + TGFβ-1 (FK3): Histeresi olan tip IV davranışı sergiler, bu da malzemenin mezogözenekli olduğunu karakteristiğidir.

FK3 örneğinin, FK1'e göre daha büyük gözenek boyutlarına ve gözenek hacimlerine sahip olduğunu gösteriyor. Gözenek boyutları arttıkça, gözenek hacmi azalmakta; bu da büyük gözeneklerin toplam hacminin küçük gözeneklere kıyasla daha az olduğunu belirtiyor. TGFβ-1 katkısının, malzemenin gözeneklilik özelliklerini belirgin şekilde değiştirdiği anlaşıyor; bu da TGFβ-1'in malzeme yapısını etkileyerek daha büyük gözenekler oluşturduğunu gösterebilir.

Nanofiberli yüzeylerin, geniş yüzey alanına ve nano gözenekli bir yapıya sahip olması en önemli özellikleri arasında sayılmaktadır. Nanofiberli yüzeylerin yüzey alanı ve gözeneklilik test sonuçları incelendiğinde; nanofiberli yüzeylerde, yüzey alanının biyolojik ajanlar katkılanması sonrasında arttığı görülmüştür. Ayrıca, katkılanma sonrasında gözenek boyutları ile birlikte gözenek hacimleri de artmıştır.

İzotermilerin IUPAC sınıflandırmasına göre, 2 nm'yi aşmayan bir çapa sahip gözenekler mikro gözenekler olarak tanımlanmaktadır. 2 ile 50 nm arasında gözenek çapına sahip olanlar mezopor olarak adlandırılmaktadır (Alothman, 2012). Ayrıca mikro gözenekler, ultramikroporlar (genişlik <0,5 nm) ve supermikroporlar (1-2 nm'den genişlik) olarak kategorize edilebilirler (XinYing vd., 2013).

BET yüzey alanları, spesifik yüzey alanları, ortalama gözenek çapı ve BET ve BJH yöntemleri ile hesaplanan nanofiberlere ait ortalama gözenek hacmi Çizelge 13’de özetlenmiştir.

Nanofiberlerin gözenek çapları, 2-6 nm aralığında olup literatür ile uyumludur (Behere vd., 2021).

Çizelge 13. Nanofiberlerin BET ananliz sonuçları

Numune	Örnek Açıklaması	Emilim ortalama gözenek boyutu (4V/A)	Yayılım ortalama gözenek boyutu	BJH Emilim ortalama gözenek genişliği	BJH Yayılım ortalama gözenek genişliği	Tek Nokta Yüzey Alanı (at p/p°= 0,349, m ² /g)	BET Yüzey Alanı (m ² /g)	t-Plot Dış Yüzey Alanı (m ² /g)	BJH Emilim Gözeneklerin Kümülatif Yüzey Alanı
FK1	PCL/G EL/H A	2,8757	21,433 2	14,431 0	83,367 8	0,9802	0,9772	1,4441	0,056
FK3	PCL/G EL/H A +DF- MKH +TGF β-1	4,0396	75,069 4	24,077 8	71,982 3	0,2688	0,2455	0,2508	0,237

Matematiksel modeller ve deneysel sonuçlar kullanılarak, araştırmacılar 3 boyutlu elektrospon matrikslerde lif çapı ile gözenek hacmi arasındaki ilişkileri tanımlamışlardır. Örneğin, Eichhorn ve ark., hücre yapışmasına uygun olan lif fraksiyonu ve hücrelerin büyümesi için gözenek boyutu ve dağılımı gibi iki değişken kullanmışlardır. Modelleri, daha büyük lif çapının gözenek boyutundaki artışla ilişkili

olduğunu öngörmektedir, bu da PCL dahil çeşitli polimerler için elde edilen deneysel verilerle uyumludur (Eichhorn ve Sampson, 2005).

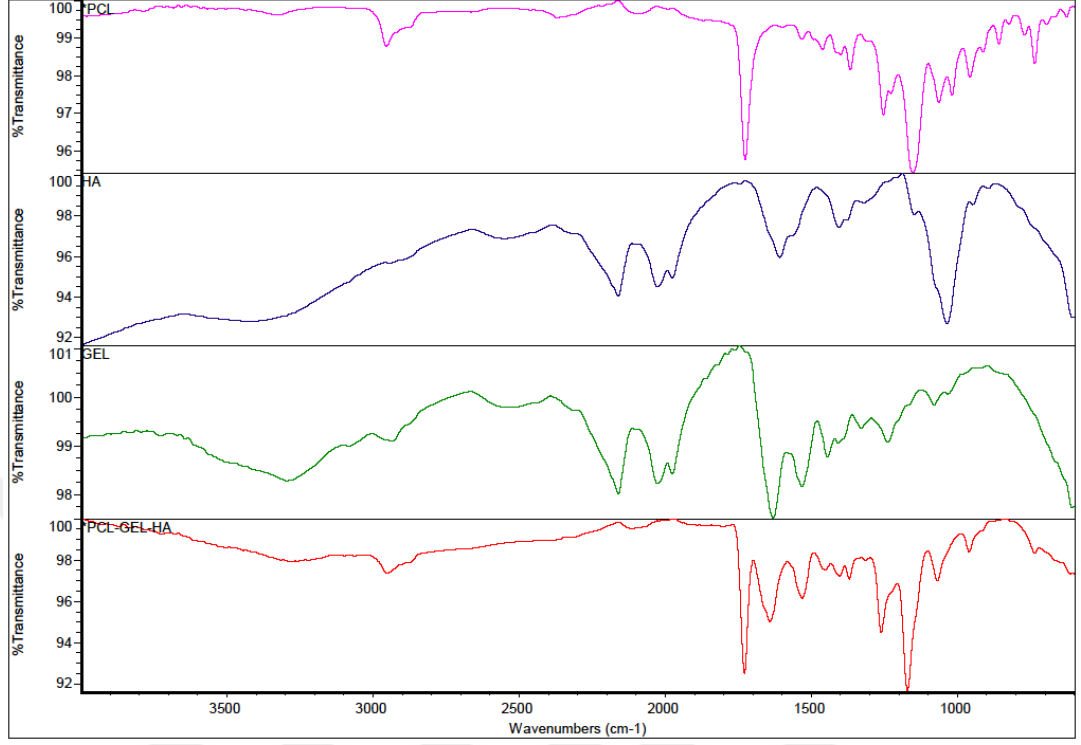
Lif çapının bazı yüzey özelliklerini belirlediği bilinmektedir, bu da özellikle lif çapının artmasıyla matriksin gözenek boyutunun artması (Telemeco vd., 2005) ve yüzey pürüzlülüğünün artması (Xu vd., 2004) olarak açıklanabilir. Bu bağlamda, Milleret ve meslektaşları daha küçük liflere sahip matrikslerin, daha büyük liflerden oluşan matrikslere kıyasla daha küçük pıhtılaşma aktivasyonu ve daha az trombosit yapışmasına neden olduğunu rapor etmişlerdir (Milleret vd., 2012). Elektroeğirme parametrelerinin lif çapını, gözenek boyutunu ve matriks pürüzlülüğünü büyük ölçüde etkilediğini ancak bu parametrelerin doku mühendisliği uygulamaları için ayarlanabileceğini belirtmektedirler.

5.3. FTIR Analiz Sonucu

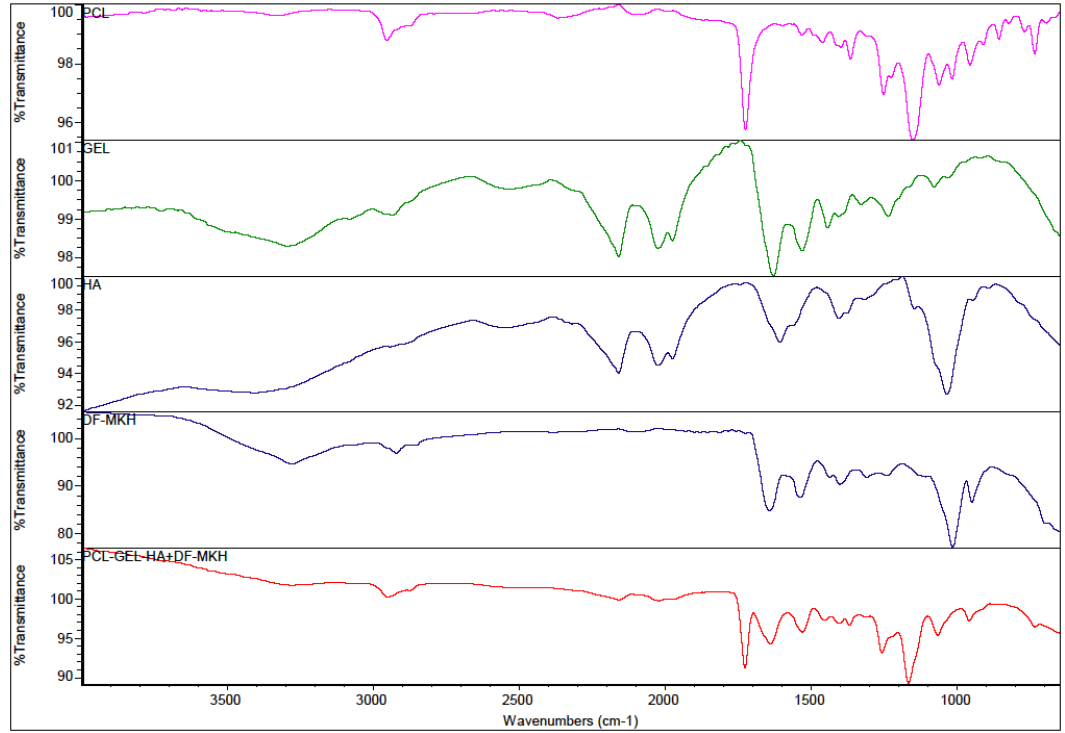
FK1, FK2 ve FK3 nanofiberlerin FTIR analizi yapıp numunelere ait fonksiyonel gruplar tespit edilerek kimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 55-57).

Nanofiberlerin FTIR spektrumları Şekil 58’de gösterilmiştir. PCL spektrumu, 2940 cm^{-1} ’de CH_2 germe, 2866 cm^{-1} ’de CH_2 germe, 734 cm^{-1} ’de CH_2 germe, 1720 cm^{-1} ’de $\text{C}=\text{O}$ germe, 1241 cm^{-1} ’de $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ germe ve 1162 cm^{-1} ’de $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ germe, 1046 cm^{-1} ’de $\text{O}-\text{C}$ germe ve 961 cm^{-1} ’de $\text{O}-\text{C}$ germe olmak üzere güçlü bantlar gösterir (Elzein vd., 2004). HA’nın amin ve karboksilik gruplar için pikleri 2160, 1607 ve 1035 cm^{-1} gösterir. PCL matriksine GEL ve HA eklenmesi, 3294 cm^{-1} ’de amine bağlarının N-H gerilmesine, 1647 cm^{-1} ’de $\text{C}=\text{O}$ germe ve 1543 cm^{-1} ’de amit bağlarının N-H bükülme ve C-N germe kombinasyonuna atfedilen proteinle ilgili bantların ortaya çıkmasına neden olur (Gautam vd., 2013). PCL/GEL/HA matrikslerinde orijinal absorpsiyon bantlarından bir kayma gözlemlenir, bu da PCL’nin ester grubu ile GEL ve HA’in amin grubu arasında olası bir hidrojen bağı olabileceğini düşündürür. PCL’nin $\text{C}=\text{O}$ germe ve $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ germe ile ilgili karakteristik bandı, orijinal olarak 1720 ve 1162 cm^{-1} ’de bulunan, PCL/GEL/HA matrikslerinde sırasıyla 1728 ve 1160 cm^{-1} ’de bulundu. Benzer şekilde, GEL’nin germe ve $\text{C}=\text{O}$ germe ve N-H bükülme ve C-N germe kombinasyonuna atfedilen karakteristik amit bantları, orijinal olarak 1624 ve 1532 cm^{-1}

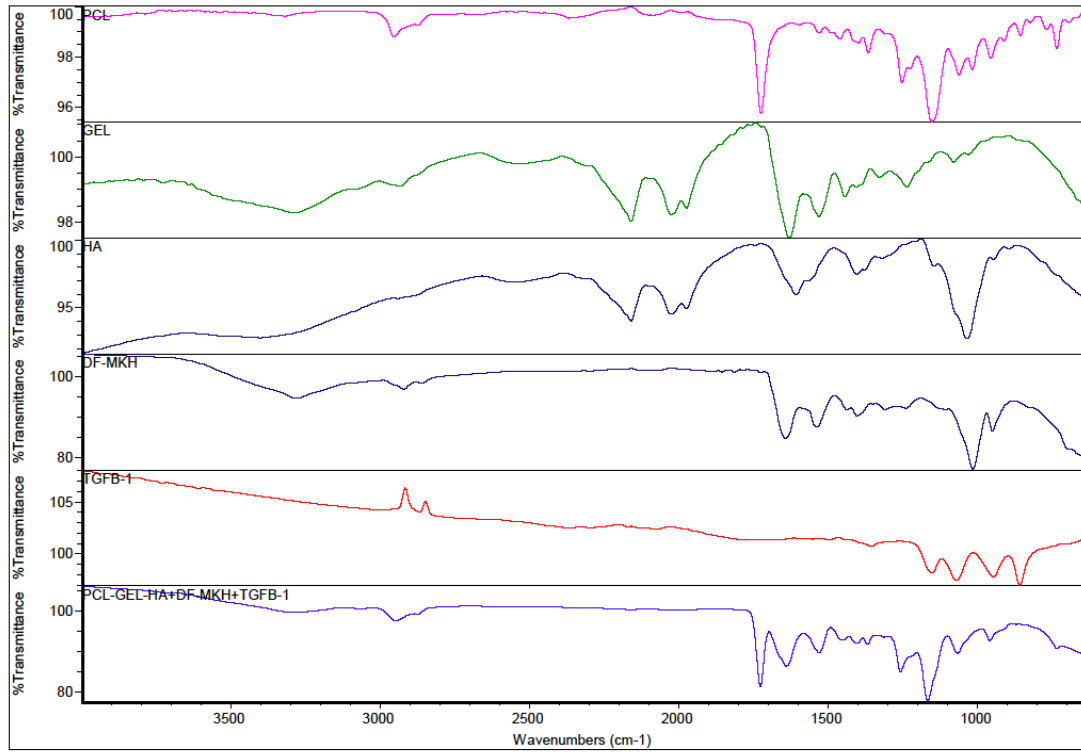
¹'de bulunan, 1630 ve 1531 cm^{-1} civarına kaydı. Benzer sonuçlar daha önce bildirilmiştir (Lee vd., 2016).



Şekil 56. PCL, GEL ve HA ile FK1 nanofiberin yapıların FTIR spektrumları



Şekil 57. PCL, GEL, HA ve DF-MKH ile FK2 nanofiberin yapıların FTIR spektrumları



Şekil 58. PCL, GEL, HA, DF-MKH ve TGFβ-1 ile FK3 nanofiberin yapıların FTIR spektrumları

Çizelge 14. PCL, GEL ve HA ile FK1, FK2 ve FK3 nanofiberlerin katı formda FTIR spektrumları

Örnek	Dalga boyu (cm ⁻¹)		Açıklama
	Literatür	Bu çalışma	
PCL	2940	2953	Asimetrik CH ₂ gerilmesi
	2866	2370	-C=O titreşimi
	1720	1725	Karbonil gerilmesi
	1294	1366	C-O C-C gerilmesi

Çizelge 14. (devam)

	1241	1253	Asimetrik C-O-C gerilmesi
	1162	1152	Simetrik C-O-C gerilmesi
GEL	1624	1630	C-O gerilme titreşimi, Amide I
	1532	1531	N-H eğilme titreşimi
	1446	1444	C-H eğilme titreşimi
	1332	1329	C-H gerilme titreşimi
	1240	1237	N-H Bend
	1540	1529 (Overlap)	Amide II
HA	2432	2160	-OH/- NH ₂
	1639	1607	Amide II gerilme titreşimi
	1042	1035	C=OH titreşimi

Çizelge 14. (devam)

FK1	3281	Asimetrik CH ₂ gerilmesi
	2951	-C=O titreşimi
	2115	Karbonil gerilmesi
	1728	C-O gerilme titreşimi, Amide
	1641	N-H eğilme titreşimi
	1260	Asimetrik C-O-C gerilmesi
	1170	Simetrik C-O-C gerilmesi
FK2	2951	-C=O titreşimi
	1727	Karbonil gerilmesi
	1640	C-O C-C gerilmesi
	1258	Asimetrik C-O-C gerilmesi

Çizelge 14. (devam)

	1167	Simetrik C-O-C gerilmesi
	959	-OH/- NH ₂
	1581	Amide I gerilme titreşimi
	1067	Amide II gerilme titreşimi
FK3	2950	N-H eğilme titreşimi, Amide II
	1727	C-H eğilme titreşimi
	1640	C-H gerilme titreşimi
	1258	-OH/- NH ₂
	1167	Amide II gerilme titreşimi

FTIR analizleri, HA, GEL, PCL, FK1, FK2, FK3'ün moleküler yapısını belirlemek için kullanıldı. PCL ile ilgili kızılötesi spektrumlar, FK1, FK2, FK3 nanofiberlerin eğrilerinde gözlemlendi ve Grafik 2'de gösterildi. PCL spektrumu, bir dizi

karakteristik pik içeriyordu: 1253.29 cm^{-1} ve 1152.70 cm^{-1} CH_2 asimetrik ve simetrik germe titreşimleri ile ilişkilidir; 1725.80 cm^{-1} karboksil gruplardaki C=O germe titreşimini gösterir; 2953.83 cm^{-1} ve 3320.52 cm^{-1} C-O-C asimetrik ve simetrik germe titreşimlerini temsil eder (Coimbra vd., 2017). Jelatinle ilgili karakteristik bantlar, sırasıyla C=O germe titreşimi, N-H düzlem bükülmesi ve C-N germe titreşimi ile ilgili çiftleşme ve N-H germe titreşimi ile ilişkilidir (Ren vd., 2017).

