

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERT DOKU ONARIMI İÇİN KİTOSAN TABANLI KRİYOJEL
BİYOMATERYALLERİNİN ÜRETİMİ VE *İN-VİTRO* UYGULAMASI

SELÇUK TOKLUCU

HAZİRAN 2015

ÖZET

SERT DOKU ONARIMI İÇİN KİTOSAN TABANLI KRIYOJEL BİYOMATERYALLERİNİN ÜRETİMİ VE *IN-VITRO* UYGULAMASI

TOKLUCU, Selçuk

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Mustafa TÜRK

Haziran 2015, 67 sayfa

Vücuttaki en sert dokulardan biri olan kemik, travma veya hastalık sonucunda meydana gelen hasarların iyileşmesi 3 ile 6 ay arasında zaman alan iyileşme süreci yavaş olan bir dokudur. Yalnızca ABD'de hastalık veya travma sonucu her yıl yaklaşık iki milyon kemik kırığı meydana gelmektedir. Bu tez çalışmasının amacı, çeşitli doku iskeleleri sentezleyerek onların sert doku grefti olarak kemik doku iyileşmesindeki potansiyel kullanılabilirliğinin araştırılması ve daha hızlı kemik iyileşmesi sağlamaktır. Bu amaçla, kitosan tabanlı 7 farklı doku iskelesi hazırlanmıştır. Kitosana ek olarak kollajen, hyaluronik asit, trombositçe zengin plazma (TZP) veya bunların kombinasyonları kullanılarak doku iskeleleri sentezlenmiştir. Yapılan taramalı elektron mikroskop analizleriyle (SEM) bu doku iskelelerinin hücresel çalışmalara uygun olduğu belirlenmiştir. Kemik doku rejenerasyonunda rol oynayan MC3T3-E1 pre-osteoblastik hücreleri, doku iskeleleri üzerine ekilerek farklı sürelerle inkübe edilmiştir (1, 3, 7 ve 10 günlük). Hücre içeren doku iskeleleri farklı inkübasyon sürelerinde alkalen fosfataz enzim aktivitesi, WST-1 testi kullanılarak hücre proliferasyonu ve sitotoksitesi ve SEM analizleri yapılarak hücre adezyonları değerlendirilmiştir. Özellikle üçüncü günde, hyaluronik asit ve trombositçe zengin plazma karışımının, %127,63 hücre canlılık oranı, %123,25 alkalen fosfataz enzim aktiviteleri ile hücre proliferasyonuna ve hücre tutunmasına pozitif etkileri en yüksektir. Üçüncü

gün ile kıyaslanırsa, yedinci günde tüm gruplarda hücre canlılığında azalma görülmesine rağmen hyaluronik asit ile desteklenmiş grupta en yüksek hücre canlılığı (%99,83) ve alkalen fosfataz aktivitesi gözlenmiştir (%137,33). Diğer yandan trombositçe zengin plazma destekli grupta en düşük hücre canlılığı (%82) ve alkalen fosfataz aktivitesine sahiptir (%113,65). Kültürün son gününde ise tüm gruplarda hücre canlılığı düşmüştür. Son deney günündeki en yüksek canlılık (%81,08) ve alkalen fosfataz aktivitesi (%97,71) kollajen-hyaluronik asit destekli gruptayken hyaluronik asit ile desteklenmiş grup ise en düşük canlılığına (%61,8) sahiptir. Özetlenecek olursa, trombositçe zengin plazmanın pozitif etkileri yedinci günde, hyaluronik asitin pozitif etkileri onuncu günde gözlemlenmemiştir. Trombositçe zengin plazma ve hyaluronik asitin geliştirilmesi, kontrollü degradasyonu ve salınmasıyla pozitif etkilerinden daha uzun süreli faydalanılarak sert doku defektlerinin daha hızlı iyileşmesi sağlanabilir.

Anahtar kelimeler: Hyaluronik asit, kemik doku mühendisliği, kemik rejenerasyonu, Kitosan, Kollajen, Sert doku mühendisliği, Trombositçe zengin plazma.

ABSTRACT

PRODUCTION AND *IN-VITRO* APPLICATION OF CHITOSAN BASED CRYOGEL BIOMATERIALS FOR HARD TISSUE REPAIR

TOKLUCU, Selçuk

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa TÜRK

June 2015, 67 pages

Bone, which is one of the hardest tissue in the body, heals slowly following its injury due trauma or disease and it takes 3 or 6 months to heal. Just in US, about 2 million cases of trauma or disease-related bone fractures occur every year. The aim of the present study was to synthesize various scaffolds and to investigate their potential use as hard tissue grafts to facilitate a process of faster bone healing. For this purpose, chitosan based 7 different tissue scaffolds were prepared. In addition to chitosan, scaffolds were synthesized of either collagen, hyaluronic acid, platelet-rich plasma or their different combinations. Scanning electron microscopic (SEM) analysis indicated that scaffolds were convenient for cellular assays. The MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells, which plays a role in bone tissue regeneration were seeded on scaffolds and incubated for different time periods (1, 3, 7 and 10 days). Scaffolds containing cells for different incubation periods were evaluated for alkaline phosphatase activity, cell proliferation and cytotoxicity by a WST-1 test, and cell adhesion by SEM analysis. Especially at the third day, the mixture of hyaluronic acid and platelet rich plasma exhibited the highest positive effect on cell attachment, cell proliferation with a 127.63% cell viability rate and on alkaline phosphatase activity with a 123.25% activity. Although the cell viability rate decreased in all groups at the 7th day of culture compared to those of the 3rd day, the

hyaluronic acid supported group had the highest rate of cell viability (99.83%) and alkaline phosphatase activity (137.33%). On the other hand, platelet-rich plasma supported group had the lowest cell viability (82%) and alkaline phosphatase activity (113.65%). At the last day of the culture, the cell viability rate declined in all study groups. Collagen-hyaluronic acid supported group had the best viability (81.08%) and alkaline phosphatase activity (97.71%) at the last day while hyaluronic acid supported group had the lowest cell viability (61.8%). In brief, we did not detect the positive effects of platelet-rich plasma's on cell proliferation at the 7th day and hyaluronic acid's at the 10th day and so on. Following enrichment and controlled degradation or delivery of platelet-rich plasma and hyaluronic acid, the positive effects can be utilized for a longer duration time to augment healing of hard tissue defects.

Keywords: Bone tissue engineering, Bone regeneration, chitosan, collagen, Hard tissue engineering, Hyaluronic acid, Platelet-rich plasma

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca hiçbir yardımı esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa TÜRK' e teşekkürlerimi sunarım..

Çalışmalarımın her aşamasında bana yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım Esra GÜNAYDIN, Canan ÇAKIR ÇOBAN, Rümeyza AKÇAPINAR, Sema TUNCER' e;

Yüksek lisans hayatımı birlikte geçirdiğim dönem arkadaşlarım Barış KAHYAOĞLU, Sıla CANPOLAT, Ramazan KOÇAK, Mehmet GÜVEN, Semih CERİT, Güven Emre SARIKAYA, İrem AKIN' a;

Çalışmalarım boyunca üniversitemizin hiçbir imkanını esirgemeyen Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı müdürlüğüne,

Eğitim hayatım boyunca yanımda olan, bana yol gösteren, maddi manevi hiçbir desteği esirgemeyen, babam Aydın TOKLUCU, annem Yıldız TOKLUCU, abim Abdullah Onur TOKLUCU ve babaannem Nebahat TOKLUCU' ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGE DİZİNİ	x
SİMGELER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. TEMEL BİLGİLER.....	4
2.1. Doku Mühendisliği	4
2.1.1.Sentetik Biyomateryaller	4
2.1.2.Doğal Türevli Biyomateryaller.....	5
2.2. Kemik İyileşmesi ve Kemik Rejenerasyonu	7
2.3. Kemik Rejenerasyonunda Görev Alan Biyolojik Büyüme Faktörleri:..	11
2.3.1.Trombositten Türemiş Büyüme Faktörleri: PDGF.....	12
2.3.2.Kemik Morfogenetik Proteinler: BMPs	12
2.3.3.Dönüşüm Büyüme Faktörü β : TGF- β	13
2.3.4.İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)	13
2.3.5.Fibroblast Büyüme Faktörü	13
2.4. Sentetik Polimerler.....	14
2.5. Doğal Polimerler	14
2.6. Konvansiyonel Doku İskelesi Hazırlama Teknikleri.....	15
2.6.1.Dondurarak Kurutma Metodu	16
2.6.2.Çözücü Dökümü-Parçacık Uzaklaştırma Metodu	17
2.6.3.Fiber Bağlama Metodu	18
2.6.4.Faz Ayrımı Metodu	18
2.6.5.Membran Laminasyonu	19