HA için tipik bantlar, hidrojen bağlı O-H germe titreşimi, C-O-C germe titreşimi ve karboksilat (COO^-) asimetrik germe titreşimi olan sırasıyla 2160.55 cm^{-1} 1035.52 cm^{-1} ve 1607.14 cm^{-1} 'de bulunmuştur (Entekhabi vd., 2016). Xue ve meslektaşları tarafından yapılan bir çalışmaya göre, asetik asidin varlığı ile PCL ve jelatin arasındaki zincir karışıklığı ve hidrojen etkileşimi artar (Jiang vd., 2017). FTIR spektrumu, PCL/jelatin matrislere kıyasla PCL/GEL/HA (FK1) nanofiberlerde amit I pozisyonunun daha yüksek bir dalga sayısına doğru kaydığını doğrulanmıştır. Birçok araştırmacı, matris içinde PCL'nin ester grubu ile jelatin moleküllerinin amin grubu arasında bir hidrojen bağı etkileşimi olabileceğini belirtmektedir (Gil-Castell vd., 2020). PCL, jelatin ve HA'nın tüm karakteristik pikleri, PCL/GEL/HA nanofiberlerin spektrumlarında tespit edildi, bu da polimerlerin nanofiberlerin yapısında bulunduğunu göstermektedir.

Çizelge 14'te PCL, GEL ve HA ile FK1, FK2, FK3 nanofiberlerin FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi ile elde edilen pikler ve açıklamaları literatürle karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Literatürle uyumlu bir şekilde FTIR spektrum analizi gerçekleştirilmiş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir (Gautam vd., 2013). DF-MKH ve TGF β -1 katkılı nanofiberlere ait FTIR görüntüsü ile saf PCL/GEL/HA (FK1) nanofiber görüntüsü benzer bir dağılım göstermiştir. Böylece fonksiyonel gruplarda herhangi bir bozulma meydana gelmeden polimer ve DF-MKH, TGF β -1 arasında bir kovalent bağ oluşumuyla sonuçlanmıştır.

5.4. Su Temas Açısı Analiz Sonucu

Temas açısı ölçümüyle üretilen nanofiber malzemenin yüzey ıslanabilirlik analizi gerçekleştirilmiştir. Su temas açısının 90° üzerinde bir sonuç vermesi numunenin hidrofobik (ıslatmaz) yapıda olduğuna, 90° altındaki sonuçlar numunenin hidrofilik

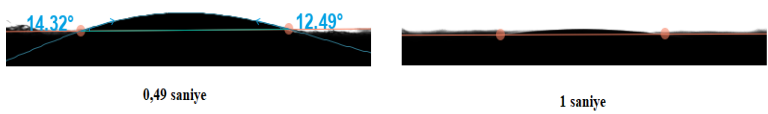
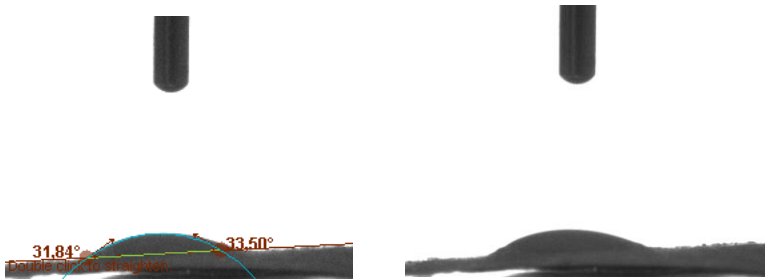
(ıslatma) bir yapı sergilediğini gösterir. Ayrıca temas açısı 140° 'den büyükse süper hidrofobik ve temas açısı 0° 'ye çok yakınsa süper hidrofilik yapı gösterir (Aydar vd., 2014).

Temas açısı ölçümü Biolin Scientific Attension – Theta Lite cihazı ile nanofiberlerden uygun boyutlarda kesilip üzerine mikropipet yardımıyla 5 μ l hacminde su damlatılarak gerçekleştirilmiştir. Böylece malzemenin hidrofiliklik konusunda bilgi sağlanmıştır. Üretilen nanofiberlere ait su temas açısı değerleri Çizelge 15'te, temas açısına ait görseller de Çizelge 16'da verilmiştir.

Çizelge 15. Nanofiberlere ait su temas açısı ölçüm sonuçları

Su Temas Açısı Ölçümü	
Nanofiber	Temas Açısı ($^\circ$)
PCL/GEL	14,32
FK3	33,50

Çizelge 16. Sırasıyla PCL/GEL nanofiber ve FK3 Nanofiberlere ait su temas açısı

PCL/GEL	
FK3	

Literatüre bakıldığında doku mühendisliği alanında kullanılan matrikslerinin yüzey hidrofiliğinin çok önemli bir parametre olduğu görülmektedir. Hidrofilik özelliğe sahip bir matriks üzerine ekimi yapılan hücrelerin yayılması, matrikse bağlanması ve hücre çoğalması konusunda yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Li vd., 2016).

PCL'nin 100-135° arasında değişen su temas açısı ile hidrofobik özellikte olduğu bilinmektedir (Feng vd., 2012). Jelatin (GEL), kolajen hidrolizinden elde edilen bir protein olup PCL'nin hidrofiliğini artırmak için kullanılmıştır (Hoang Thi vd., 2016). Örneğin, Fee ve ark. PCL ve GEL'i karıştırmış ve elde edilen matriks, sadece PCL'den yapılmış olan matriksten daha düşük bir su temas açısı göstermiştir (Fee vd., 2016). Benzer şekilde, PCL ve jelatinin birlikte elektrospinning ile oluşturduğu nanofiberler, mekanik dayanıklılığını koruma konusunda başarılı olmuştur (Yang vd., 2016). Ayrıca, birçok çalışma, Jelatin'in hücre çoğalmasını artırabilme yeteneğini göstermiştir (Mashhadikhan vd., 2015).

Tez çalışmasında üretimi yapılan nanofiber matrikslerde su temas açısı profili dolayısıyla malzemenin hidrofilik hidrofobik özelliği incelenmiştir. Çalışma sonucunda temas açılarına bakıldığında malzemenin hidrofilik özelliğe sahip olduğu görülmüştür. Aynı zamanda malzemenin sağladığı bu hidrofilik özellik sayesinde üretimi yapılan nanofiberin, matriks içerisinde bulunan hücrelerin yayılması ve hücre çoğalması konusunda yardımcı olabileceği dolayısıyla kıkırdak doku iskelesi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

5.5. DMA Mekanik Analiz Sonucu

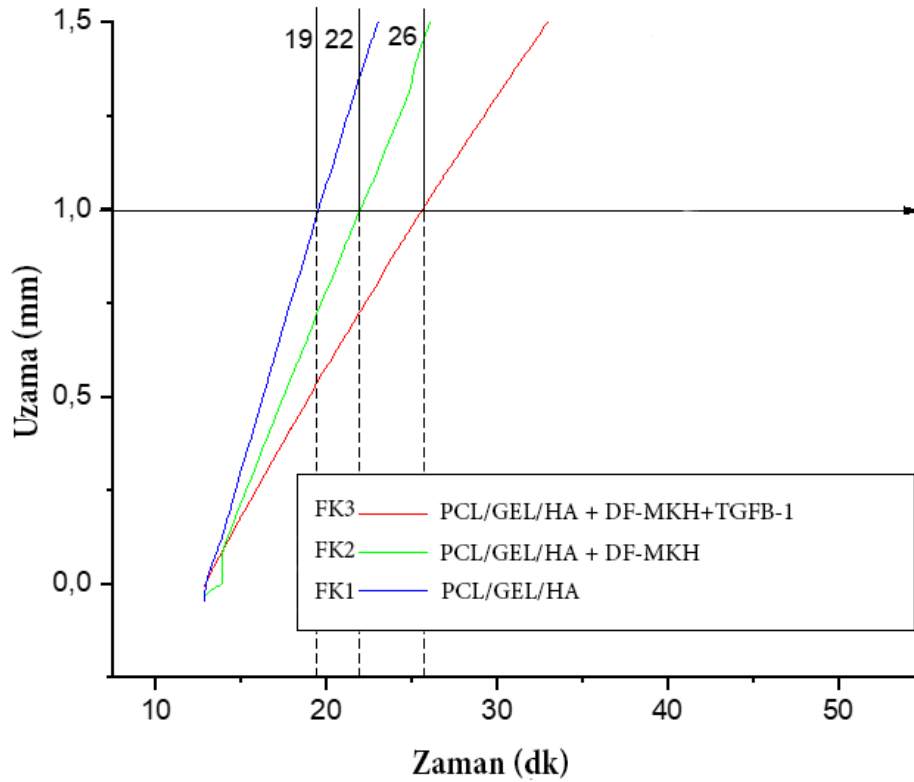
Kıkırdak doku mühendisliği alanında kullanılmak üzere üretimi gerçekleştirilen nanofiberlerin mekanik analizi gerçekleştirilmiştir. Kıkırdak, sürekli olarak mekanik uyarılara maruz kalan bir doku olarak bilinindiğinden bu bölge için gerçekleştirilecek bir biyomalzemenin mekanik özelliklerinin çok iyi olması gerekmektedir (Mabvuure vd., 2012).

Tek fazlı homojen matriksler, kıkırdak yapısının tam olarak taklit edilmesini sağlayamaz veya yeni doku oluşana kadar hasar bölgesindeki mekanik streslere dayanamaz. Doğal ve sentetik materyallerle ilişkilendirilen dezavantajlar, iki veya daha fazla polimerin tek bir malzeme içinde birleştirilmesi ile aşılabilmektedir. Birden

fazla polimerin kullanılması, matris malzemesinin doğal dokularla etkileşimini artırabilir ve bu nedenle kıkırdak rejenerasyonunu geliştirebilir (Yoo vd., 2005).

Fiziko-mekanik özellikleri, termal özellikleri (T_g, kristalizasyon, erime ve ayrışma noktası) ve gerilme özellikleri, gerilme mukavemeti ve uzama verimleri açısından karşılaştırılarak incelenmiş birçok biyobozunur polimerlerden PCL'nin daha avantajlı olduğu rapor edilmiştir (Ahmed ve Hincke, 2014).

Grafikteki malzemelerin analizi, her bir malzemenin elastik ve plastik davranışlarının farklılıklarını gösterir. Örneğin, FK1 nanofiberi diğerlerine göre daha esnek bir davranış sergilerken, FK3 nanofiberi daha dayanıklı bir yapıya işaret edebilir. Nanofiberler benzer davranışlar sergiler, ancak farklı esneklik derecelerine sahip olarak bulunmuştur ve literatürle uyumludur (Jiang vd., 2017).



Şekil 59. Nanofiberlerin zamana göre esneme grafiği

Grafik, uzama ve zaman arasındaki ilişkiyi gösteren bir gerilme testinin sonuçlarını sunar. Üç nanofiberin mekanik davranışları incelenmiştir (Şekil 60). Kırmızı eğri FK3 (PCL/GEL/HA + DF-MKH + TGFβ-1), belirli bir eşiğe ulaştıktan sonra daha az deforme olurken, yeşil eğri FK2 (PCL/GEL/HA + DF-MKH) daha yavaş bir şekilde deformasyon gösterir. Mavi eğri FK1 (PCL/GEL/HA), neredeyse aynı başlangıç

esnekliğine sahip olmasına rağmen, zamanla daha az deformasyon gösterir. En sert malzeme, en yüksek eğime sahip olanıdır. Bu durumda, kırmızı eğri (FK1) en sert gibi görünüyor çünkü grafikte referans olarak alınan 1 mm yerdeğiştirme değerine en geç ulaşıyor.

5.6. İn Vitro Biyobozunurluk Analiz Sonucu

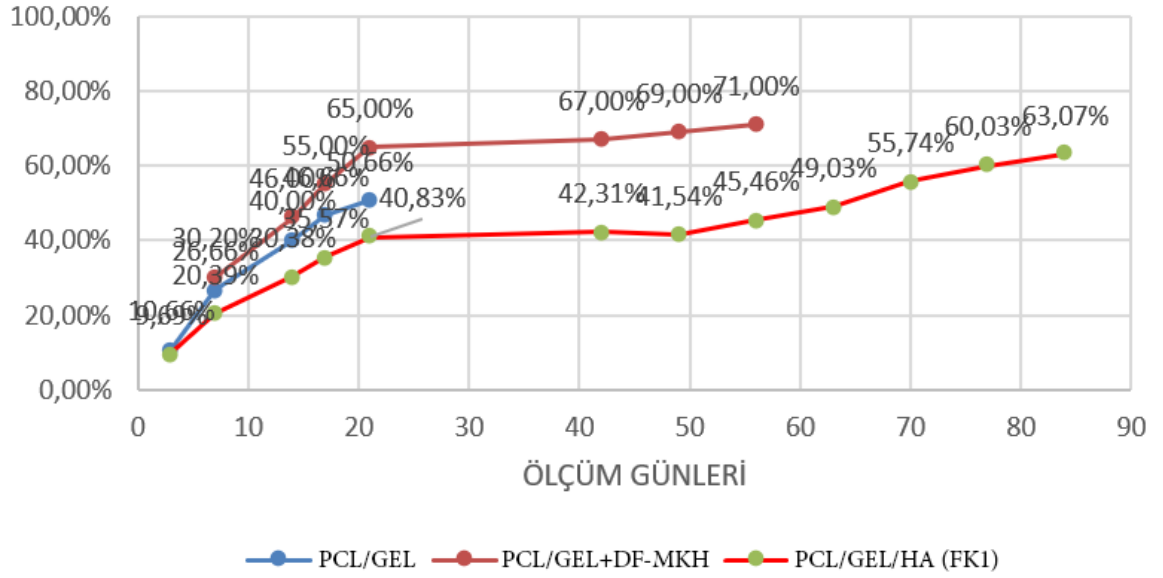
FK1 nanofiberlerinden alınan numunelerin biyobozunurluk analizi gerçekleştirilmiştir. Böylece numunelerin in vitro ortam koşullarında bozunma oranları hakkında bilgi sağlanılmıştır.

Biyobozunurluk analizi toplamda 12 hafta sürmüştür. Numuneler hazırlanarak işlem öncesindeki ağırlıkları ölçülmüştür. Daha sonra bağışçıdan alınan kanın santrifüjlenmesiyle elde edilen kan plazması içerisine 1 hafta boyunca bekletilmek için bırakılmıştır. Her hafta sonunda plazmadan çıkarılmış ve 1 gün boyunca 37°C’de etüvde kurutma işlemi gerçekleştirilmiş ve her hafta sonunda ağırlıkları kaydedilmiştir. Buna göre ağırlık kayıpları hesaplanmış ve ön çalışmalar olan PCL/GEL ve PCL/GEL/DF-MKH nanofiberleriyle birlikte Şekil 59’da verilmiştir.

Şekil incelendiğinde ağırlık kaybının en yüksek PCL/ GEL nanofiber numuneye ait olduğu görülmektedir. PCL/GEL yapısına eklenen HA katkısıyla bozunurluk yüzdeleri düşürülmüş ve malzemenin ağırlık kaybı en aza indirilmiştir. Ağırlık kaybının düşük olması HA katkısının malzemenin daha yavaş bozunma göstermesine neden olduğu görülmektedir.

Yapılan çalışmada HA katkısıyla PCL/GEL’in bu bozunma süresi daha da uzatılmıştır. Böylece uzun süreli kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında kullanımlarının uygun olacağı düşünülmektedir.

PLAZMA BOZUNMA



Şekil 60. Numunelerin zamana bağlı ağırlık kayıpları

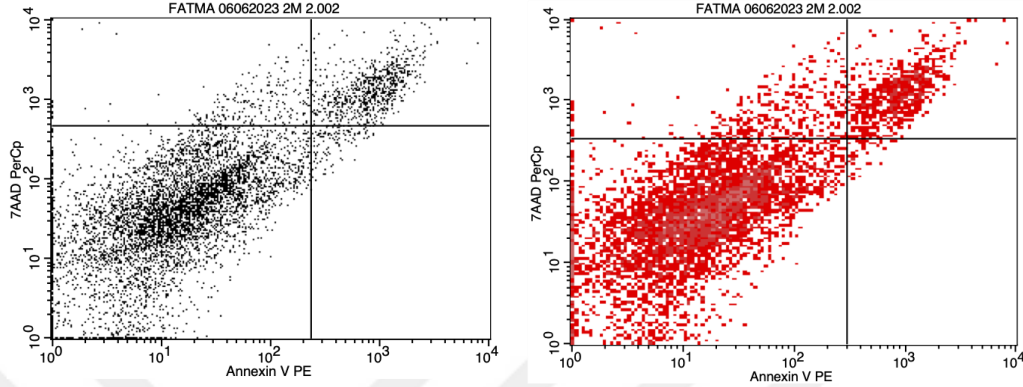
5.7. Hücre Canlılık Analiz Sonucu

Hücre canlılık analizi ile nanofiberlere yüklenen DF-MKH'lerin canlılık oranını analiz etmek için nanofiberlere kit solüsyonu eklenerek flow sitometri cihazında analiz edildi. İzole edilen DF-MKH'lerin kök hücre karakteri taşıyıp taşımadığını analiz etmek için hücre pozitif yüzey belirteçleri flow sitometri cihazında ve farklılaşma potansiyelleri stimüle edici besiyerleri ve boyamalar ile gerçekleştirilmiştir.

DF-MKH yüzey belirteçleri: Pasajdaki hücreler için akım sitometri cihazı ile uygun antikorlar ile yapılmıştır. Kısaca, 2×10^5 hücre, tripsinizasyondan sonra iki kez PBS ile yıkanarak hücreler 4°C 'de karanlıkta 30 dakika boyunca $200\mu\text{L}$ PBS içinde floresan izotiyosiyanat (FITC), fikoeritrin (PE) veya allofikosiyenin (APC) ile konjüge edilmiş spesifik bir monoklonal antikor ile inkübe edilmiştir. Hücre yüzeyi belirteçleri daha sonra akış sitometrisi (BD Accuri C6 Plus) ile analiz edilmiştir. Pozitif yüzey belirteçleri için: CD29, CD73, CD90, CD105 analizi (anti-CD29, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105), negatif yüzey belirteçleri için: CD28, CD14, CD34, HLA-DR

analizi (anti-CD28, anti-CD14, anti-CD34, anti-HLA-DR) (BD Biosciences) antikorları kullanılarak yapılmıştır.

Sol alt kadrantdaki hücreler canlı hücre olarak belirlendi (Şekil 63). Canlı hücre oranı yüzde % 83.81 olarak ifade edildi (Çizelge 17).



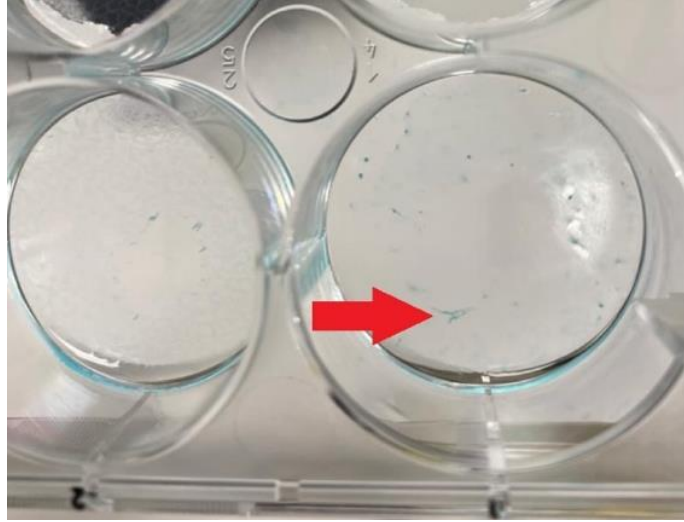
Şekil 61. FK2 Nanofiberin canlılık analizi grafiği

Çizelge 17. FK2 Nanofiberin canlılık analizi tablosu

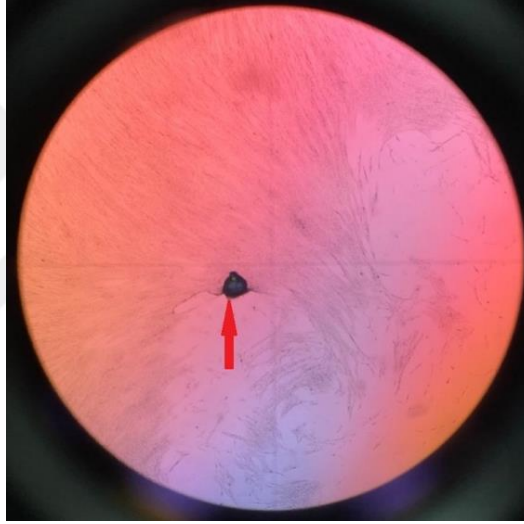
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	239	3.50	3.50	87.66	57.31	1165.60	923.35
UR	741	10.86	10.86	979.98	829.59	1687.82	1380.66
LL	5720	83.81	83.81	24.27	11.98	65.44	32.77
LR	125	1.83	1.83	412.63	386.28	304.22	282.43

5.8. Kondrojenik Farklılaşma Analiz Sonucu

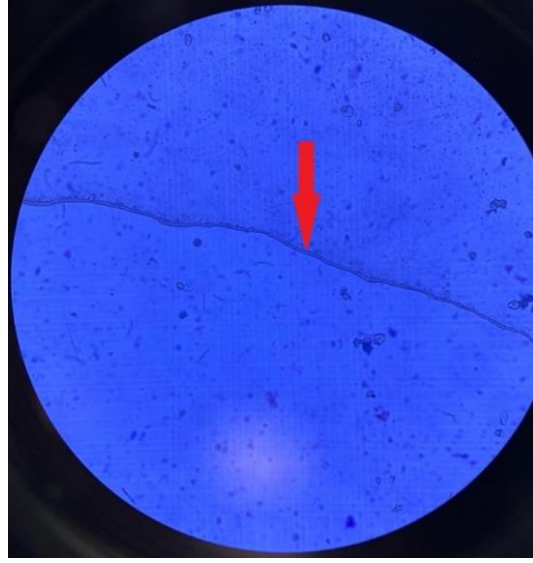
DF-MKH'ler 6 kuyucuklu plaklara ekilerek (1×10^5 hücre/ml) 3 hafta boyunca kondrojenik indüksiyon ortamında (StemPro, Thermofisher) kültürlenmiştir. Kondrojenik indüksiyon ortamı da her 3 günde bir besiyeri ile tazelenmiştir (Şekil 64). Tabanda yapışan hücreler daha sonra %10 formaldehid ile sabitlenerek Alcian mavisi ile boyanmıştır. Kondrositler çekirdekleri mavi boyalı ve kartilaj oluşumu koyu mavi renkte farklılaşan hücreler, ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir (Şekil 65-67).



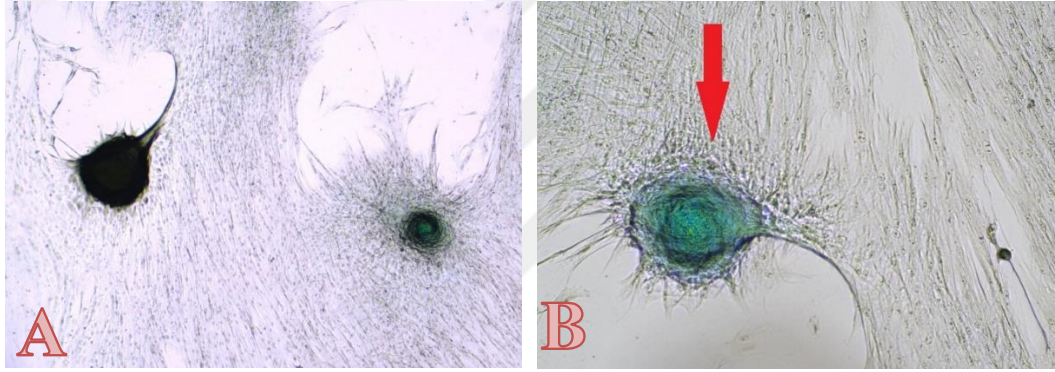
Şekil 62. Besiyerinde kıkırdak oluşumunun makroskopik görünümü



Şekil 63. İn vitro kıkırdak oluşumu mikroskop görüntüsü



Şekil 64. İn vitro oluşan kırıldak hattı

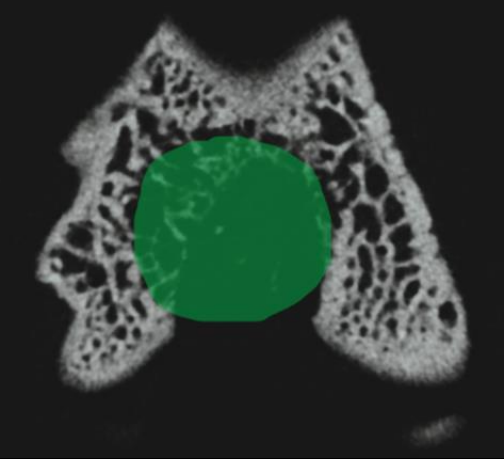
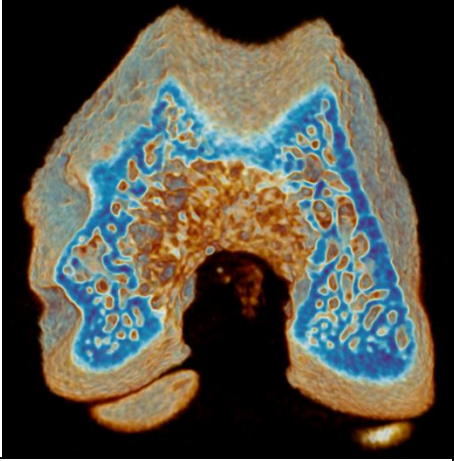
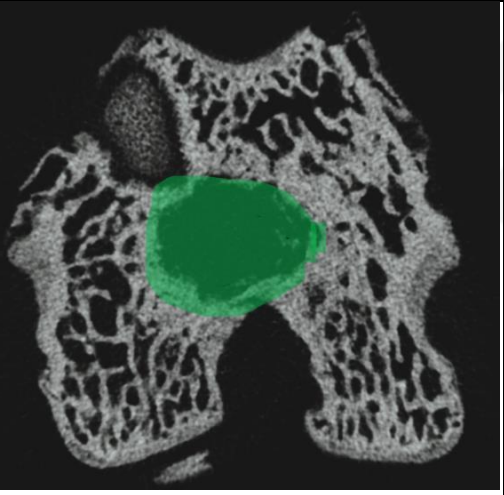
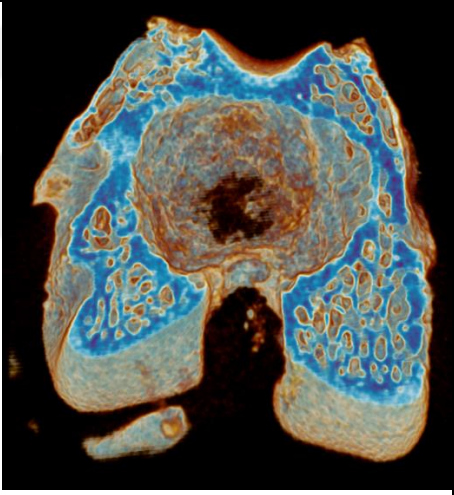


Şekil 65. A) Nanofiberlerin invitro kırıldak oluşumu mikroskop görüntüsü B) x5 Yakınlaştırılmış mikroskop görüntüsü

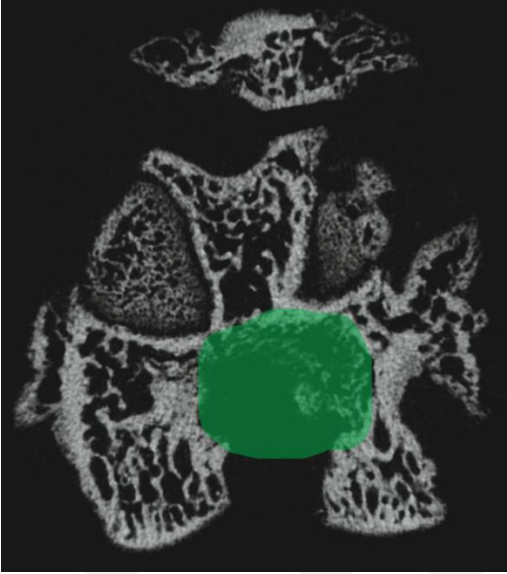
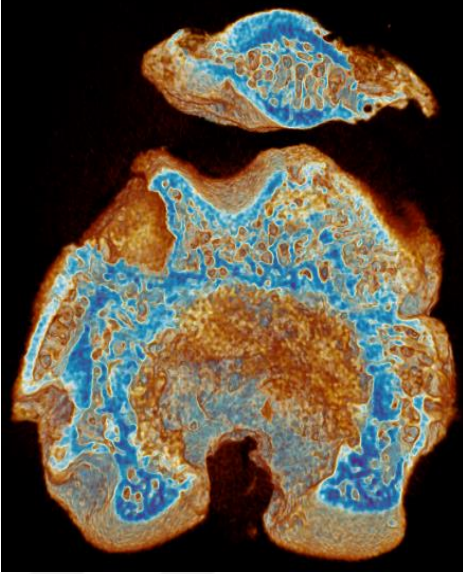
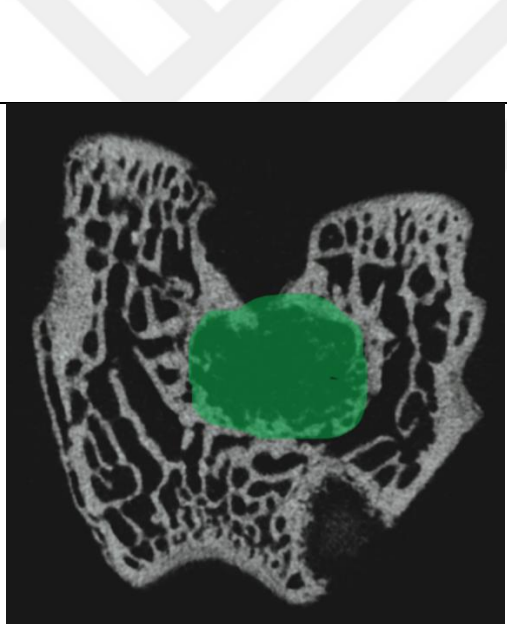
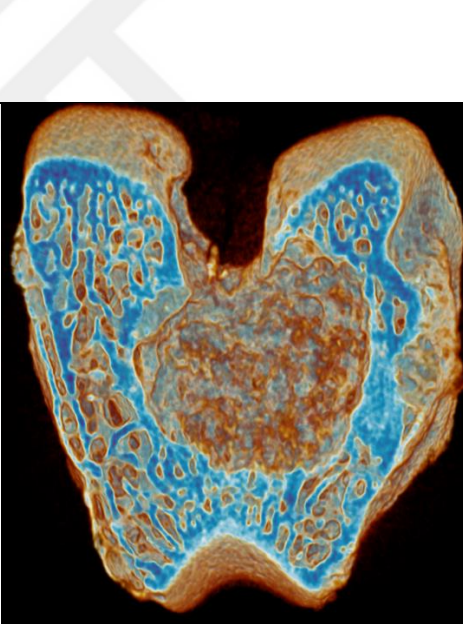
5.9. Mikro CT Görüntüleme Sonucu

Çizelge 18’de oluşturulan ratlarda oluşturulan hasara tedavi uygulanmayan kontrol grubuyla FK1, FK2 ve FK3 matriksleriyle tedavi uygulanan grupların tomografi sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 18. Kontrol, G1,G2 ve G3 gruplarının Mikro CT sonuçları

Kontrol		
FK1		

Çizelge 18. (devam)

FK2		
FK3		

Mikro-CT analizinin 3B rekonstrüksiyon görüntüleri, yeni dokunun 3B implant edilen iskelelerle iyi bir şekilde entegre olduğunu ve iskelelerle temas eden hücrelerin in vivo çözünmeye dahil olabileceğini ortaya koydu. Ayrıca, mikro-CT analizi ve histolojik analizler, 3D implant edilen iskelelerin kırıkdağın yeniden yapılanmasını önemli ölçüde teşvik ettiğini gösterdi. Bu nedenle, 3B implant edilen iskelelerin çözünmeye uğradığı ve doku rejenerasyonunu teşvik ettiği iyi bir şekilde öngörülmektedir.