2.6.6.Elektro Spining Metodu	19
2.6.7.Gaz Köpükleştirme	19
2.6.8.Çapraz Bağlama.....	20
2.7. Biyomateryal Tipleri	23
2.7.1.Kitosan	23
2.7.2.Kollajen.....	26
2.7.3.Trombositçe Zengin Plazma (TZP).....	28
2.7.4.Hyaluronik Asit	30
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	34
3.1. Materyal.....	34
3.2. Yöntem	34
3.2.1.TZP'nin İzolasyonu	34
3.2.2.Çalışma Grupları	35
3.2.3.Kitosan Tabanlı Doku İskelelerinin Üretilmesi	36
3.2.4.Taramalı Elektron Mikroskobu(SEM) ile İnceleme- Karakterizasyon	41
3.2.5.Hücre Kültürü Deneyleri	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	46
4.1. Doku İskelelerinin SEM ile Görüntülenmesi.....	46
4.2. Hücre Kültürü Deneyleri.....	46
4.2.1.WST-1 Hücre Canlılık ve Proliferasyon Testi	46
4.2.2.ALP Alkale Fosfataz Enzimi Aktivitelerinin Ölçümü Testi	48
4.2.3.Hücre Ekimi Yapılmış Doku İskelelerinin SEM Görüntüleri.....	50
4.2.4.İkili Boyama ile Elde Edilen Hücrelerin Çekirdek Morfolojilerinin Analizi	53
5. TARTIŞMA.....	56
KAYNAKLAR	59
EKLER	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Kemik kırığının iyileşme fazında biyolojik maddelerin göreceli yoğunlukları.....	10
Şekil 2.2. Kemik rejenerasyon prosesinde görev alan biyolojik maddelerin fazlara göre değişimleri	11
Şekil 2.4. Çapraz bağlayıcı ajanlar	21
Şekil 2.5. Kitosan'ın gluteralehit ile çapraz bağlanması	22
Şekil 2.6. Genipinin kitosanı çapraz bağlama reaksiyonu	23
Şekil 2.7. Kitin, kitosan ve selülozun kimyasal yapıları	24
Şekil 2.8. İnsan kanının anti koagulant içeren tüpe alınıp santrifüj edildikten sonra oluşan fragmentleri	30
Şekil 2.9. Hyaluronan: basit bir polisakkarit olan hyaluronik asitin bazı biyolojik fonksiyonları	31
Şekil 3.1. TZP hazırlanırken 2. santrifüjden sonraki görünümü	35
Şekil 3.2. Flask üzerinde sağlıklı MC3T3-E1 Hücrelerinin görüntüleri	42
Şekil 3.3. Üretilen kitosan tabanlı doku iskelelerinin SEM görüntüleri	46
Şekil 4.1. MC3T3-E1 hücrelerinin zamana bağlı olarak proliferasyonlarındaki değişimler.....	48
Şekil 4.2. MC3T3-E1 hücrelerinin zamana bağlı olarak doku iskelesi üzerindeki alkalin fosfataz enzim aktiviteleri	50
Şekil 4.3. Hücre fiksasyonu yapılmış doku iskelelerinin SEM görüntüleri ...	51
Şekil 4.4. Hücre fiksasyonu yapılmış doku iskelelerinin SEM görüntüleri ...	52
Şekil 4.5. Fikse edilmiş hücrelerin floresan mikroskoptaki görüntüleri	53
Şekil 4.6. Doku iskelesi üzerinde 24 saatlik hücrelerin floresan mikroskoptaki görüntüleri	54

Şekil 4.7. 24 saatlik apoptotik nekrotik indeks.....	55
---	----

ÇİZELGE DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Doku mühendisliğinde kullanılan bazı doğal türevli biyomateryaller	6
Tablo 2.2. Çeşitli kemik hastalıkları sebep ve sonuçları	9
Tablo 2.3. Bazı sentetik polimerler kullanım alanları ve ticari ürünleri	15
Tablo 2.4. Bazı doku iskelesi hazırlama yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları	17
Tablo 2.5. Kollajenin vücut içerisinde buldukları yerler	27
Tablo 2.6. Bazı kollajen formlarının avantajları ve örnek uygulamaları	28
Tablo 2.7. Hyaluronik asit ile yapılmış bazı çalışmalar	33
Tablo 3.1. Kitosan tabanlı doku iskelesiyle hazırlanan çalışma grupları	36

SİMGELER DİZİNİ

µL:	mikrolitre
mA:	miliamper
kV:	kilovolt
nm:	nanometre
kDA:	kilodalton

KISALTMALAR DİZİNİ

ACL:	Anterior Cruciate Ligament, Ön Çapraz Bağ Ligamentleri
ALP:	Alkalen Phosphatase
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
RNA:	Ribonükleik Asit
PBS:	Phosphate Buffered Saline
FDA:	Food and Drug Administration
TZP:	Trombositçe zengin plazma
UV:	Ultraviolet

1. GİRİŞ

Doku mühendisliği, biyomühendislik, materyal bilimleri ve tıbbi bilimlerin prensip ve metotlarına dayanan; hastalık veya travmatik olaylar doğrultusunda gelişen doku fonksiyon kayıplarını gidermek üzere gelişmiş bir bilim dalıdır. Temel prensibi doku hasarlarını farklı kombine edilmiş sentetik veya doğal destek maddeleriyle veya doku iskeleleriyle doku rejenerasyonunu hızlandırmaktır. Doku mühendisliğinde temelde 4 yaklaşım mevcuttur. Bunlardan ilki yalnızca biyomalzemenin yeni doku oluşumu için kullanılmasıyken, diğer bir yaklaşım ise *in-vitro* koşullarda çoğaltılmış hücreler ile tedavinin gerçekleştirilmesidir. Üçüncü yaklaşım ise biyomalzeme ile büyümede rol oynayan biyosinyal molekülleriyle tedavi amaçlamaktadır. Son yaklaşım ise biyomateryal ve hücre sel etkileşimi en üst seviyeye çıkartmak amacıyla biyomateryal, *in-vitro* hücreler ve biyosinyal moleküllerini bir arada kullanmaktır [1].

Oluşturulmak istenen doku iskelesi ile dokunun, uygulama bölgesindeki çoğalma faktörlerinden de yararlanarak komşu dokularla birlik içerisinde normal iyileşme sürecinden daha hızlı yenilenme amaçlanır. Hastada oluşmuş olan defekt bölgesine uygulanacak olan doku iskelesinin; biyo uyumlu, defekt bölgesi ve tedavi amacına göre biyolojik olarak uygun degradasyon performansına, klinik uygulamalara ve uygulama alanındaki basınca dayanabilecek kadar mekanik kuvvete sahip olmalıdır [2].

Defekt bölgesine uygulanacak olan üç boyutlu doku iskelesinin bileşimi o bölgedeki hücrelerin doku iskelesi yüzeyine doğru yayılmasını doğrudan etkiler. Doku iskelesi materyali belirli bir zaman sonra biyolojik olarak degrade olacağından ve içeriğindeki maddelerin çevresine doğru salacağından dolayı hücrelere toksik etki yapmaması ve alerjik reaksiyon vermemesi beklenir [3]. Doku iskelesinin porozitesi de hücrelerin yayılmasını, tutunma yeteneğini, hücreler arası matriksin ve dolayısıyla çeşitli büyüme ve farklılaşma faktörlerinin geçişini etkileyeceğinden önemlidir.