Songfeng ve ark. Yapmış oldukları çalışmada Mikro-CT analizinin 3B rekonstrüksiyon görüntülerinden elde ettikleri verilere göre, 3B implant edilen iskelelerin artık malzemesinin implantasyon süresi arttıkça azalan bir eğilim sergilediğini belirtmiştir (Xu vd., 2008).

5.10. Histopatolojik Bulgular

Total sakrifiye edilmiş 19 adet eklemler, yumuşak dokularından uzaklaştırıldıktan sonra %10'luk nötral formalinde 72 saat tesbit edildi, formik asit solüsyonunda 5 gün dekalsifiye edildikten sonra uzunlamasına parçalar alınarak doku kasetlerine yerleştirildi (Şekil 68-69).



Şekil 66. Dekalsifiye edilen örnek



Şekil 67. Doku Kasetlerine Yerleştirilen Örnekler

Tam otomatik doku takip cihazında rutin takipleri yapılan (seri alkoller, ksilen ve parafin) dokular parafinde bloklandı. Bu bloklardan mikrotomda 5-6 mikron kalınlığında alınan seri doku kesitleri Hematoksilen-Eozin (H.E) ile boyanarak ışık mikroskopunda (Olympus BX-51) incelendi. Mikrofotografaları (Olympus DP-20) çekildi.

Çizelge 19. Dolgu maddeleri ile dokuda oluşan lezyonlarının histopatolojik bulguları

GRUP AD	GRUPLAR	HAYVAN KOD	LAM- NO	HASAR DOLGU MATERİYAL ORANI %	AKUT GRANÜLASYON DOKU	YABANCI cisim GRANÜLASYON DOKU	KRONİK GRANÜLASYON DOKU	KIKIRDAK REJENERAS	HASAR KAPANMA %
KONTROL	1	1A	1	0	0	0	3	2	90
		1B	8	0	0	0	3	2	90
FK1	2	2A	2	70	3	3	2	1	90
		2B	9	40	0	3	1	1	90
FK2	3	3A	3	80	0	3	1	0	Kapsül yüzeyinde
		3B	1 0	80	0	3	1	0	Kapsül yüzeyinde
		3C	1 5	20	0	2	2	1	80
FK3	4	4A	4	20	0	3	2	1	90
		4B	1 1	5	0	3	2	1	100
		4C	1 6	20	0	2	1	1	90

(SKORLAMA: 0:YOK 1:HAFİF 2: ORTA 3: ŞİDDETLİ)

Grup 1: Kontrol Grubu

- **Hayvan Kodları:** 1A, 1B
- **Hasar Dolgu Materyali Oranı:** %0 (Dolgu materyali kullanılmamış)
- **Histopatolojik Bulgular:**
 - Kronik Granülasyon Dokusu: Her iki alt grup için de orta seviyede (3) gözlemlenmiş.
 - Kıkırdak Doku Rejenerasyonu: Her iki alt grup için de düşük seviyede (2) gözlemlenmiş.
- **Hasar Kapanma Oranı:** %90

Grup 2: FK1 Nanofiber ile Doldurulmuş

- **Hayvan Kodları:** 2A, 2B
- **Hasar Dolgu Materyali Oranı:** 2A için %70, 2B için %40
- **Histopatolojik Bulgular:**
 - Akut Granülasyon Dokusu: 2A için yüksek seviyede (3), 2B için yok (0).
 - Yabancı Cisim Granülasyon Dokusu: Her iki alt grup için de yüksek seviyede (3).
 - Kronik Granülasyon Dokusu ve Kıkırdak Rejenerasyonu: Her iki alt grup için düşük-mat orta seviye (1-2).
- **Hasar Kapanma Oranı:** %90

Grup 3: FK2 Nanofiber ile Doldurulmuş

- **Hayvan Kodları:** 3A, 3B, 3C
- **Hasar Dolgu Materyali Oranı:** 3A ve 3B için %80, 3C için %20
- **Histopatolojik Bulgular:**
 - Yabancı Cisim Granülasyon Dokusu: Her üç alt grup için de yüksek seviyede (3).

- Kronik Granülasyon Dokusu: Orta seviyede (1-2).
- Kıkırdak Doku Rejenerasyonu: 3A ve 3B’de yok, 3C’de düşük seviyede (1).
- **Hasar Kapanma Oranı:** 3A ve 3B’de %90, 3C’de %80
- **Ek Bilgi:** 3A ve 3B’de kapsül yüzeyinde notu yer almaktadır.

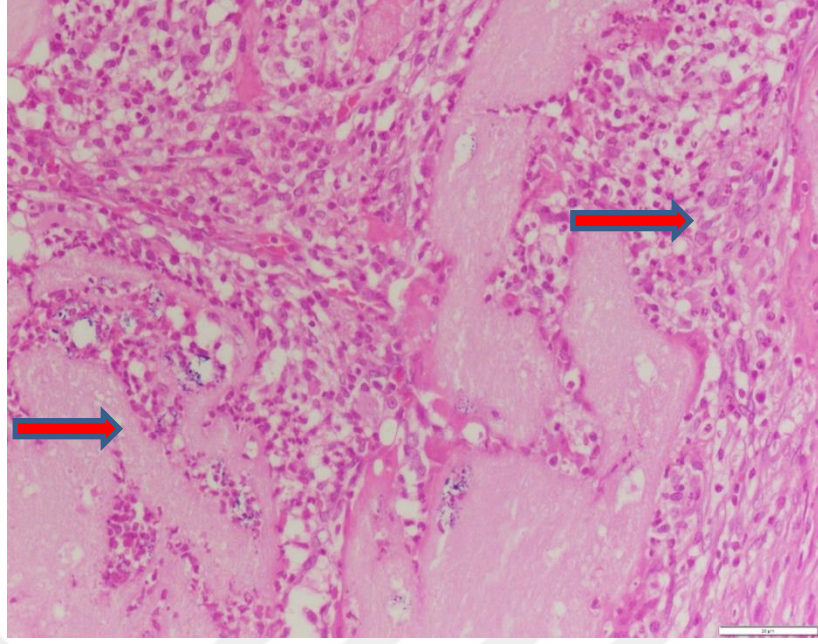
Grup 4: FK3 Nanofiber ile Doldurulmuş

- **Hayvan Kodları:** 4A, 4B, 4C
- **Hasar Dolgu Materyali Oranı:** Düşük (%5-20)
- **Histopatolojik Bulgular:**
 - Yabancı Cisim Granülasyon Dokusu: Orta seviyede (2-3).
 - Kronik Granülasyon Dokusu ve Kıkırdak Rejenerasyonu: Orta seviyede (1-2).
- **Hasar Kapanma Oranı:** %90-100
- **Ek Bilgi:** 4C’de kalın fibrin ağları var.

Bu analiz, dolgu materyallerinin histopatolojik yanıtları ve doku iyileşmesi üzerindeki etkilerini gruplar arası karşılaştırmalı olarak göstermektedir (Çizelge 19). Her bir dolgu materyali, farklı oranlarda ve farklı histopatolojik yanıtlarla ilişkilendirilmiş durumda, bu da malzemenin özelliklerinin ve dolgu oranlarının doku rejenerasyonu üzerindeki önemini vurgular.

Çalışma sonuçlarına göre, dolgu materyalleri yüksek oranlarda (%80-100) hasarın kapanmasına imkan sağlamıştır. Histopatolojik incelemelerde;

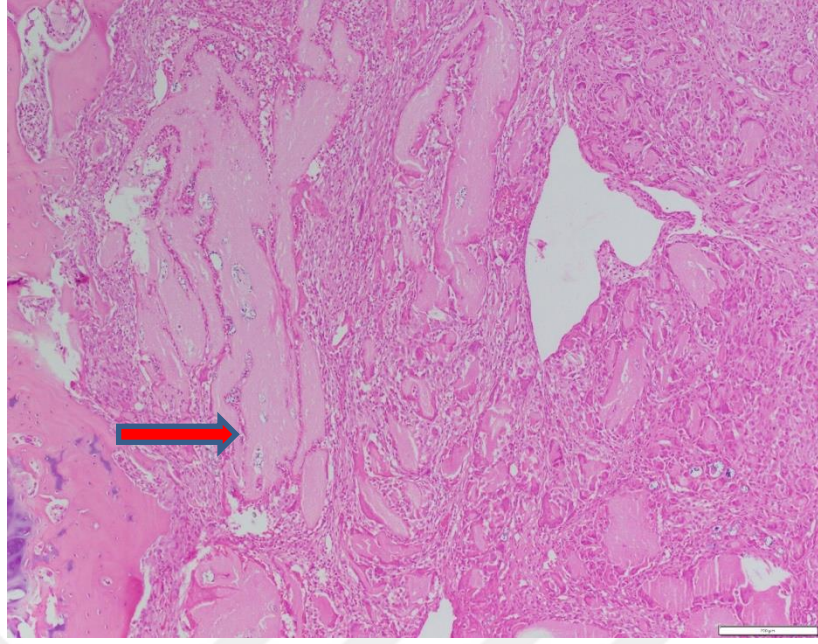
- **Akut Granülasyon Dokusu:** Nötrofil lökositlerin baskın olduğu ve akut inflamasyon göstergeleri tespit edilmiştir.



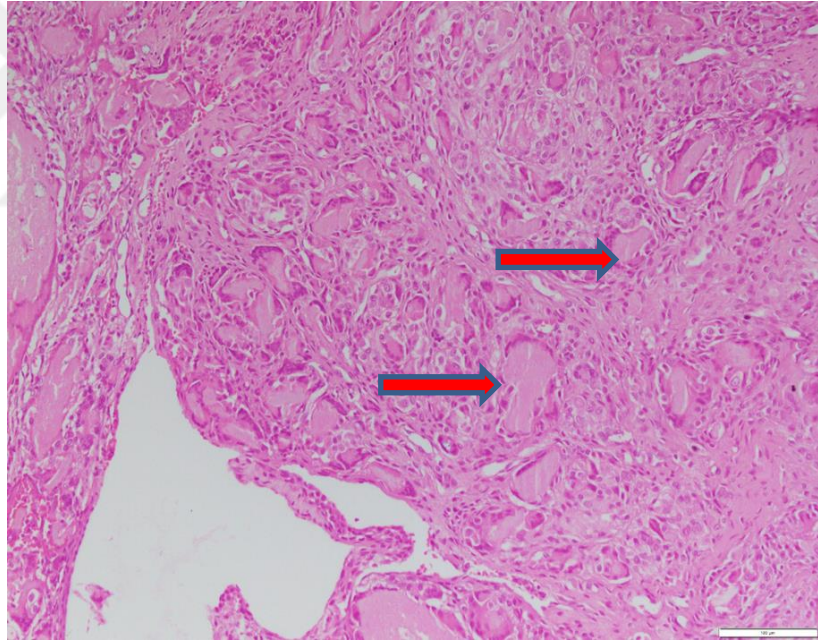
Şekil 68. Akut granülasyon dokusu. HE - 200 Büyütme

Akut granülasyon dokusu, yaralanma veya cerrahi müdahale sonrası ilk yanıt olarak gelişir. Bu dokuda nötrofil lökositler baskındır, bu hücreler bakteriyel enfeksiyonlara ve yabancı cisimlere hızlı tepki veren ilk savunma hattıdır. Akut inflamatuvar tepki, genellikle kızarıklık, ısı artışı, şişlik ve ağrı ile karakterize edilir. Bu doku, aynı zamanda küçük damarların (kapillerlerin) yeni oluşumuyla (angiogenez) zenginleşmiş bir matriks içerir. Dolgu materyallerinin implante edilmesi sonrasında, nötrofiller hızlı bir şekilde hasar gören bölgeye göç eder ve inflamatuvar medyatörler salgılayarak hasarlı dokunun temizlenmesini ve onarım sürecinin başlamasını sağlarlar.

- **Yabancı Cisim Granülasyon Dokusu:** Dolgu materyaline karşı gelişen inflamatuvar yanıt, bol makrofaj ve dev hücre içermiştir.



Şekil 69. Yabancı Cisim Granülaston Dokusu. HE - 200 Büyütme

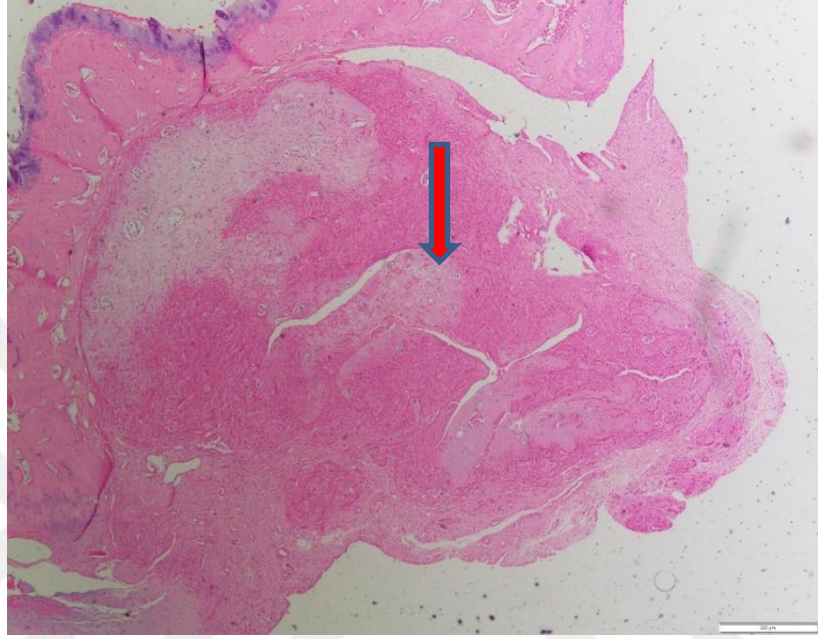


Şekil 70. Yabancı Cisim Granülaston Dokusu. HE - 200 Büyütme

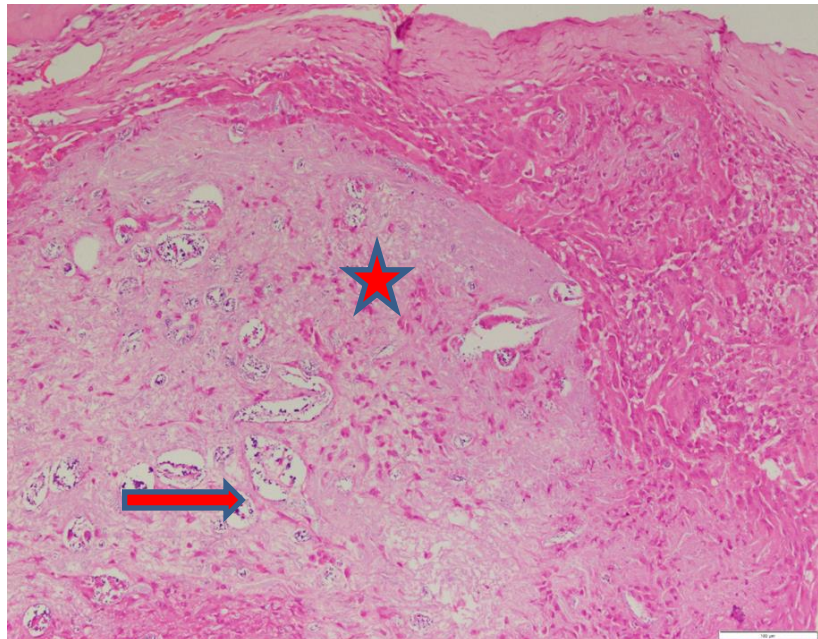
Yabancı cisim granülasyon dokusu, vücudun yabancı bir materyale (bu durumda dolgu materyaline) verdiği spesifik bir inflamatuvar yanıttır. Bu dokuda makrofajlar ve dev hücreler baskındır. Makrofajlar, yabancı materyalleri fagosite ederek ve inflamatuvar sitokinler salgılayarak inflamatuvar yanıtta katkıda bulunur. Dev hücreler ise genellikle birkaç makrofajın birleşmesiyle oluşur ve büyük yabancı cisimleri çevreleyerek izole

etmeye çalışırlar. Bu tür bir granülasyon dokusu, yabancı materyalin uzun süreli varlığına bağlı olarak kronik bir inflamatuvar durumun sürmesine neden olabilir.

- **Kronik Granülasyon Dokusu:** Uzun süreli fibrozis ve vasküler proliferasyon gözlenmiştir.



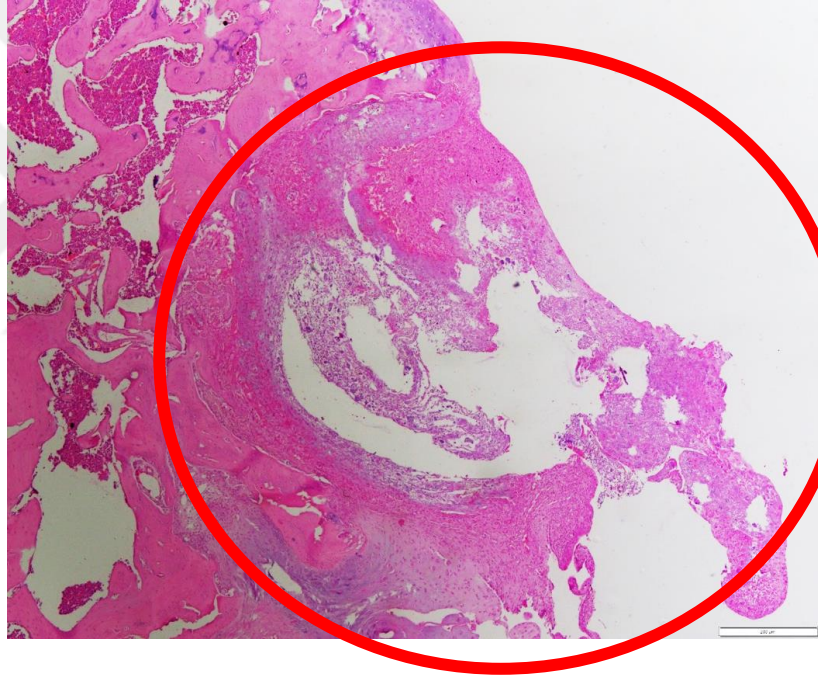
Şekil 71. Dolgu Materyali (ok). HE - 200 Büyütme



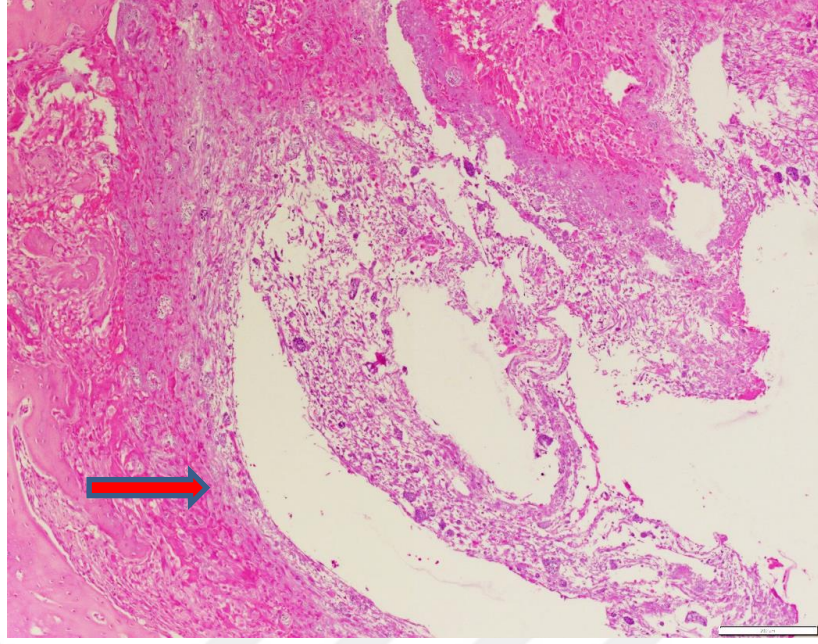
Şekil 72. Dolgu Materyali (ok), Kronik Granülasyon Dokusu (yıldız). HE - 200 Büyütme

Kronik granülasyon dokusu, inflamatuvar sürecin devam ettiği ve daha uzun süreli doku değişikliklerinin görüldüğü bir evredir. Bu dokuda fibrozis (doku sertleşmesi ve skar dokusu oluşumu) ve vasküler proliferasyon (yeni damar oluşumu) gözlemlenir. Fibrozis, kollajen ve diğer ekstrasellüler matriks proteinlerinin artmış sentezi ile karakterizedir ve doku onarımının bir parçası olarak gelişir, ancak aşırı fibrozis işlevsel olmayan skar dokusunun oluşumuna yol açabilir. Vasküler proliferasyon, hasarlı dokunun yeniden vaskülarizasyonunu ve dolayısıyla daha iyi bir onarım ve rejenerasyon kapasitesini destekler.

- **Kıkırdak Doku Rejenerasyonu:** Bazı gruplarda dolgu materyali komşuluğunda kıkırdak dokunun yenilendiği gözlemlenmiştir.



Şekil 73. Hasar dolgu alanı. HE - 200 Büyütme



Şekil 74. Hasar dolgu alanı. HE - 200 Büyütme

Kıkırdak doku rejenerasyonu, özellikle dolgu materyali komşuluğunda kıkırdak dokunun yenilendiği durumlarda gözlemlenir. Bu süreç, kıkırdak hücreleri olan kondrositlerin proliferasyonu ve yeni kıkırdak matriksinin sentezi ile karakterizedir. Rejenerasyon, hasarlı veya aşınmış kıkırdak dokunun yerini alacak yeni, işlevsel kıkırdak dokunun oluşumunu ifade eder. Bu süreçte, dolgu materyalleri kondrositlerin büyümesi ve diferansiyasyonu için gerekli mekanik ve kimyasal ortamı sağlayarak kıkırdak onarımını destekleyebilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kıkırdak dokuda çeşitli yaralanmalar ve hastalıklar nedeniyle dejeneratif eklem hastalıkları sıklıkla görülmektedir. Kıkırdak hasarlarının tedavisi amacıyla çeşitli ortopedik ve hücre temelli tedavi teknikleri geliştirilmesine rağmen, doğal dokunun yerini alabilen ve tam iyileşme sağlayan etkili bir tedavi bulunamamıştır (Zhao vd., 2005). Eklem kıkırdakları hiyalin kıkırdak formunda olduğundan, eklem kıkırdağı hasarlarının iyileştirilmesi, kıkırdak doku mühendisliğinde çok önemli araştırma konusudur. Hücrelerin tasarlanmış matrikslere dahil edilmesinin, eklem kıkırdağı hasarlarında hiyalin kıkırdak oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Phutane vd., 2023).

Bu tez çalışmasında, kıkırdak doku mühendisliği alanında kıkırdak rejenerasyonunu sağlamak amacıyla PCL/GEL/HA+DF-MKH+TGF β -1 (FK3), PCL/GEL/HA+DF-MKH (FK2) ve PCL/GEL/HA (FK1) nanofiberlerin elektroğirme yöntemiyle üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen nanofiberlerin karakterizasyon testleri, mekanik analizleri, gözeneklilik, in vitro koşullarda biyobozunurluk, biyouyumluluk ve kıkırdak oluşumu gibi analizler gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ana amacı, üretilen nanofiberlerin kıkırdak hasarlarını onarma kapasitesini değerlendirmek ve mevcut tedavi yöntemlerine potansiyel bir alternatif sunmaktır.

İn vitro deneyler, iskelelerin hücre uyumluluğu, proliferasyonu ve diferansiyasyon kabiliyeti üzerine yoğunlaşmıştır. Elde edilen bulgular, DF-MKH ve TGF β -1'in eklenmesinin, nanofiber iskelelerin biyofonksiyonel özelliklerini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Flow sitometri cihazında analiz edilen hücre canlılık oranı %83.81 olarak bulunmuştur. Bu iskelelerin sağladığı üç boyutlu yapı, hücrelerin doğal hücre dışı matrisini (ECM) taklit eden bir ortamda büyümelerini sağlamış, bu da hücrelerin kıkırdak dokuya özgü fenotiplerini korumalarına ve kıkırdak spesifik matriks proteinleri üretmelerine olanak tanımıştır. Nanofiberlere kondrojenik farklılaşma besiyeri eklenerek 14-21 gün her üç günde bir besiyeri değiştirilerek kültürlenmiş ve süre sonunda ışık mikroskopunda gözlemlenen in vitro kıkırdak elde edilmiştir. Bu sonuçlar, iskelelerin kıkırdak mühendisliği için uygun birer aday

olduğunu işaret etmektedir. Ürün haline getirildiğinde kullanışlı ve başarılı bir raf ürünü olabileceği öngörülmüştür.

İn vivo çalışmalar, rat modeli üzerinde tam kalınlıkta kıkırdak hasarları oluşturularak gerçekleştirilen 4 grup incelendiğinde nanofiber matrikslerin uygulanan gruplardaki hasar alanlarında farklılıklar izlenmiştir. Materyal absorbe edilirken yerinin granülasyon dokusu ile doldurulduğu izlenmiştir. Mikro-CT ve histopatolojik analizler, iskelelerin implantasyonunun hasar alanında kıkırdak yapısının restorasyonunu desteklediğini doğrulamıştır.

Sonuç olarak, ilk kez üretilmiş ve in vivo incelemeleri ilk kez yapılmış DF-MKH ve TGFβ-1 enkapsüle edilmiş PCL/GEL/HA nanofiber doku iskelelerinin, kıkırdak rejenerasyonu için önemli potansiyel sunduğu tespit edilmiştir. Bu nanofiberler, mevcut klinik protokollerin karşılaştığı sınırlılıklara alternatif çözümler önererek kıkırdak onarım tekniklerinin geliştirilmesinde mühim bir ilerleme kaydedilmiştir. Bununla birlikte, elde edilen bulguların klinik öncesi modeller üzerinde daha geniş kapsamlı testlerle desteklenerek, 8-10 hafta gibi bir zaman diliminde gerçekleştirilmesi, daha güvenilir sonuçlar elde etmek için patoloğlar tarafından tavsiye edilmektedir. Bu tez, kıkırdak doku mühendisliğindeki yenilikçi yaklaşımlara ve gelecek çalışmalara katkıda bulunacağı öngörülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Angela Semitela, A., Gir, A. F., Fernandes, C., Ramalho, G., Bdikin, I., onio Completo, A., & AAP Marques, P. (2020). Electrospinning of bioactive polycaprolactone-gelatin nanofibres with increased pore size for cartilage tissue engineering applications. *journals.sagepub.com*Â Semitela, AF Girão, C Fernandes, G Ramalho, I Bdikin, A Completo, PAAP MarquesJournal of Biomaterials Applications, 2020•journals.sagepub.com, 35(4-5), 471-484.
- Adams, M. E., Lussier, A. J., & Peyron, J. G. (2000). A Risk-Benefit Assessment of Injections of Hyaluronan and its Derivatives in the Treatment of Osteoarthritis of the Knee. *Drug Safety*, 23(2), 115-130.
- Ahmed, T. A. E., & Hincke, M. T. (2014). Mesenchymal stem cell - based tissue engineering strategies for repair of articular cartilage.
- Alothman, Z. A. (2012). A Review: Fundamental Aspects of Silicate Mesoporous Materials. *Materials* 2012, Vol. 5, Pages 2874-2902, 5(12), 2874-2902.
- Alves Da Silva, M. L., Martins, A., Costa-Pinto, A. R., Costa, P., Faria, S., Gomes, M., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2010). Cartilage tissue engineering using electrospun PCL nanofiber meshes and MSCs. *ACS Publications*ML Alves da Silva, A Martins, AR Costa-Pinto, P Costa, S Faria, M Gomes, RL ReisBiomacromolecules, 2010•ACS Publications, 11(12), 3228-3236.
- Anahí Sánchez-Téllez, D., Téllez-Jurado, L., & María Rodríguez-Lorenzo, L. (2017). Hydrogels for cartilage regeneration, from polysaccharides to hybrids. *Polymers*, 9(12), 671.
- Arakawa, C.K., & DeForest, C. A. (2017). Polymer design and development. In *Biology and engineering of stem cell niches* (pp.295-314). Academic Press.
- Arıcı, A. (2018). Elektrospin metodu ile hazırlanan polimer/MWCNT nanofiberlerin özelliklerine MWCNT çapının ve uzunluğunun etkisinin araştırılması (Master's thesis, Necmettin Erbakan University (Turkey)).
- Arun, A., Malrautu, P., Laha, A., & Ramakrishna, S. (2021). Gelatin nanofibers in drug delivery systems and tissue engineering. *Engineered Science*, 16, 71-81.
- Ateş, H., & Bahçeci, E. (2015). Nano malzemeler için üretim yöntemleri. *Gazi University Journal of Science Part C: Design and Technology*, 3(2), 483-499.
- Aydar, A. Y., & Bağdatlıoğlu, N. (2014). Yemeklik yağların yüzey gerilimi ve temas açılarının belirlenmesinde uygulanan yöntemler. *Akademik Gıda*, 12(1), 108-114.
- Bachımam, K. (2017). Production and characterization of hyaluronic acid nanofibers containing TGF- β and baicalein by using electrospinning method.