Kitosan; bazı eklem bacaklıların kabuklarında, bazı bakteri ve mantarların hücre duvarlarında bulunan, doğal bir polimer olan kitinin yüksek sıcaklıkta alkali koşullarda *N*-deasetile edilmiş, asidik pH'da doğrusal davranış gösteren bir polimerdir. Farklı deasetile dereceleri mevcuttur. Kitosan biyo uyumluluğu yüksek, hemostatik, fungistatik, antimikrobiyal, memeli hücrelerini bağlama yeteneği olan ve kemik formasyonunu hızlandıran bir polimer olduğundan yara iyileşmesi, yara örtüsü, diyaliz membran, kontak lens, antitümör, ilaç taşıyıcı sistemler ve kontrollü salım sistemlerinde sıkça tercih edilmektedir [4].

Hasarlı kemik ve ön çapraz bağların (ACL) tedavisi uzun ve zahmetli bir prosestir. Bu nedenle araştırmacılar hastaların hasarlı veya kayıp bölgelerini tedavi etmek amacıyla biyomateryal uygulama ve vücut içerisinde barındırma yollarına yönlendirmiştir [5]. Bu kapsamda amaç otogreft olarak *in-vitro* koşullarda elde edilen yapay dokunun normal dokulara enjekte edilerek doku ve hücre rejenarasyonunu hızlandırmak, hastanın normal hayatına en kısa sürede dönmesini sağlayacak tedaviler uygulamaktır. Yalnızca birleşik devletlerde travma veya hastalık kaynaklı yıllık yaklaşık 2 milyon kemik kırığı meydana gelmektedir ve bunun yıllık maliyeti yaklaşık 10 milyar dolardır [6, 7]. Kemiklerde meydana gelen hasarlar, düzensiz şekilde olduklarından dolayı, biyomateryal üretimini kısıtlamaktadır. Bu yüzden tedaviler ya enjekte edilebilir şekilde sıvı veya çamur şeklindeki bir materyalle doldurulması gerekmekte veya kişiye özel materyaller geliştirilmesi gerekmektedir. Poli-metil-metakrilat ve kalsiyum fosfat tabanlı kemik dolgu materyalleri, enjekte edilebilir olduklarından kemik grefti olarak kullanılmaktadır. Ancak bu materyaller ekzotermik polimerizasyon proseslerinden ve kısıtlı rejeneratif potansiyellerinden dolayı günümüz doku hasarları için yetersiz kalmaktadır [6, 8-10]. Tedavi sürecini kısaltarak sert dokuların tedavisine yeni bir boyut kazandırmak, sert doku kayıplarını tamamlamak amacıyla bilim insanları bu yönde biyomalzemeler geliştirmek üzere çalışmaktadır.

Bu tez çalışmasında, sert dokularla uyumlu, doku rejenarasyonunu artıran ve böylelikle tedavi sürecini kısaltan tedavilere yeni bir boyut kazandırmak, sert

doku kayıplarını tamamlamak amacıyla kitosan tabanlı olarak farklı oranlarda doğal maddeler kullanarak kompozit malzemeler oluşturmak ve bunların sert doku hücrelerindeki hücre sitotoksitesini, hücre proliferasyonunu, alkalen fosfataz aktivitesini, varsa hücre ölümlerinin hangi yolla gerçekleştiğini, hücre adezyonunun belirlenmesidir. Özetlenecek olursa üretilecek olan doku iskelesinin, sert dokularda biyo uyumluluğunun araştırılıp potansiyel bir doku grefti olup olmadığının belirlenmesidir.

2. TEMEL BİLGİLER

2.1. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği; biyomühendislik, materyal bilimleri ve tıbbi bilimlerin prensip ve metotlarına dayanan; hastalık veya travmatik olaylar doğrultusunda gelişen doku fonksiyon kayıplarını gidermek üzere gelişmiş bir bilim dalıdır. Doku mühendisliğinin temel amacı, defekt dokuların yerlerine yerleştirilecek olan çeşitli tipteki biyomateryaller ile çevre dokulara fiziksel ve biyolojik olarak destek sağlayacak bir ortam oluşturmak ve dokunun veya organın yerini alacak, onaracak, biyolojik aktivitesini artıracak bir temel sağlamaktır.

Doku mühendisliği için üretilen biyomateryaller süngerimsi doku iskelesi formunda, membran, film veya sert dokulara destek verecek şekilde sert formda üretilir. Günümüzde doku mühendisliğinde kullanılan biyomateryaller, genel olarak üç grupta incelenir [11]. Bunlar;

1. Sentetik (Polimerler, metaller, seramikler, kompozitler)
2. Doğal türevli olanlar (Doku türevli, bitki türevli)
3. Yarı sentetik

2.1.1. Sentetik Biyomateryaller

2.1.1.1. Polimerler

Polimer biliminin özellikle 1950 yıllardan bu yana hızla gelişmesi, polimerlerin medikal uygulamalarda da kullanımını mümkün kılmıştır. Özellikle vücut üzerinde yük binmeyen bölgelerde kullanılan polimerler, işlenebilmeleri diğer biyomateryallere göre daha kolay olduğundan yumuşak dokularda tercih edilir. Vasküler protezler, kateterlerde, kontrollü ilaç salınımında, cilt ve

kırırdakta kullanılmaktadır. Modern biyopolimerler; sıvı, film, jel formunda; anti adezyon materyalleri dolgu materyalleri olarak kullanılmaktadır.

2.1.1.2. Metaller

Metaller, saf veya alaşım olarak vücut içerisinde güç gerektiren ortopedik bölgelerde tercih edilir. Tel, platin, vida, tüm veya yarım eklemi destekleyecek şekilde kullanılır. İmplantın bölgesine göre paslanmaz çelik, saf titanyum, titanyum alaşımı veya kobalt tabanlı alaşımlar kullanılır.

2.1.1.3. Biyoseramikler

Biyoseramikler, genellikle sert ve kırılımandır. Yük üzerindeki bölgelerde tercih edilirler. Bu yüzden dental restorasyonlarda ve ortopedik uygulamalarda kullanılırlar. Toz formundaki seramikler ise kemik kavitesini dolduran kemik çimentosu olarak kullanılan uygulamaları mevcuttur [11].

2.1.1.4. Kompozitler

İsminden de anlaşılacağı gibi kompozitler, daha verimli biyomateryaller üretmek amacıyla kombine edilen biyomateryallerdir. Sentetik, doğal veya her ikisini de içerebilir. Bu yüzden çok çeşitli uygulamaları mevcuttur.

2.1.2. Doğal Türevli Biyomateryaller

Doğal türevli polimerler, biyolojik sistemlerde metabolik yollar tarafından tanınır. Metabolizma tarafından sindirilebilir. Bu sayede, moleküler düzeyde dahi inflamatuvar etki daha düşüktür. Bunun yanı sıra, bazı doğal biyomateryaller, doku iyileşmesine ve entegrasyonuna katkı sağlayıcı

biyokimyasal sinyaller içerebilir. Ancak bunların tamamının dezavantajı ise düşük sıcaklıklarda bile hızlı degrade olmasıdır [11].

Bazı doğal biyomateryaller ve örnekleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Doku mühendisliğinde kullanılan bazı doğal türevli biyomateryaller

Proteinler	Aminoasit zincirleri	İpek, Kollajen, Elastin, Fibrin
Polisakkaritler	Şeker Zincirleri	Kitin ve türevleri, glikozaminoglikanlar

1933 yılında, fare tümör hücrelerinin biyoyumlu bir polimer membran içinde tavuk embriyosunun karın abdominal boşluğunda yaşatılabilirliği gösterildiğinde ilk doku mühendisliğinin konsepti tanıtılmış oldu [12]. Bundan birkaç yıl sonra Chick ve arkadaşları neonatal rat kökenli pankreatik B lenfositlerini sentetik kapillar ve perfüze olarak besi ortamında kültüre etmeyi başarmışlardır. Böylece insülin salımının glukoz konsantrasyonundaki değişimini izlemişlerdir [13]. 1981 yılında, Burke ve arkadaşları yanık tedavisi için kollajen doku iskeleleriyle fibroblast hücreli yapay deri üretmeyi başarmıştır ve halen klinik olarak kullanılmaktadır [14].