- Barnhart, B. J., Cox, S. H., & Kraemer, P. M. (1979). Detachment variants of Chinese hamster cells: hyaluronic acid as a modulator of cell detachment. *Experimental cell research*, 119(2), 327-332.
- Behere, I., Pardawala, Z., Vaidya, A., Kale, V., & Ingavle, G. (2021). Osteogenic differentiation of an osteoblast precursor cell line using composite PCL-gelatin-nHAp electrospun nanofiber mesh. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 70(18), 1281-1295.
- Benthien, J. P., & Behrens, P. (2011). The treatment of chondral and osteochondral defects of the knee with autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): method description and recent developments. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy*, 19, 1316-1319.
- Bhosale, A. M., & Richardson, J. B. (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British medical bulletin*, 87(1), 77-95.
- Mansbridge, J. N. (2009). Tissue-engineered skin substitutes in regenerative medicine. *Current opinion in biotechnology*, 20(5), 563-567.
- Brittberg, M., Nilsson, A., Lindahl, A., Ohlsson, C., & Peterson, L. (1996). Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 326, 270-283.
- Buckwalter, J. A., & Mankin, H. J. (1998). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional course lectures*, 47, 477-486.
- Buckwalter, J. A., Mankin, H. J., & Grodzinsky, A. J. (2005). Articular cartilage and osteoarthritis. *Instructional Course Lectures-American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 54, 465.
- Calabro, A., Oken, M. M., Hascall, V. C., & Masellis, A. M. (2002). Characterization of hyaluronan synthase expression and hyaluronan synthesis in bone marrow mesenchymal progenitor cells: predominant expression of HAS1 mRNA and up-regulated hyaluronan synthesis in bone marrow cells derived from multiple myeloma patients. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 100(7), 2578-2585.
- Hunziker, E. B. (2002). Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and cartilage*, 10(6), 432-463.
- Casper, M. E., Fitzsimmons, J. S., Stone, J. J., Meza, A. O., Huang, Y., Ruesink, T. J., ... & Reinholz, G. G. (2010). Tissue engineering of cartilage using poly-ε-caprolactone nanofiber scaffolds seeded in vivo with periosteal cells. *Osteoarthritis and cartilage*, 18(7), 981-991.
- Chakraborty, J., Fernández-Pérez, J., van Kampen, K. A., -, al, Breathwaite, E. K., Weaver, J. R., & Murchison, A. C. (2015). Fiber diameter and seeding density influence

- chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells seeded on electrospun poly (ϵ -caprolactone) scaffolds. *iopscience.iop.org* AC Bean, RS Tuan *Biomedical materials*, 2015•*iopscience.iop.org*, 10, 15018.
- Chen, W., Chen, S., Morsi, Y., El-Hamshary, H., El-Newhy, M., Fan, C., & Mo, X. (2016). Superabsorbent 3D scaffold based on electrospun nanofibers for cartilage tissue engineering. *ACS Publications* W Chen, S Chen, Y Morsi, H El-Hamshary, M El-Newhy, C Fan, X Mo *ACS applied materials & interfaces*, 2016•*ACS Publications*, 8(37), 24415-24425.
- Chen, Y., Xu, W., Shafiq, M., Tang, J., Hao, J., Xie, X., Yuan, Z., Xiao, X., Liu, Y., & Mo, X. (2021). Three-dimensional porous gas-foamed electrospun nanofiber scaffold for cartilage regeneration. *Journal of Colloid and Interface Science*, 603, 94-109.
- Ciuffreda, M. C., Malpasso, G., Musarò, P., Turco, V., & Gnecci, M. (2016). Protocols for in vitro differentiation of human mesenchymal stem cells into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages. *Methods in Molecular Biology*, 1416, 149-158.
- Coimbra, P., Santos, P., Alves, P., Miguel, S. P., Carvalho, M. P., de Sá, K. D., Correia, I. J., & Ferreira, P. (2017). Coaxial electrospun PCL/Gelatin-MA fibers as scaffolds for vascular tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 7-15.
- Çiftci, Ş., Özek, S., Aksoy, S. A., Aksoy, K., & Göde, F. (2015). Nanokil katkılı PVA/kitosan nanolif sentezi ve karakterizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Dergisi*, 10(1), 118-128.
- Dahl, J. P., Caballero, M., Pappa, A. K., Madan, G., Shockley, W. W., & van Aalst, J. A. (2011). Analysis of human auricular cartilage to guide tissue-engineered nanofiber-based chondrogenesis: implications for microtia reconstruction. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery*, 145(6), 915-923.
- Danišovič, L. U., Varga, I., Zamborský, R., & Böhmer, D. (2012). The tissue engineering of articular cartilage: cells, scaffolds and stimulating factors. *Experimental biology and medicine*, 237(1), 10-17.
- Darshan, T. G., Chen, C. H., Kuo, C. Y., Shalumon, K. T., Chien, Y. M., Kao, H. H., & Chen, J. P. (2022). Development of high resilience spiral wound suture-embedded gelatin/PCL/heparin nanofiber membrane scaffolds for tendon tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 221, 314-333.
- Dıraçoğlu İstanbul Üniversitesi, D., Tıp Fakültesi, İ., Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, F., & Geliş tarihi, T. (2016). Kas iskelet hastalıklarında ozon-oksijen tedavileri. *ftdergisi.com* Dıraçoğlu *Turkish Journal of Physical Medicine & Rehabilitation/Türkiye Fiziksel*, 2016•*ftdergisi.com*, 62(2), 183-191.
- Dikmen, G., & Kılıçoğlu, Ö. Ğ. (2012) Osteokondral defektlerde defekt çapının eklem yük ve basınç dağılımı üzerine etkileri; biyomekanik deneysel çalışma.

- Doğruok, Y. (2019). 3 boyutlu çok katmanlı elektroçekim yöntemiyle üretilen nanolifli yüzeylerin doku-yapı iskeleti olarak kullanılabilirliklerinin araştırılması.
- Dvir, T., Timko, B. P., Kohane, D. S., & Langer, R. (2020). Nanotechnological Strategies for Engineering Complex Tissues. *Nano-Enabled Medical Applications*, 351-382.
- Edgar, L., McNamara, K., Wong, T., Tamburrini, R., Katari, R., & Orlando, G. (2016). Heterogeneity of Scaffold Biomaterials in Tissue Engineering. *Materials*, 9(5), 332.
- Eichhorn, S. J., & Sampson, W. W. (2005). Statistical geometry of pores and statistics of porous nanofibrous assemblies. *Journal of the Royal Society, Interface*, 2(4), 309-318.
- Elzein, T., Nasser-Eddine, M., Delaite, C., Bistac, S., & Dumas, P. (2004). FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 273(2), 381-387.
- Entekhabi, E., Haghbin Nazarpak, M., Moztarzadeh, F., & Sadeghi, A. (2016). Design and manufacture of neural tissue engineering scaffolds using hyaluronic acid and polycaprolactone nanofibers with controlled porosity. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 380-387.
- Erdem, F. H., & Karatay, S. (2007) Diz Osteoartriti Tedavisinde Hyaluronik Asitin Ağrı ve Kuadriseps Kası Ağrılık Kaldırma Gücüne Etkisi.
- ERGİN, E., EKİCİ, Y., & ATAÇ, F. B. (2018). Tissue Engineering and its Appllication Areas. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 38(1), 70-78.
- Erisken, C., Kalyon, D. M., & Wang, H. (2008). Functionally graded electrospun polycaprolactone and β -tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 29(30), 4065-4073.
- Fakhari, A., & Berkland, C. (2013). Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta biomaterialia*, 9(7), 7081-7092.
- Fee, T., Surianarayanan, S., Downs, C., Zhou, Y., & Berry, J. (2016). Nanofiber alignment regulates NIH3T3 cell orientation and cytoskeletal gene expression on electrospun PCL+ gelatin nanofibers. *PLoS One*, 11(5), e0154806.
- Feng, B., Tu, H., Yuan, H., Peng, H., & Zhang, Y. (2012). Acetic-acid-mediated miscibility toward electrospinning homogeneous composite nanofibers of GT/PCL. *Biomacromolecules*, 13(12), 3917-3925.
- Flik, K. R., Verma, N., Cole, B. J., & Bach, B. R. (2007). Articular cartilage: structure, biology, and function. *Cartilage repair strategies*, 1-12.
- Forsey, R. W., Fisher, J., Thompson, J., Stone, M. H., Bell, C., & Ingham, E. (2006). The effect of hyaluronic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model. *Biomaterials*, 27(26), 4581-4590.

- Fox, A. J., Bedi, A., & Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health*, 1(6), 461-468.
- Freed, L. E., Martin, I., & Vunjak-Novakovic, G. (1999). Frontiers in Tissue Engineering: In Vitro Modulation of Chondrogenesis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1976-2007), 367, S46-S58.
- Fusco, G., Gambaro, F. M., Di Matteo, B., & Kon, E. (2021). Injections in the osteoarthritic knee: a review of current treatment options. *Efort Open Reviews*, 6(6), 501-509.
- Garrigues, N. W., Little, D., Sanchez-Adams, J., Ruch, D. S., & Guilak, F. (2014). Electrospun cartilage-derived matrix scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of biomedical materials research Part A*, 102(11), 3998-4008.
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2006). *Color textbook of histology e-book*. Elsevier Health Sciences.
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2012). *Color atlas and text of histology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Gautam, S., Dinda, A. K., & Mishra, N. C. (2013). Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3), 1228-1235.
- Genç, D., Zibandeh, N., Nain, E., Gökalp, M., Özen, A. O., Göker, M. K., & Akkoç, T. (2018). Dental follicle mesenchymal stem cells down-regulate Th2-mediated immune response in asthmatic patients mononuclear cells. *Clinical & Experimental Allergy*, 48(6), 663-678.
- Gil-Castell, O., Badia, J. D., Ontoria-Oviedo, I., Castellano, D., Sepúlveda, P., & Ribes-Greus, A. (2020). Polycaprolactone/gelatin-based scaffolds with tailored performance: in vitro and in vivo validation. *Materials Science and Engineering: C*, 107, 110296.
- Gobbi, A., Kon, E., Berruto, M., Francisco, R., Filardo, G., & Marcacci, M. (2006). Patellofemoral full-thickness chondral defects treated with hyalograft-C: A clinical, arthroscopic, and histologic review. *American Journal of Sports Medicine*, 34(11), 1763-1773.
- Green Jr, W. T. (1977). Articular cartilage repair: behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 124, 237-250.
- Gugjoo, M. B., Abdelbaset-Ismail, A., Aithal, H. P., Kinjavdekar, P., Pawde, A. M., Kumar, G. S., & Sharma, G. T. (2017). Mesenchymal stem cells with IGF-1 and TGF-β1 in laminin gel for osteochondral defects in rabbits. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 1165-1174.

- Günay, C., Sağliyan, A., Ünsaldi, E., Yaman, M., Üniversitesi, F., Fakültesi, V., Anabilim Dalı, C., Demirel Keban Meslek Yüksekokulu, S., & ve Embriyoloji Anabilim Dalı, H. (2005). Köpek Diz Ekleminde Deneysel Oluşturulan Osteokondral Defektlerin Otojen Kansellöz Gref İle Onarılması. 19(2), 107-113.
- Harbili, S. (2008). İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF): Egzersiz metabolizması ve kas dokusu üzerine etkileri.
- Harris, L. D., Kim, B. S., & Mooney, D. J. (1998). Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, 42(3), 396-402.
- He, X., Feng, B., Huang, C., Wang, H., Ge, Y., Hu, R., ... & Zheng, J. (2015). Electrospun gelatin/polycaprolactone nanofibrous membranes combined with a coculture of bone marrow stromal cells and chondrocytes for cartilage engineering. *International journal of nanomedicine*, 2089-2099.
- Hoang Thi, T. T., Lee, J. S., Lee, Y., Park, K. M., & Park, K. D. (2016). Enhanced cellular activity in gelatin-poly (ethylene glycol) hydrogels without compromising gel stiffness. *Macromolecular bioscience*, 16(3), 334-340.
- Holland, T. A., & Mikos, A. G. (2003). Advances in drug delivery for articular cartilage. *Journal of Controlled Release*, 86(1), 1-14.
- Hsieh, Y. H., Shen, B. Y., Wang, Y. H., Lin, B., Lee, H. M., & Hsieh, M. F. (2018). Healing of osteochondral defects implanted with biomimetic scaffolds of poly (ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite and glycidyl-methacrylate-modified hyaluronic acid in a minipig. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1125.
- Iwasa, J., Engebretsen, L., Shima, Y., & Ochi, M. (2009). Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*, 17(6), 561-577.
- Jeon, J. E., Vaquette, C., Klein, T. J., & Hutmacher, D. W. (2014). Perspectives in multiphasic osteochondral tissue engineering. *The Anatomical Record*, 297(1), 26-35.
- Ji, Y., Liang, K., Shen, X., & Bowlin, G. L. (2014). Electrospinning and characterization of chitin nanofibril/polycaprolactone nanocomposite fiber mats. *Carbohydrate polymers*, 101, 68-74.
- Jiang, Y.-C., Jiang, L., Huang, A., Wang, X.-F., Li, Q., & Turng, L.-S. (2017). Electrospun polycaprolactone/gelatin composites with enhanced cell-matrix interactions as blood vessel endothelial layer scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 901-908.
- Kanmaz, D. (2020). Yeni nesil nanolif esaslı medikal membran üretimi.

- Karahan, G. (2017). Elektrospınleme yöntemi ile poliakrilik asit/polietilenimin (PAA/PEI) nanoliflerin hazırlanması ve çeşitli termal, spektroskopik ve mikroskopik özelliklerinin incelenmesi.
- Khademhosseini, A., Vacanti, J. P., & Langer, R. (2009). BIOTECHNOLOGY-Progress in Tissue Engineering-Pioneers in building living tissue report advances toward the goal of replacing human organs. *Scientific American*, 64.
- Khan, W. S., Johnson, D. S., & Hardingham, T. E. (2010). The potential of stem cells in the treatment of knee cartilage defects. *The Knee*, 17(6), 369-374.
- Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J., & Yang, B. B. (2002). Structure and function of aggrecan. *Cell research*, 12(1), 19-32.
- Kiremitler, N. (2016). Elektroeğirme yöntemiyle nano gümüş katkılı polikaprolakton hidroksiapatit (PCL/HA-Ag) nanolif üretimi ve karakterizasyonu.
- Koga, H., Engebretsen, L., Brinchmann, J. E., Muneta, T., & Sekiya, I. (2009). Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 17, 1289-1297.
- Kraan, P., Vitters, E., & Van den Berg, W. (1992). Differential effect of transforming growth factor beta on freshly isolated and cultured articular chondrocytes. *The Journal of rheumatology*, 19(1), 140-145.
- Lee, J. H., Kisiday, J., & Grodzinsky, A. J. (2003, March). Tissue-engineered versus native cartilage: linkage between cellular mechano-transduction and biomechanical properties. In *Tissue Engineering of Cartilage and Bone: Novartis Foundation Symposium 249* (Vol. 249, pp. 52-69). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Lee, P., Manoukian, O. S., Zhou, G., Wang, Y., Chang, W., Yu, X., & Kumbar, S. G. (2016). Osteochondral scaffold combined with aligned nanofibrous scaffolds for cartilage regeneration. *RSC advances*, 6(76), 72246-72255.
- Lee, P., Tran, K., Chang, W., Shelke, N. B., Kumbar, S. G., & Yu, X. (2014). Influence of chondroitin sulfate and hyaluronic acid presence in nanofibers and its alignment on the bone marrow stromal cells: cartilage regeneration. *Journal of biomedical nanotechnology*, 10(8), 1469-1479.
- Li, D., & Xia, Y. (2004). Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel?. *Advanced materials*, 16(14), 1151-1170.
- Li, J., Chen, G., Xu, X., Abdou, P., Jiang, Q., Shi, D., & Gu, Z. (2019). Advances of injectable hydrogel-based scaffolds for cartilage regeneration. *Regenerative biomaterials*, 6(3), 129-140.
- Li, Q., Chang, Z., Oliveira, G., Xiong, M., Smith, L. M., Frey, B. L., & Welham, N. V. (2016). Protein turnover during in vitro tissue engineering. *Biomaterials*, 81, 104-113.

- Li, W. J., Chiang, H., Kuo, T. F., Lee, H. S., Jiang, C. C., & Tuan, R. S. (2009). Evaluation of articular cartilage repair using biodegradable nanofibrous scaffolds in a swine model: a pilot study. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 3(1), 1-10.
- Li, W. J., Danielson, K. G., Alexander, P. G., & Tuan, R. S. (2003). Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly (ϵ -caprolactone) scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 67(4), 1105-1114.
- Li, W. J., Jiang, Y. J., & Tuan, R. S. (2008). Cell-nanofiber-based cartilage tissue engineering using improved cell seeding, growth factor, and bioreactor technologies. *Tissue Engineering - Part A*, 14(5), 639-648.
- Li, W. J., Tuli, R., Huang, X., Laquerriere, P., & Tuan, R. S. (2005). Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials*, 26(25), 5158-5166.
- Li, W. J., Tuli, R., Okafor, C., Derfoul, A., Danielson, K. G., Hall, D. J., & Tuan, R. S. (2005). A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 26(6), 599-609.
- Løken, S., Jakobsen, R. B., Årøen, A., Heir, S., Shahdadfar, A., Brinchmann, J. E., ... & Reinholt, F. P. (2008). Bone marrow mesenchymal stem cells in a hyaluronan scaffold for treatment of an osteochondral defect in a rabbit model. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 16, 896-903.
- Mabvuure, N., Hindocha, S., & S. Khan, W. (2012). The Role of Bioreactors in Cartilage Tissue Engineering. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 7(4), 287-292.
- Magne, D., Vinatier, C., Julien, M., Weiss, P., & Guicheux, J. (2005). Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. *Trends in molecular medicine*, 11(11), 519-526.
- Martin, A. R., Patel, J. M., Locke, R. C., Eby, M. R., Saleh, K. S., Davidson, M. D., Sennett, M. L., Zlotnick, H. M., Chang, A. H., Carey, J. L., Burdick, J. A., & Mauck, R. L. (2021). Nanofibrous hyaluronic acid scaffolds delivering TGF- β 3 and SDF-1 α for articular cartilage repair in a large animal model. *Acta biomaterialia*, 126, 170-182.
- Mashhadikhan, M., Soleimani, M., Parivar, K., & Yaghmaei, P. (2015). ADSCs on PLLA/PCL hybrid nanoscaffold and gelatin modification: cytocompatibility and mechanical properties. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 7(1), 32.
- Milleret, V., Hefti, T., Hall, H., Vogel, V., & Eberli, D. (2012). Influence of the fiber diameter and surface roughness of electrospun vascular grafts on blood activation. *Acta biomaterialia*, 8(12), 4349-4356.