Doku iskelesi (scaffold), hücreler ve çeşitli biyolojik faktörlerle oluşturulan implante edilebilir veya enjekte edilebilir olması klinik açıdan son derece önemlidir. Doku iskeleleri implantasyon bölgesinin şekline ve pozisyonuna göre 2 boyutlu (2D) veya 3 boyutlu (3D) olabilmektedir. 2 boyutlu doku iskeleleri genellikle membran veya örtü şeklinde kullanılırken 3 boyutlu yapılar başta hücrelere mekanik destek sağlarken, çevre doku gelişmeye başlayıp yerini yeni dokuya bırakmaya başladığında doku iskelesinin bu yeni dokuyu engellememesi için biyo degrade olabilir olması istenir. Doku iskelesinin porozitesi ise içeriğine besin maddelerinin ve oksijen difüzyonunun gerçek hücrelerin ekstrasellüler matriksini taklit eder. Doku iskeleleri çeşitli çapraz bağlayıcılarla bağlanarak oluşturulduğundan

implantasyon aşamasından sonra vücut kimyasalı veya enzimatik yollarla parçalanabilir olmalıdır [15]. Kemik doku mühendisliğinde sentetik ve doğal inorganik seramik materyaller ilgi görmektedir [16]. Bunun nedeni hidroksi apatit ve trikalsiyum fosfat gibi bazı seramiklerin kemik dokusunun doğal inorganik bileşenlerine benzerliği ve osteokondüktif olma özelliğidir [17]. Ancak bu seramikler tek başlarına kırılabilir olduklarından mekanik özellikleri kemiğe göre zayıftır. Bu nedenle seramiklerin başka biyo malzemelerle birlikte kombine edilmesi gerekmektedir [18]. Yalnızca seramikten yapılmış doku iskelelerinden yumuşak dokulara uygunluğu beklenmemelidir. Bu tarz dokuların daha farklı hücre büyüme faktörleri ve mekanik özellik istekleri farklı olacağından biyo malzeme içeriği de farklı olmalıdır [18]. Diğer sentetik ve doğal polimerlerle bu tarz uygulamalar için çeşitli kombinasyonlarda polimerler oluşturulabilir ve biyo uyumluluğu artıran çeşitli destekleyici maddeler ile biyo uyumluluğu geliştirilebilir.

2.2. Kemik İyileşmesi ve Kemik Rejenerasyonu

İskelet sistemi, şüphesiz vücuda destek sağlayan en önemli sistemdir. Tüm hayat boyunca sürekli yenilenen iskelet sistemi, vücuda şekil verir ve yürümeye olanak sağlar. Bu sistemin ise en önemli parçaları kemiklerdir. Doğası gereği kemiklerin sert olması, olası bir kaza veya yaralanma durumunda lokal travma ile kırılabilir. Bu tip lokal travmaların haricinde, osteoporoz ve osteopenya gibi sistemik düzensizlikler nedeniyle kemik kayıpları oluşabilir. Her iki durumda da, doku mühendisliğinin amacı, klinik riskleri ve biyolojik sistemin tamamını göz önüne alarak minimum risk ve maksimum verimlilikte tedavi veya rejenerasyon stratejileri geliştirmektedir.

Çocukluk döneminde kemik yapımı, yıkımından daha hızlıdır. Bu durum 20'li yaşlardan sonra tersine döner. İleriki yaşlarda daha güçlü kemikler ve daha az kemik sistemik kemik kaybı için, bu dönemde yeteri kadar kalsiyum, D vitamini alınmalı ve egzersiz yapılmalıdır [19].

Travmalar haricinde oluşabilecek sistemik kemik rahatsızlıkları Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Olası kemik travmalarında oluşan kemik kırıklarının onarım uzun bir süreçtir. Kemik iyileşmesinde 4 ana adım vardır. Bunlar;

- 1) Hematoma formasyonu
- 2) Mezenşimal hücrelerin migrasyonu ve mitozu
- 3) Kıkırdak formasyonu ve kıkırdak ile kemiğin yer değiştirmesi
- 4) Şekillenme

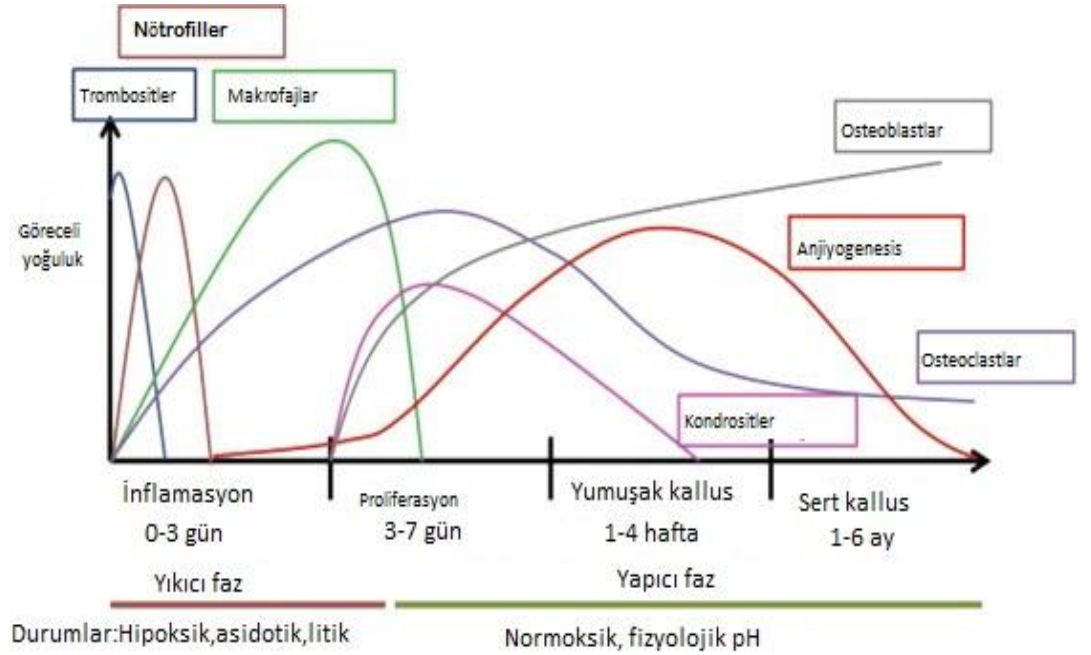
Kemik kırığı oluşumunun hemen ardından, travma bölgesindeki damarlar bu kırılmaya cevap olarak hematoma üretir. Hematoma, bir çeşit kan pıhtısıdır ve bu pıhtı lokalize olarak; trombositlerin, lökositlerin, makrofajların, fibrinlerin, sitokinler ve çözünebilir biyolojik büyüme faktörleri gibi kan ürünlerin bölgede yoğunlaşmasını sağlar [20]. Bu kemik iyileşme fazı yıkıcı faz olarak tanımlanır ve 3 gün içinde sonlanır. Bu süre boyunca inflamasyon ve lokal hipoksi gözlemlenir [20, 21].