- Miron, R. J. & Choukroun, J. (2017). Platelet rich fibrin in regenerative dentistry (pp. 1-14). Oxford: Wiley-Blackwell.
- Mollenhauer, J. A. (2008). Perspectives on articular cartilage biology and osteoarthritis. *Injury*, 39(1), 5-12.
- Mousavi, S., Khoshfetrat, A. B., Khatami, N., Ahmadian, M., & Rahbarghazi, R. (2019). Comparative study of collagen and gelatin in chitosan-based hydrogels for effective wound dressing: Physical properties and fibroblastic cell behavior. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 518(4), 625-631.
- Moussavi-Harami, S. F., Pedersen, D. R., Martin, J. A., Hillis, S. L., & Brown, T. D. (2009). Automated objective scoring of histologically apparent cartilage degeneration using a custom image analysis program. *Journal of orthopaedic research*, 27(4), 522-528.
- Movahedi, M., Asefnejad, A., Rafienia, M., & Khorasani, M. T. (2020). Potential of novel electrospun core-shell structured polyurethane/starch (hyaluronic acid) nanofibers for skin tissue engineering: In vitro and in vivo evaluation. *International journal of biological macromolecules*, 146, 627-637.
- Nemati, S., Kim, S. J., Shin, Y. M., & Shin, H. (2019). Current progress in application of polymeric nanofibers to tissue engineering. *Nano convergence*, 6(1), 36.
- Newman, A. P. (1998). Articular cartilage repair. *The American journal of sports medicine*, 26(2), 309-324.
- O'Brien, L., & Jones, D. J. (2013). Silicone gel sheeting for preventing and treating hypertrophic and keloid scars. *Cochrane database of systematic reviews*, (9).
- Outerbridge, R. (1961). The etiology of chondromalacia patellae. *The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume*, 43(4), 752-757.
- Oyar, P. (2016). Osseointegrasyon ve Kemik Rejenerasyonunda Kemik Doku Mühendisliğinin Yeri. *atatürk üniversitesi diş hekimliği fakültesi dergisi*.
- Pojda, Z., Machaj, E., Kurzyk, A., Mazur, S., Dębski, T., Gilewicz, J., & Wysocki, J. (2013). Mezenchymalne komórki macierzyste. *Postępy Biochem*, 59(2), 187-197.
- Poole, A. R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., & Laverty, S. (2001). Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1976-2007), 391, S26-S33.
- Prockop, D. J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276(5309), 71-74.
- Raghav, P. K., Mann, Z., Ahlawat, S., & Mohanty, S. (2022). Mesenchymal stem cell-based nanoparticles and scaffolds in regenerative medicine. *European journal of pharmacology*, 918, 174657.

- Redman, S. N., Oldfield, S. F., & Archer, C. W. (2005). Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater*, 9(23-32), 23-32.
- Ren, K., Wang, Y., Sun, T., Yue, W., & Zhang, H. (2017). Electrospun PCL/gelatin composite nanofiber structures for effective guided bone regeneration membranes. *Materials Science and Engineering: C*, 78, 324-332.
- Rodas-Junco, B. A., Canul-Chan, M., Rojas-Herrera, R. A., De-la-Peña, C., & Nic-Can, G. I. (2017). Stem cells from dental pulp: what epigenetics can do with your tooth. *Frontiers in Physiology*, 8, 999.
- Safran, M. R., & Seiber, K. (2010). The evidence for surgical repair of articular cartilage in the knee. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 18(5), 259-266.
- Schagemann, J. C., Paul, S., Casper, M. E., Rohwedel, J., Kramer, J., Kaps, C., ... & Reinholz, G. G. (2013). Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells via biomimetic and bioactive poly- ϵ -caprolactone scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part A*, 101(6), 1620-1628.
- Schiavone Panni, A., Del Regno, C., Mazzitelli, G., D'Apolito, R., Corona, K., & Vasso, M. (2018). Good clinical results with autologous matrix-induced chondrogenesis (Amic) technique in large knee chondral defects. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy*, 26, 1130-1136.
- Seçkin, U. D., Germiyan, Ö. S., & Uyanıkgil, Y. (2024). Osteoartritte Eklem İçi Hyaluronik Asit Enjeksiyonlarının Güvenliği: Sistematik Bir Gözden Geçirme ve Klinik Kullanımlarının Değerlendirmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 50(1), 113-119.
- Seo, S. S., Kim, C. W., & Jung, D. W. (2011). Management of focal chondral lesion in the knee joint. *Knee surgery & related research*, 23(4), 185.
- Shafiee, A., Kabiri, M., Langroudi, L., Soleimani, M., & Ai, J. (2016). Evaluation and comparison of the in vitro characteristics and chondrogenic capacity of four adult stem/progenitor cells for cartilage cell-based repair. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(3), 600-610.
- Shafiee, A., Soleimani, M., Chamheidari, G. A., Seyedjafari, E., Dodel, M., Atashi, A., & Gheisari, Y. (2011). Electrospun nanofiber-based regeneration of cartilage enhanced by mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical materials research Part A*, 99(3), 467-478.
- Shanmugasundaram, S., Chaudhry, H., & Arinzeh, T. L. (2011). Microscale versus nanoscale scaffold architecture for mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Tissue Engineering Part A*, 17(5-6), 831-840.

- Shao, X., Goh, J. C., Hutmacher, D. W., Lee, E. H., & Zigang, G. E. (2006). Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Tissue Engineering*, 12(6), 1539-1551.
- Sharifi, F., Irani, S., Azadegan, G., Pezeshki-Modaress, M., Zandi, M., & Saeed, M. (2020). Co-electrospun gelatin-chondroitin sulfate/polycaprolactone nanofibrous scaffolds for cartilage tissue engineering. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 22, 100215.
- Song, J. J., Aswad, R., Kanaan, R. A., Rico, M. C., Owen, T. A., Barbe, M. F., ... & Popoff, S. N. (2007). Connective tissue growth factor (CTGF) acts as a downstream mediator of TGF- β 1 to induce mesenchymal cell condensation. *Journal of cellular physiology*, 210(2), 398-410.
- Steadman, J. R., Rodkey, W. G., & Rodrigo, J. J. (2001). Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1976-2007), 391, S362-S369.
- Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D., & Scutt, A. (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mechanisms of ageing and development*, 129(3), 163-173.
- Süpüren, G., Kanat, Z. E., Çay, A., Kırıcı, T., vd. (2007). Nano Fibres (PART 2). *Textile and Apparel*, 17(2), 83-89.
- Sunar, B. S., & Hasçıçek, C. (2017). Elektroeğrilmiş nanoliflerin ilaç taşıyıcı sistem olarak ve doku mühendisliğinde kullanımı. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(3), 425-435.
- Şenocak, S. (2021). Nanoliflerden eğrilmiş ipliklerin örme performansı ve kumaş özelliklerinin araştırılması (Master's thesis, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi).
- Şentürk, A., fatih Coşkun, M., & Coşkun, D. (2012). Kalkon İçerikli Metakrilat Polimerinin Sentezi ve Karakterizasyonu. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 14(2), 81-92.
- Tammi, R., Ripellino, J. A., Margolis, R. U., Maibach, H. I., & Tammi, M. (1988, October). Hyaluronate accumulation in human epidermis treated with retinoic acid in skin organ culture. In *Journal Of Investigative Dermatology* (Vol. 91, No. 4, pp. 390-390). 350 MAIN ST, MALDEN, MA 02148: Blackwell Science Inc.
- Telemeco, T. A., Ayres, C., Bowlin, G. L., Wnek, G. E., Boland, E. D., Cohen, N., ... & Simpson, D. G. (2005). Regulation of cellular infiltration into tissue engineering scaffolds composed of submicron diameter fibrils produced by electrospinning. *Acta biomaterialia*, 1(4), 377-385.
- Timuçin, M., Öztürk, A., Bayramlı, E., Kahraman, S., Korkusuz, F., Korkusuz, P., ... & Durucan, C. (2008). Kemik ve kırık dokusu onarımına yönelik olarak yağ dokusundan farklılandırılmış hücre ve seramik/polimer kompozit içeren yapay dokuların geliştirilmesi.

- Tinge, J., Groothaert, M., op het Veld, H., Ritz, J., Fuchs, H., Kieczka, H., & Moran, W. C. (2000). Caprolactam. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 1-31.
- Topaloğlu, U., Ketani, M. A., & Saruhan, B. G. (2017). Kemik doku ve kemikleşme çeşitleri. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 10(1), 62-71.
- Toptaş, H. (2014). Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılmak üzere mezenkimal kök hücreler ile poli (ϵ -kaprolakton) scaffold arasındaki etkileşimin incelenmesi ve 3d doku modelinin geliştirilmesi.
- Tyyni, A., & Karlsson, J. (2000). Biological treatment of joint cartilage damage. Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports: Review Article, 10(5), 249-265.
- Unal, S., Arslan, S., Yilmaz, B. K., Oktar, F. N., Fıcaı, D., Fıcaı, A., & Gunduz, O. (2020). Polycaprolactone/gelatin/hyaluronic acid electrospun scaffolds to mimic glioblastoma extracellular matrix. Materials, 13(11), 2661.
- Upmeier, H., Brüggengjürgen, B., Weiler, A., Flamme, C., Laprell, H., & Willich, S. N. (2007). Follow-up costs up to 5 years after conventional treatments in patients with cartilage lesions of the knee. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 15(3), 249-257.
- Ülker, N. (2013). Işık-Etkili Kemik Doku Mühendisliği.
- Üstündağ, G. C., & Karaca, E. (2009). Elektro Çekim Yöntemi İle Alginat İçeren Nanolifli Yüzey Üretimi Ve Çapraz Bağlama İşlemi İle Suyu Dayanıklı Hale Getirilmesi. Tekstil ve Mühendis, 16(76), 1-10.
- Vacanti, C. A., & Vacanti, J. P. (2000). The science of tissue engineering. Orthopedic Clinics, 31(3), 351-355.
- Wang, J., Sun, B., Tian, L., He, X., Gao, Q., Wu, T., ... & Mo, X. (2017). Evaluation of the potential of rhTGF- β 3 encapsulated P (LLA-CL)/collagen nanofibers for tracheal cartilage regeneration using mesenchymal stems cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord. Materials Science and Engineering: C, 70, 637-645.
- Wang XinYing, W. X., Li DanXi, L. D., Li Wei, L. W., Peng JinHui, P. J., Xia HongYing, X. H., Zhang LiBo, Z. L., ... & Chen Guo, C. G. (2013). Optimization of mesoporous activated carbon from coconut shells by chemical activation with phosphoric acid.
- Wise, J. K., Yarin, A. L., Megaridis, C. M., & Cho, M. (2009). Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on oriented nanofibrous scaffolds: engineering the superficial zone of articular cartilage. Tissue Engineering Part A, 15(4), 913-921.
- Xu, C., Yang, F., Wang, S., & Ramakrishna, S. (2004). In vitro study of human vascular endothelial cell function on materials with various surface roughness. Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 71(1), 154-161.

- Xu, S., Lin, K., Wang, Z., Chang, J., Wang, L., Lu, J., & Ning, C. (2008). Reconstruction of calvarial defect of rabbits using porous calcium silicate bioactive ceramics. *Biomaterials*, 29(17), 2588-2596.
- Yang, G., Lin, H., Rothrauff, B. B., Yu, S., & Tuan, R. S. (2016). Multilayered polycaprolactone/gelatin fiber-hydrogel composite for tendon tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 35, 68-76.
- Yeşil-Çelikaş, Ö. (Yürütücü, 2020). Kıkırdak doku mühendisliği için sentezlenen yenilikçi sert bir hidrojelin mikroakıŷkan platformda üretilen nanopartikül ile fonksiyonelleŷtirilmesi ve in vivo denemeleri. TÜBİTAK Proje No: 117M843.
- Yoo, H. S., Lee, E. A., Yoon, J. J., & Park, T. G. (2005). Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 26(14), 1925-1933.
- Yu, F., Cao, X., Li, Y., Zeng, L., Yuan, B., & Chen, X. (2014). An injectable hyaluronic acid/PEG hydrogel for cartilage tissue engineering formed by integrating enzymatic crosslinking and Diels–Alder “click chemistry”. *Polymer Chemistry*, 5(3), 1082-1090.
- Zhang, B., Huang, J., & Narayan, R. J. (2020). Gradient scaffolds for osteochondral tissue engineering and regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(36), 8149-8170.
- Zhang, Z. Y., Teoh, S. H., Chong, M. S., Lee, E. S., Tan, L. G., Mattar, C. N., ... & Chan, J. (2010). Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. *Biomaterials*, 31(4), 608-620.
- Zhao, Y. Y., Yang, Q. B., Lu, X. F., Wang, C., & Wei, Y. (2005). Study on correlation of morphology of electrospun products of polyacrylamide with ultrahigh molecular weight. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 43(16), 2190-2195.
- Zhou, L., Gjvm, V. O., Malda, J., Stoddart, M. J., Lai, Y., Richards, R. G., ... & Qin, L. (2020). Innovative tissue-engineered strategies for osteochondral defect repair and regeneration: current progress and challenges. *Advanced healthcare materials*, 9(23), 2001008.
- Zong, X., Kim, K., Fang, D., Ran, S., Hsiao, B. S., & Chu, B. (2002). Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *polymer*, 43(16), 4403-4412.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : F***** K****

Telefon : 0 ***** ** 61

E-posta : *****ko*****@gmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite
Lisans	KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ, FEN FAKÜLTESİ , FİZİK Diploma Numarası: 2012/0201.20 Ağırlıklı Genel Not Ortalaması : 2.24 / 4.0
Yüksek Lisans	MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ , FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, FİZİK (TEZLİ) Diploma Numarası : 1842070076 Ağırlıklı Genel Not Ortalaması : 3.36 / 4.0
Doktora	MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ, FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, BİYOMALZEME VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ (YÖK 100/2000), KİMYA Diploma Numarası: -Mezuniyet – 01.08.2024 Ağırlıklı Genel Not Ortalaması : 3.72 / 4.0

Dil Bilgisi

Dil	Puan/Seviye
İngilizce (Yökdil Fen)	67,5
BARBARA BUSH PARENTAL SCHOOL	Level2 ve Level 3, dil sertifikası, TEXAS (USA), 2014

Ales
87,5

Sertifika
Deney hayvanları kullanım sertifikası (2021), HADYEK- MUDEM, MSKÜ
International Summer School on Materials for Energy Storage & Conversion, DÜZENLENEN YAZ OKULU, Uluslararası , 13 Temmuz 2023 - 16 Temmuz 2023.

Ar-Ge Yetkinlik

Makale Konu başlığı
F. KURU, M. B. COBAN, U. ERKARSLAN, A. DONMEZ, G. OYLUMLUOGLU, M. AYGUN & H. K. SUBASAT, Improved photoluminescence properties of one-dimensional (1D) composite fibers of Ho@PVP and Yb@PVP prepared by electrospinning, POLYHEDRON, 2023, 0277-5387, 242.
Y. ACAR, E. GUNGOR, M. B. COBAN, F. KURU & H. K. SUBASAT, Investigation of Structural, Morphological and Photoluminescence Properties of Electrospun Cu@PMMA Nanofibers, JOURNAL OF INORGANIC AND ORGANOMETALLIC POLYMERS AND MATERIALS, 2023, 1574-1443.
M. B. ÇOBAN, E. GÜNGÖR, Y. ACAR, F. KURU ALPASLAN & H. KARA SUBAŞAT, Multifunctional Dy@PVP and Ho@PVP one-dimensional nanofibers: electrospinning synthesis, luminescent and magnetic properties, journal of molecular structure , 2022, 0022-2860, 1272, 134117, 134117.
M. B. ÇOBAN, E. GÜNGÖR, Y. ACAR, F. KURU ALPASLAN & H. KARA SUBAŞAT, Eu@PMMA and Sm@PMMA nanofibers prepared by electrospinning: structure, morphology, luminescence and magnetic properties, CrystEngComm, 2020, 1466- 8033, 22, 37, 6116-6127
M. M. ALPASLAN, N. AKKUŞ, S. ÖZLEN & F. KURU ALPASLAN, Ortaokul Öğrencilerinin Fen Öğrenimine Yönelik Öz-Yeterlik Kaynaklar , Öz-Yeterlik, Akademik Başarılar ile Kariyer Yönelimi Arasındaki ilişkisinin incelenmesi, Eğitim Kuram ve Uygulama Araştırmalar Dergisi, 2019, 2149-7702, 5, 3, 352-360.
S.SARKAR, N.M. SALLEH, Ö.EROĞLU, F.KURU, A.A.ÖZEN, S.ASLAN, H.KARA SUBASAT, S.N.ABDUL HALİM, Electrochemical Properties of Electrospun Metal-Organic Frameworks (MOFs) Nanofibers as Novel Hybrid Electrode Materials (SUBMITTED)

Bildiriler

Bildiri İsmi
B. O. MERAL, Ö. EROÇLU, H. Ş. DERE, I. S. TUNCA, F. KURU, D. GENÇ & H. KARA SUBAŞAT, A PROMISING APPROACH TO THE PRODUCTION OF APPROPRIATE DRESSING MATERIAL BY ELEKTROSPINNING METHOD FOR DIABETIC FOOT WOUND TREATMENT, Poster Sunumu, TÜRK F Z K DERNEĞİ 39. ULUSLARARASI F Z K KONGRESİ, 30 Ağustos 2023, 04 Eylül 2023.
H. KARA SUBAŞAT, O. EROÇLU, H. Ş. DERE, I. S. TUNCA, F. KURU, E. EREN BELGİN, H. ÇİÇEK, D. GENÇ, Ö. BULUT, A. BÜLBÜL, L. TEKİN, G. AKBABA & S. SEZGİN, Determination of Accelerated Wound Healing Potentials in Rat with Type 1 Diabetic Foot Wound Model Using 3D PCL/GEL Nanofiber Tissue Scaffolds, Poster Sunumu, TÜRK FİZİK DERNEĞİ 39. ULUSLARARASI FİZİK KONGRESİ, 31 Ağustos 2023, 04 Eylül 2023.
H. Ş. DERE, Ö. EROÇLU, F. KURU, I. S. TUNCA, D. GENÇ & H. KARA SUBAŞAT, FABRICATION AND CHARACTERIZATION OF ELECTROSPUN PCL/CS NANOFIBROUS SCAFFOLDS FOR DIABETIC FOOT WOUND HEALING, Poster Sunumu, TÜRK FİZİK DERNEĞİ 39. ULUSLARARASI FİZİK KONGRESİ, 31 Ağustos 2023, 04 Eylül 2023.
I. S. TUNCA, Ö. EROÇLU, F. KURU, H. Ş. DERE, D. GENÇ & H. KARA SUBAŞAT, GEL/CS/DF-MSC 3D NANOFIBER-BASED SYSTEMS INTENDED FOR DIABETIC FOOT ULSER, Poster Sunumu, TÜRK FİZİK DERNEĞİ 39. ULUSLARARASI FİZİK KONGRESİ, 31 Ağustos 2023, 04 Eylül 2023.
F. KURU, H. SUBAŞAT, D. GENÇ & U. CANBEK, NEW 3D NANOFIBER SCAFFOLDS FOR CARTILAGE REGENERATION, Poster Sunumu, TÜRK FİZİK DERNEĞİ 39. ULUSLARARASI FİZİK KONGRESİ, 31 Ağustos 2023, 04 Eylül 2023.
Ö. EROÇLU, F. KURU, H. Ş. DERE, I. S. TUNCA, D. GENÇ & H. KARA SUBAŞAT, PCL/GEL/CS NANOFIBER SCAFFOLDS FOR DIABETIC FOOT WOUND HEALING; PHYSICOCHEMICAL AND MECHANICAL CHARACTERIZATION, Poster Sunumu, TÜRK FİZİK DERNEĞİ 39. ULUSLARARASI FİZİK KONGRESİ, 31 Ağustos 2023, 04
A. A. ÖZEN, F. , Ö. EROÇLU, S. ASLAN, S. N. ABDUL HALİM & H. KARA SUBAŞAT, Development of Metal?organic Framework Modified Carbon Paste Electrode for Supercapacitor Applications, Poster Sunumu, mESC-IS Materials for Energy Storage & Conversion, 17 Temmuz 2023, 21 Temmuz 2023.
H. KARA SUBAŞAT, F. , Ö. EROÇLU, H. Ş. DERE & . S. TUNCA, ELECTROSPUN PCL (POLYCAPROLACTONE) NANOFIBERS AND THEIR REINFORCED COMPOSITES: PREPARATION, MODIFICATION, APPLICATIONS, AND PERSPECTIVES, Poster Sunumu, mESC-IS Materials for Energy Storage & Conversion, 17 Temmuz 2023, 21 Temmuz 2023.
H. Ş. DERE, F. KURU, Ö. EROÇLU, A. A. ÖZEN, S. ASLAN, S. N. ABDUL HALİM & H. KARA SUBAŞAT, ELECTROSPUN SILICON DIOXIDE (SiO ₂) and POLYVINYDENE FLUORIDE (PVDF) NANOFIBERS FOR

SUPERCAPACITOR ELECTRODES, Poster Sunumu, mESC-IS Materials for Energy Storage & Conversion, 17 Temmuz 2023, 21 Temmuz 2023.
Ö. EROÇLU, F. KURU, A. A. ÖZEN, S. ASLAN, S. N. ABDUL HALİM & H. KARA SUBAŞAT, Electrochemical Properties of Polytetrafluoroethylene (PTFE) encapsulated in Polyvinyl alcohol (PVA) Nanofibers and Their Supercapacitor Application , Poster Sunumu, mESC-IS Materials for Energy Storage & Conversion, 17 Temmuz 2023, 21 Temmuz 2023.
S. N. ABDUL HALİM, Ö. EROÇLU, F. KURU, A. A. ÖZEN, S. ASLAN & H. KARA SUBAŞAT, Electrochemical properties of electrospun metal-organic frameworks (MOFs) nanofibers as new hybrid electrode materials for supercapacitor applications, Poster Sunumu, mESC-IS Materials for Energy Storage & Conversion, 17 Temmuz 2023, 21 Temmuz 2023.
İ. S. TUNCA, F. KURU, Ö. EROÇLU, A. A. ÖZEN, S. ASLAN, S. N. ABDUL HALİM & H. KARA SUBAŞAT, Electrospun Cellulose Acetate (CA) and Polyvinylidene Fluoride (PVDF) Nanofibers For Supercapacitor Applications, Poster Sunumu, mESC-IS Materials for Energy Storage & Conversion, 17 Temmuz 2023, 21 Temmuz 2023.
F. KURU, Ö. EROÇLU, A. A. ÖZEN, S. ASLAN, H. KARA SUBAŞAT & S. N. ABDUL HALİM, Electrospun activated carbon and polyacronitrile nanofibers for supercapacitor electrodes, Poster Sunumu, mESC-IS Materials for Energy Storage & Conversion , 17 Temmuz 2023, 21 Temmuz 2023.
O. EROGLU, H. KARA SUBAŞAT & F. KURU, YÜKSEK ANTİVİRAL ÖZELLİĞE SAHİP 3D ELEKTROSPUN NANOFİBER FİLTRE ÜRETİMİ , Özet Bildiri, 7. Uluslararası BATTALGAZ BİLİMSEL ÇALIŞMALAR KONGRESİ, 28 Ocak 2022, 29 Ocak 2022.
F. KURU ALPASLAN, K. ISAZADE & H. KARA SUBASAT, PROPOLIS YÜKLÜ PVA/CS BIYOBOZUNUR NANOLIF YARA ÖRTÜLERİNİN HAZIRLANMASI, Tam Metin Bildiri, 6. ULUSLARARASI GAP MATEMATİK-MÜHENDİSLİK-FEN VE SAĞLIK BİLİMLERİ KONGRESİ, 26 Haziran 2021, 27 Haziran 2021.
K. ISAZADE, F. KURU ALPASLAN & H. KARA SUBASAT, YÜKSEK ANTİBAKTERİYEL, MEKANİK VE FİLTRASYON ÖZELLİKLERİNE SAHİP HAVA FİLTRESİ ÜRETİMİ, Tam Metin Bildiri, 6. ULUSLARARASI GAP MATEMATİK-MÜHENDİSLİK-FEN VE SAĞLIK BİLİMLERİ KONGRESİ, 26 Haziran 2021, 27 Haziran 2021.
Ö. EROGLU, K. ISAZADE, S. GÖKÇE, F. KURU ALPASLAN & H. KARA SUBASAT, Dogal Lifler ile Polimerlerin Kompozit Olarak Isı Yalıtım Panellerinde Kullanılması, Özet Bildiri, Mugla Sıtkı Koçman Üniversitesi XI. Fen Bilimleri Araştırma E-Sempozyumu, 08 Ocak 2021, 08 Ocak 2021.
F. KURU ALPASLAN, U. ERKARSLAN & H. KARA SUBASAT, Elektroegirme ile Ho/PVP Nanoliflerin Hazırlanması, Özet Bildiri, Mugla Sıtkı Koçman Üniversitesi XI. Fen Bilimleri Araştırma E-Sempozyumu, 08 Ocak 2021, 08 Ocak 2021.
S. GÖKÇE, Ö. EROGLU, K. ISAZADE, F. KURU ALPASLAN & H. KARA SUBASAT, Organik Yan Ürünler Kullanılarak Vakum Yalıtım Panellerinin

Gelistirilmesi, Özet Bildiri, Mugla Sıtkı Koçman Üniversitesi XI. Fen Bilimleri Arastırma E-Sempozyumu, 08 Ocak 2021, 08 Ocak 2021.
K. ISAZADE, S. GÖKÇE, Ö. EROGLU, F. KURU ALPASLAN & H. KARA SUBAŞAT, Yüksek Performanslı Isı Yalıtım Malzemesi Biyopolimer/Silika Aerojel Üretimi, Özet Bildiri, Mugla Sıtkı Koçman Üniversitesi XI. Fen Bilimleri Arastırma E-Sempozyumu, 08 Ocak 2021, 08 Ocak 2021.
F. KURU ALPASLAN, H. KARA SUBAŞAT, M. B. ÇOBAN, Y. ACAR & E. GÜNGÖR, FABRICATION OF LUMINESCENT DY PVP AND HO PVP COMPOSITE NANOFIBERS BY ELECTROSPINNING, Sözlü Sunum, International Conference on Engineering Technologies , 19 Kasım 2020- 21 Kasım 2020.
F. KURU ALPASLAN, H. KARA SUBAŞAT & E. GÜNGÖR, PHOTOLUMINESCENCE PROPERTIES OF TETRANUCLEAR CUBANE LIKE NI II COMPLEXES, Sözlü Sunum, International Conference on Engineering Technologies , 19 Kasım 2020- 21 Kasım 2020.
S. GÖKÇE, K. ISAZADE, H. KARA SUBAŞAT, F. KURU ALPASLAN & M. B. ÇOBAN, DEVELOPMENT OF CORE MATERIALS FOR USE IN THE MANUFACTURING OF HIGH TEMPERATURE INSULATION PERFORMANCE VACUUM INSULATION PANEL, Sözlü Sunum, International Conference on Engineering Technologies , 19 Kasım 2020, 21 Kasım 2020.
K. ISAZADE, S. GÖKÇE, H. KARA SUBAŞAT, F. KURU ALPASLAN & M. B. ÇOBAN, PRODUCTION OF MODIFIED SILICA AEROGEL AS A NEW GENERATION INSULATION MATERIAL, Sözlü Sunum, International Conference on Engineering Technologies, 19 Kasım 2020- 21 Kasım 2020.
F. KURU ALPASLAN, H. KARA SUBAŞAT, M. B. ÇOBAN, Y. ACAR & E. GÜNGÖR, BIFUNCTIONAL LUMINOMAGNETIC EU@PMMA AND SM@PMMA NANOFIBERS, Poster Sunumu, International Engineering and Natural Sciences Conference, 04 Kasım 2020, 06 Kasım 2020.
F. KURU ALPASLAN, U. ERKARSLAN, H. KARA SUBAŞAT, M. B. ÇOBAN & E. GÜNGÖR, ONE-DIMENSIONAL LUMINESCENT COMPOSITE NANOFIBERS OF HO/PVP PREPARED BY ELECTROSPINNING, Poster Sunumu, International Engineering and Natural Sciences Conference, 04 Kasım 2020, 06 Kasım 2020.
F. KURU ALPASLAN & U. ERKARSLAN, SOLVOTERMAL YÖNTEM İLE SENTEZLENEN YENİ HOLMİYUM-HOMODİNÜKLEER KOMPLEKSİNİN KRİSTAL YAPISI, Poster Sunumu, MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLER ARAŞTIRMA SEMPOZYUMU, 20 Aralık 2018, 20 Aralık 2018.
M. M. ALPASLAN, H. IŞIK & F. KURU ALPASLAN, PERSONAL EPISTEMOLOGY AS PREDICTORS OF PHYSICS ACHIEVEMENT IN TURKISH HIGH SCHOOL STUDENTS, Sözlü Sunum, International Conference on Education in Mathematics, Science & Technology, 23 Nisan 2015, 26 Nisan 2015.
M. M. ALPASLAN & F. KURU ALPASLAN, Examining the Relationship Between Personal Epistemology and Self-Regulation Among Turkish

Elementary School Student, Tam Metin Bildiri, American Educational Research Association, 16 Nisan 2015, 20 Nisan 2015.

Projeler

221M075, Diş Folikül Mezankimal Kök Hücre Eksozomlar Ekilmiş Üç Boyutlu Nanofiber Doku skeleleri (Dermal Matris) Kullanılarak Tip 1 Diyabetik Ayak Yara Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Hızlandırılmış Yara iyileşme Potansiyellerinin Belirlenmesi, BİDEB Burslusu, Yürürlükte, MAG - Mühendislik Araştırma Destek Grubu, 1001 - Araştırma, ARDEB, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 14.03.2022 - Devam ediyor, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.11.2021 - 15.05.2024.

BİLİM VE TOPLUM, YARDIMCI PERSONEL, Mugla'nın Bilim Yolcuları, Yürütülen Kuruluş: MUĞLA İL MİLLİ EĞİTİM MÜDÜRLÜĞÜ, Destek Alınan Kuruluş: TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU BAŞKANLIĞI (Yurt İçi).

BAP, ARAŞTIRMACI, Origanum bilgeri P.H. Davis Ekstrakt ile Elde Edilen Nanolif Enkapsülasyonun HT-29 Kolon Kanseri Hücre Hattı Üzerine Etkisi, Yürütülen Kuruluş: BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: Balıkesir BAP (Yurt içi) (19.06.2020-19.06.2023). 27.000TL.

BİLİM VE TOPLUM, YARDIMCI PERSONEL, Mugla Bilim Ile Elele, Yürütülen Kuruluş: MUĞLA İL MİLLİ EĞİTİM MÜDÜRLÜĞÜ, Destek Alınan Kuruluş: BİLİM VE TOPLUM DAİRE BAŞKANLIĞI (Yurt İçi) , 01 Ocak 2019, 01 Aralık 2019.

Ödüller

Ulusal, Birincilik Ödülü, 11. FEN BİLİMLERİ ARAŞTIRMA E-SEMPOZYUMU, Ödül Alınan Kurum: MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE, 08 Ocak 2021.

Patentler

DERİ YARALARININ İYİLESMESİNE OLANAK SAĞLAYAN BİR YARA ÖRTÜSÜ KOMPOZİSYONU VE BUNUN ÜRETİMİ İÇİN BİR YÖNTEM, Mezenkimal Kök Hücre İçerikli Nanofiber, Patent Basvurusu, Ulusal, Basvuru No: 2024/006408, 19 Mart 2024

DİYABETİK HASTALIĞINDAN MÜZDARİP KİŞİLER İÇİN TAM YARALARIN İYİLEŞTİRİLMESİNE OLANAK SAĞLAYAN BİR KOMPOZİSYON, Buluş, biyomedikal mühendisliği ve farmakoloji teknik alanına ait olup; bununla sınırlı olmamakla birlikte özellikle diyabetik hastalığından müzdarip kişilerde görülen tam ve kronik yaraların (özellikle ayak

bölgesi) iyileşmesine olanak sağlayan bir kompozisyon ile ilgilidir., Patent Başvurusu, Ulusal, Başvuru No: 2024/002381, 28 Şubat 2024

BİDEB Destekleri

FATMA KURU ALPASLAN, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Burslar Müdürlüğü, 2211- A Genel Yurt İçi Doktora Burs Program , Destekleniyor, 2021 - 1, 01.03.2021 - 30.06.2025.