Yıkıcı fazı yapıcı faz takip eder ve travmadan yaklaşık 3 gün sonra başlar. Endotel hücrelerinin göçü ve kapillar formasyonu ile yeni vasküler formasyon ile karakterize edilir. Yıkıcı fazdaki lokal hipoksi, yeni kan damarlarının oluşumunu tetikler. Bu oluşum; mezenşimal kök hücrelerin bölgede lokalize olmasını sağlar [20]. Lokal bölgede yoğunlaşan mezenşimal kök hücreler, kondrositlere ve osteoblast hücrelerine farklılaşır. Kondrositler kıkırdak matriks formasyonunda görev alacak iken, osteoblastlar yeni kemik yapımında osteoklastlar ile beraber kemik şekillenmesinde rol oynar. Kemik kırığının iyileşme fazlarında biyolojik maddelerin ve hücrelerin göreceli olarak zamana ve fazlara karşı olan değişimleri Şekil 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Çeşitli kemik hastalıkları sebep ve sonuçları [19]

Hastalık	Sebepleri	Sonucu	Açıklama
Düşük kemik dansitesi (osteopenia)	Genetik, vücut büyüklüğü, tetikleyici hastalıklar ve çevresel koşullar[22]	Zayıf ve kırılğan kemikler	Kemik dansitesinin normalden düşük olmasıdır. Ancak osteoporoz ile aynı değildir.
Osteoporoz	Yaşlılık, kalsiyum eksikliği, menapoz [23]	Ağrı ve deformatik kemik	
Osteogenesis imperfecta	Genetik [24]	Kırılğan kemik hastalığı	Vücutta yanlış kollajen sentezi sonucu ortaya çıkmaktadır.
Paget's kemik hastalığı	Viral veya genetik kaynaklı olabilmekte [25]	Zayıf, şekilsiz kemikler ve ağrı	Nadiren kansere dönebilmekte
Osteonekrosis	Uzun süreli steroid tedavisi alkol tüketimi eklem hasarları risk grubundadır	Zamanla kemik kaybı sonucu kırık	Kemiğe kan akışının yavaşladığı durumlarda meydana gelir
Kemik kanseri		Ağrı	3 farklı çeşidi genellikle 19 yaş altı çocuklar ve 40 yaş üzerinde görülmektedir [26].

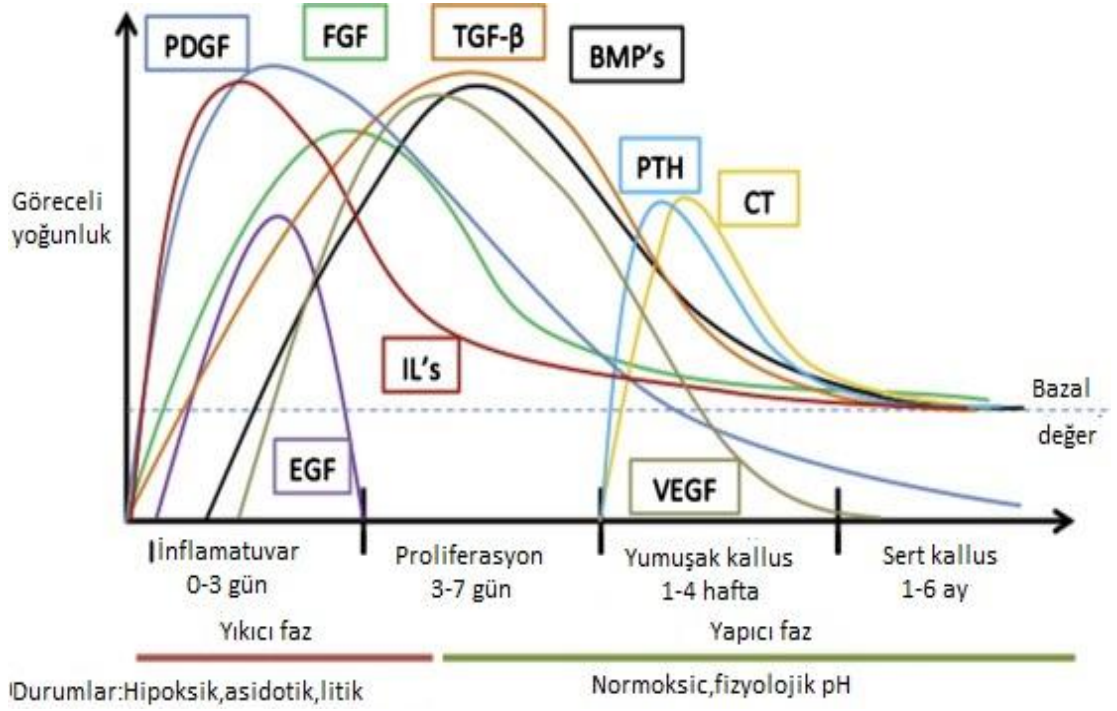
Kendiliğinden rejenere olamayacak kadar büyük kırıklarda, kemiğin sanki küçük bir kemikmiş gibi davranıp, kendi kendini hızlı bir biçimde rejenere etmesini sağlamak, doku mühendisliğinin ana hedeflerinden birisidir. Eğer kemiğin kendi kendini iyileştirme prosesleri taklit edilip, bu prosesleri hızlandırılacak yöntemler geliştirilirse, hastaların normal yaşamlarına dönme süreleri bir hayli kısılacaktır. Kemik rejenerasyonu için günümüzdeki klinik uygulamalar genellikle otogreftler ve allogreftler kullanılır. Bu uygulamalar geliştirilerek kemiğin doğasını bozmadan kemiğin doku rejenerasyon yeteneğini, terapötik yapıları düzenleyerek rejenerasyonu hızlandırmaktır. Bu yetenek biyolojik birçok sistem tarafından yönetildiği için müdahale edilmesi kompleks bir sistemdir fakat bu sistemin içeriğindeki ana proseslerde görev alan biyolojik maddeler, dışarıdan sağlandığında rejenerasyon güçlendirilebilir [20].



Şekil 2.1. Kemik kırığının iyileşme fazında biyolojik maddelerin göreceli yoğunlukları [20]

Osteokondüktif greftler kendi üzerlerindeki hücre topluluğunun yanında, kemik rejenerasyonu ile oluşacak olan hücrelerin adezyonu ve farklılaşması için uygun üretilmelidir. Üretim aşamasında kullanılacak olan kollajen gibi

peptit bazlı bileşenlerde hücre adezyonunu artıracaktır. Bunların yanı sıra greft içine hapsedilen büyüme faktörlerinin kontrollü olarak salınması, hücre proliferasyonunu, dolayısıyla biyomateryal kalitesini artırır. Hücre fenotipine bağlı olarak değişen bu biyolojik maddeler, doku rejenerasyonuna oldukça etkilidir. Bu biyolojik faktörlerin, kemik rejenerasyonundaki fazlara göre göreceli miktarları Şekil 2.2.'de belirtilmiştir.



Şekil 2.2. Kemik rejenerasyon prosesinde görev alan biyolojik maddelerin fazlara göre değişimleri [20]

2.3. Kemik Rejenerasyonunda Görev Alan Biyolojik Büyüme Faktörleri:

Büyüme faktörleri, özellikle doku greftlerinin verimliliğinde oldukça öneme sahiptir. Doku greftinin yapısındaki büyüme faktörlerinin kontrollü salınması, greft içerisindeki hücelere ve çevresindeki dokulara karşı uzun süreli hücresel çoğalma uyandırması beklenir. Böylece rejenerasyon hızlanmış olur. Büyüme faktörleri hücre membranı üzerindeki reseptörlere bağlanarak hücresel fonksiyonları çoğalma veya farklılaşmaya tetikler. Dolayısıyla kemik rejenerasyonundaki hücre çoğalması ve farklılaşması sağlanır. Kemik

morfogenetik proteinleri (BMPs), trombositten türemiş büyüme faktörleri (PDGF), dönüşüm büyüme faktörü (TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF-2) bunlardan bazılarıdır [27].

2.3.1. Trombositten Türemiş Büyüme Faktörleri: PDGF

Trombosit türevli büyüme faktörlerinin temel görevi yumuşak dokuların iyileşmesine yardımcı olmaktır. Ancak bu büyüme faktörü, periodental rejenerasyonda da denenmiştir [27-29]. *In-vitro* çalışmalarda PDGF, periodental dokularda hücre popülasyonunu; sementoblastların DNA sentezini arttırıcı ve osteopontin ekspresyonunu düzenleyici etkileri göstermiştir [27, 30].

Yamano ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, MC3T3-E1 hücrelerinin kullanıldığı *in-vitro* testlerde hücrelerin alkalen fosfataz enzim aktivitelerinin kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğu, hücre proliferasyonunda ise %20 ile %35 arasında artış olduğu tespit edilmiştir [31]. Aynı çalışmanın *in-vivo* testlerinde ise Lewis ratlarında PDGF'in yeni kemik hacmini ve kemik dansitesini arttırdığı gözlenmiştir [31].

2.3.2. Kemik Morfogenetik Proteinler: BMPs

BMP'ler TGF- β süper familyasının üyesidir ve oldukça etkili osteoindüktif etki gösterirler. Pluripotent hücrelere birincil sinyal göndererek, mineral depolayan osteoblastlara dönüşmesini tetikler [32]. BMP ayrıca kemotaksis, farklılaşma ve kemik hücrelerini mitozunda da önemli rol oynar. FDA tarafından da onaylanan bu biyolojik büyüme faktörü, ticari olarak uzun kemik kırılmalarında kollajen ile beraber tedavi amaçlı kullanılmaktadır.

2.3.3. Dönüşüm Büyüme Faktörü β : TGF- β

Dönüşüm büyüme faktörü β , yarasız cilt iyileşmesinde rol oynayan bir sitokindir [33, 34]. Bu yüzden TGF- β 'nin diğer dokularda da dokuların tamir mekanizmasında etkisi olacağı düşünülmüştür. Yapılan *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalar TGF- β 'nin kemik rejenerasyonuna olan etkilerini ortaya koymuştur. Farshid Sefat ve arkadaşlarının yaptığı *in-vitro* çalışmada MG63 insan kemik hücrelerinin; TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 ile desteklendiklerinde ilk 10-15 saatleri arasındaki proliferasyon oranı kontrol grubuna göre oldukça fazladır [33].

2.3.4. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)

İnsülin benzeri büyüme faktörünün insan metabolizmasındaki yeri oldukça farklıdır. Kan içerisindeki oranı düştüğünde özellikle yaşlı bireylerde sakatlık veya ölümcül sonuçlar doğurabilir. Birincil olarak karaciğerde üretilen bu büyüme faktörü vücudun diğer bölümlerinde de üretilmektedir.

IGF'lerin kemik mineral dansitesine olan etkileri ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. IGF oranındaki düşüş, aynı zamanda yaşa bağlı olarak kemik mineral dansitesinde düşüğe sebep olmaktadır. GH/IGF oranı kemik büyüme regülasyonunu ayarlayarak osteoblast farklılaşmasını sağlar. Kondrosit proliferasyonunu uyarır. Kemik kültürlerinde dolaylı olarak kemik resorpsiyonunu uyarıcı etki gösterir [35].

2.3.5. Fibroblast Büyüme Faktörü

Fibroblast büyüme faktörleri ise kemik defekti oluştuğunda 3 haftaya kadar yara iyileşme bölgesinde yoğun bir biçimde birden çok aktivite gösterir. Bunlardan birisi endotel hücrelerinin göçü ve anjiyogenesistir. Kemik yapımı fazında kondrosit hücrelerinin hareketi ve proliferasyonuna yardımcı olur [20].

2.4. Sentetik Polimerler

Sentetik polimerler hayvan türevli olmadığından dolayı genellikle immünojeniteleri düşüktür. Poroziteleri gaz ve besin alış verişi için ayarlanabilmektedir. Buna ek olarak sentetik doku iskelelerinin degradasyon hızı, kullanılan polimerin molekül ağırlığına, ko-polimer oranına ve molekülün dallanma şekline bağlıdır [36]. Bu özellikler ise kontrol edilebildiğinden dolayı doku iskelesinin degradasyon hızı, tedavi amacına bağlı olarak ayarlanabilir. Doku mühendisliğindeki doku iskelesi uygulamalarında sentetik degrede olabilen biyomateryaller olarak; poliglikolik asit (PGA), polilaktik asit (PLLA), polilaktikoglikolik asit (PLGA) gibi polimerler kullanılmaktadır [18]. Bu polimerlerin günümüzdeki kullanım alanları Tablo 2.3.'de özetlenmiştir.

2.5. Doğal Polimerler

Protein ve karbohidratlardan türetilen doğal polimerler birçok dokuların büyümesini hızlandırmak amacıyla kullanılmaktadır. Doku mühendisliğinde en popüler ve yaygın olan doğal polimer ise kollajendir [18]. Bunun dışında birçok polisakkarit formundaki doğal polimerler doku mühendisliğinde araştırılmaktadır. Bu doğal polimerler genellikle ekstraselüler matriks kompozisyonunu desteklemek amacıyla kullanılır [36]. Doğal polimerler tek başlarına kullanıldıklarında, degradasyon hızları yüksek olduğundan hasarlı veya iyileşme fazında olan dokularda verimleri kısa sürelidir. Bu yüzden doğal polimerlerin uzun süreli hizmet sunabilmesi için çeşitli proseslere tabii tutulurlar.

Tablo 2.3. Bazı sentetik polimerler kullanım alanları ve ticari ürünleri [37]

Polimer	Uygulama Alanı	Ürün
Poly (L-laktid)	Ortopedik cerrahi,Oral ve maksillofasiyel cerrahi	FixSorb system
Poly (L-lactide-co-D,L-lactide) 70/30	Ortopedik cerrahi,Oral ve maksillofasiyel cerrahi	Resorpin,Leadfix MacroSor System,Polypin
Poly (L-lactide-co-glycolide) 10/90	Cerrahi	Vicryl Suture,Vicry Mesh
Polyglycolide	Ortopedik Cerrahi	Biofix
Poly (D,L-lactide)		
Poly (D,L-lactide-Co-glycolide) 85/15		
Poly (D,L-lactide-Co-glycolide) 75/25		
Poly(D,L-lactide-Co-glycolide) 50/50		
Polycaprolactone	İlaç aktarımı	Capranor
Polyorthoester		
Polyanhydrides	Hayvan muayeneleri	

2.6. Konvansiyonel Doku İskelesi Hazırlama Teknikleri

Yıllardır doku mühendisliği için çalışan bilim insanları doğal ve sentetik polimerlerden porlu doku iskelesi yapısı hazırlamak için birçok teknik geliştirmiştir. Bu teknikler oluşturulmak istenilen doku iskelesinin fiziksel özelliklerine göre değişiklik göstermektedir.

Doku iskeleleri implantasyon yapılacak olan bölgenin özelliklerine göre iskelenin şekli ve ölçüleri, yüzey modifikasyonları, porozite kontrolü, por duvarı kalınlığı gibi özellikleri göz önünde bulundurularak hazırlanır.

Günümüzde bu özelliklere göre çeşitli doku iskelesi hazırlama yöntemleri gelişmiştir. Bunlardan bir kaçını dondurarak kurutma, membran laminasyonu, faz ayrımı, elektro eğirme (elektrospining), 3 boyutlu mikro plotting, hızlı prototipleme, mikropatening, melt molding, fiber bağlama, çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma, gaz köpükleştirme gibi metotlar bulunmaktadır. Bu metotlarla doku iskelesi fiber, porlu yapılar, kryojel, hidrojel ve membran yapısında elde edilebilir. Her bir metotun avantajları ve dezavantajları Tablo 2.4.'te özetlenmiştir.

2.6.1. Dondurarak Kurutma Metodu

Dondurarak kurutma genellikle üç boyutlu doku iskelelerinin üretiminde kullanılan bir yöntemdir. Biyomalzemeler uygun çözücüleri içinde çözülüp gerekli çapraz bağlayıcılarla bağlandıktan sonra bu metot uygulanır. Bu sayede porlu polimerik doku iskeleleri ve matrisleri üretilir [38]. Temel olarak dondurma ve kurutma aşamaları vardır. Prensip olarak katı hale geçirme (dondurma) ve düşük basınçta gaz formuna geçirmesine dayanır. Birçok liyofilizasyon prosesi desorpsiyon kurutmasıyla tamamlanır. Bu işlem uzun zaman alan bir prosestir. Doku mühendisliğinde kullanılacak matrisler kitosan jelatin gibi doğal polimerlerin dondurarak kurutma tekniğiyle birlikte doku iskelesi haline getirilir [38].

Tablo 2.4.Bazı doku iskelesi hazırlama yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları [39]

Metot	Avantajları	Dezavantajları
Dondurarak kurutma	Yüksek sıcaklığa dayanabilmesi ve filtreleme gerektirmemesi	Küçük por boyutları ve uzun proses süresi
Çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma metodu	Porositenin kontrol altında olması ve kristal yapıda olması	Sınırlı mekanik özellik, artık çözücü ve porojen malzeme
Fiber Bağlama metodu	Hücre adezyonu için yüksek yüzey alanı	Yapısal kararsızlık
Faz ayrımı metodu	Molekül aktivitesinin stabilitesi	Yapısal morfolojinin kontrol edilememesi
Membran laminasyonu	3-Boyutlu doku iskelesi üretimine elverişli	Mekanik mukavemetin düşüklüğü
Elektro spinning metodu	Porositenin, por büyüklüğünün ve fiber kalınlığının kontrol altında olması	Limitli mekanik mukavemet, por büyüklüğünün fiber kalınlığını düşürmesi
Gaz köpükleştirme	Ağır solvent içermemesi, porosite ve por büyüklüğünün kontrol edilebilmesi	Limitli mekanik dayanım, yetersiz porlar arası etkileşim

2.6.2. Çözücü Dökümü-Parçacık Uzaklaştırma Metodu

Bu metot doku mühendisliğinde 2 boyutlu doku iskelesi üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Polimer uygun çözücüsü içinde çözdürüldükten sonra çözeltinin içine şeker, inorganik tuz, parafin gibi porojen maddeler ilave edilir [40]. Ardından yatay bir yüzeyde çözücü uçarurur. Sonuç olarak polimer-

porojenden içeriğinde bir membran şeklinde katı polimerik yapı elde edilir. Bu yapı porojen çözücülerle etkileştirildiğinde porojenler yapıdan uzaklaşır ve geriye kalan kısım gözenekli süngerimsi yapı meydana gelir [41].

2.6.3. Fiber Bağlama Metodu

Bu metod fiber ağlarının birbirine bağlanması prensibine dayanır. Mikos ve arkadaşları tarafından ortaya atılmış bir tekniktir [41, 42]. Kısaca PGA fiberleri şekillendirilmek istendiği gibi dizilerek PLLA-Metilen klorid solüsyonuyla muamele edilir. Solventin uçurulmasından sonra, kompozitin sıcaklığı her iki bileşenin erime sıcaklığının üzerine çıkartılıp geri soğutulur. Daha sonra PLLA uygun çözücüyle çözülerek uzaklaştırılır. Kalan PGA fiberleri çapraz bağlantı noktalarından fiziksel olarak bağlanmış olur. Ancak bu metotla porozite kontrolü pek de mümkün değildir [43].

2.6.4 Faz Ayrımı Metodu

Polimerin düşük sıcaklıklarda eriyik fenol, naftalin veya dioksan gibi çözücülerde çözünür. Sıvı-sıvı veya katı-sıvı faz ayrımı solüsyon ısı düşürülerek indüklenir. Daha sonra katılaşmış solventçe zengin faz süblimleştirilerek uzaklaştırılmasıyla porlu polimer doku iskelesi ortaya çıkar. Bu metodun önemli bir avantajı ise matriks içerisinde biyoaktif moleküllerin aktivitelerinde düşüş olmadan doku iskelesiyle etkileşebilmeleridir [44]. Bu metodun optimizasyonu iyi yapılmalıdır çünkü parametrelerde yapılan ufak bir değişiklik bile polimer tipini, polimer konsantrasyonunu, termal dayanımını, por morfolojisini ve sayısını önemli ölçüde değiştirmektedir [44].

2.6.5. Membran Laminasyonu

Membran laminasyon metodu hızlı prototipleme alanındaki lamine obje üretimi ile benzerlik gösterir. Bilgisayar çizimiyle oluşturulan modelleme 3 boyutlu hareket eden bir numune işleyiciyle iskeleye dönüştürülür. Yüksek porlu doku iskeleleri için, PLLA veya PLGA membranları çözücü dökümü ve parçacık uzaklaştırma tekniği kullanılarak üretildikten sonra membranlar kloroformlar kaplanarak birbirine bağlanır. Böylece 3 boyutlu doku iskelesi yapıları elde etmek mümkündür [44].

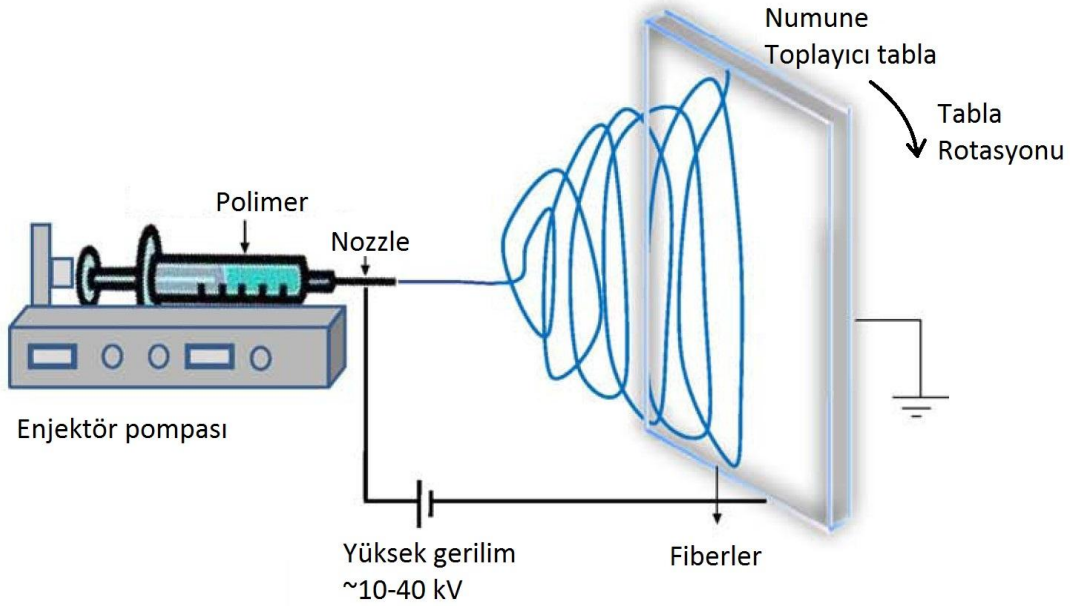
2.6.6. Elektro Spining Metodu

Elektro spining tekniği doku iskelelerinin sentezlenirken elektro statik güç kullanılarak mikro ve nano ölçekte doku iskeleleri sentezinde kullanılır. Bu metot ile 2 boyutlu membranlar üretilir. Bir şırınga içine hazırlanan polimer solüsyonu dakikada 15 µL gibi bir akışa ayarlanır. Şırınganın iğne metal ucunun yaklaşık 15-20 santimetrelük uzağına ise tabanı bakır levha kaplı bir hedef tahtası yerleştirilir. İğne uç ile bakır hedef tahtası bir güç kaynağına bağlanır. Güç kaynağıyla 10000 ile 20000 Volt arasında 10 mA altında bir akım verilir. Böylece şırıngadan çıkan malzeme karşıdaki bakır levhaya elektrik akımında yardımıyla aktararak 2 boyutlu yüksek sayılı ve küçük porlu bir membran üretilir. Elektro spining metotunun şematik olarak Şekil 2.3.'te gösterilmiştir.

2.6.7. Gaz Köpükleştirme

Bu metotla yüksek basınçlı enjeksiyonlama sistemiyle üretilmiş olan 3 boyutlu polimer yapıları uzun süreli yüksek basınçlı karbondioksit maruz bırakılır. Böylelikle karbondioksitin polimerle etkileşmiş yüzeylerinde kapalı porlar meydana gelir. Bu yöntem polimerlerin porozitesini artırmanın yanında kapalı porlar oluşturduğu için polimer içindeki akım sınırlanır. Bu yüzden bu metot

farklı metotlarla birlikte kullanılarak polimer sentezinde destekleyici olarak kullanılan bir metottur [45].


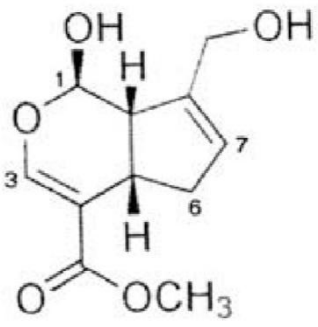
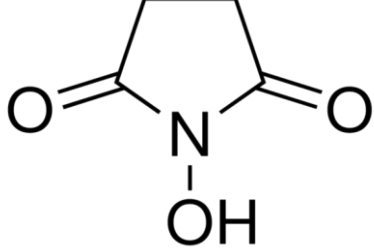
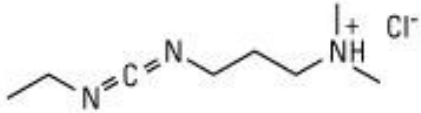


Şekil 2.3. Elektrosponing metodu [46]

2.6.8. Çapraz Bağlama

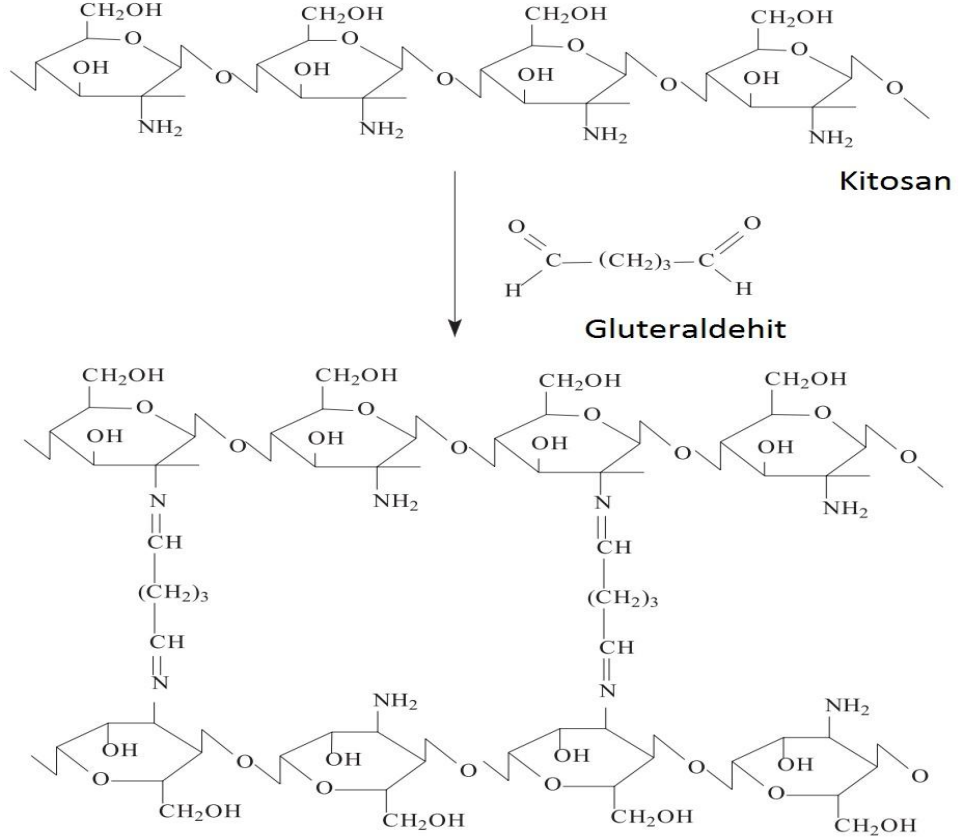
Çapraz bağlama biyo degrede olabilir polimer doku iskeleleri için oldukça önemli bir kimyasal ve/veya fiziksel bir modifikasyondur. Çünkü doku iskelelerinin implantasyon aşamasından sonra degrede olma sürelerinin uygun olması gerekmektedir. Eğer doku iskelesi defekt bölgesi daha iyileşmeden degrede olursa bu doku mühendisliği çalışmasının başarısız olduğu anlamına gelir. Eğer doku iskelesi yıkılması geç olursa hücreler arası matriksi engelleyebilir buda yeni hücreler için çoğalmayı yavaşlatır. Bu yüzden hazırlanacak olan doku iskelesinin çapraz bağlayıcısı implantasyon bölgesine uygun olarak seçilmeli ve uygun oranlarda uygun tekniklerle kullanılmalıdır. Piyasada birçok farklı çapraz bağlayıcı ajanlar mevcuttur. Bunlara örnek verilecek olursa gluteraldehit, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide (EDC veya EDAC) ve N-hidroksisüksimid (NHS) polimerin

çapraz bağlanmasında kullanılan bazı ajanlardır. Bu çapraz bağlayıcıların şematik olarak Şekil 2.4.'te gösterilmiştir.

Çapraz Bağlayıcı Ajan	Kimyasal Yapısı
Gluteraldehit	
Genipin	
N-hidroksisüksimid	
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide (Edac veya EDC)	

Şekil 2.4. Çapraz bağlayıcı ajanlar [3]

Gluteraldehit serbest halde amin gruplarına sahip bir çapraz bağlayıcıdır ve kollajen tabanlı biyomateryal üretiminde en çok kullanılan çapraz bağlayıcıdır [47-50]. En büyük avantajı, proses sürecinin çok kısa sürmesidir. Bunun yanında kitosan ve kollajen gibi moleküllerini biyomateryal yapısı oluşturacak kadar sıkı bağlayabilme yeteneğidir [51]. Gluteraldehit ile kitosanın kimyasal çapraz bağlanma prosesi Şekil 2.5.'te gösterilmiştir.

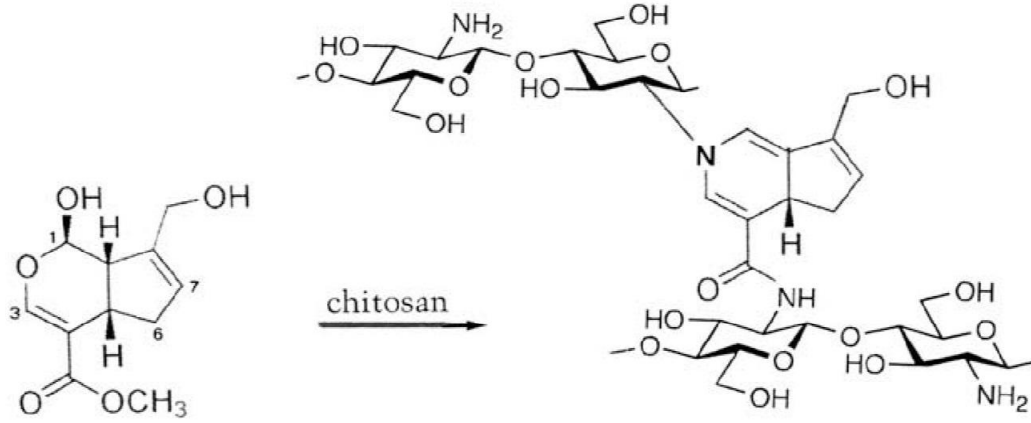


Şekil 2.5. Kitosan'ın gluteraldehit ile çapraz bağlanması [52]

EDC ve NHS gibi amid tipindeki çapraz bağlayıcı ajanlar düşük toksisite gösterdikleri gibi diğer çapraz bağlayıcılarla uyum gösterirler.

Genipin ilk olarak Meksika ve Güney Amerikada yetişen *Genipa americana* bitkisinden izole edilmiştir [53]. Geleneksel tıbbi tedavi yöntemlerinde *Gardena jasminoides* ekstratları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu organizmanın geniposid ihtiva eder ve intestinal bakterileri sayesinde enzimatik olarak genipine hidrolize edilir. Genipinin farmakolojik etkileri göze çarpmaktadır. Yiyecek ve boya endüstrisinde kullanılmaktadır [53]. Bunlara ek olarak genipinin anti-inflamatuar ve anti anjiyogenesis ajanlarına karşı oldukça etkili olduğu, lipit peroksidasyonunu ve nitrik asit üretimini baskıladığı, hipokampal nöronlarını Alzheimer amloid beta proteininden koruduğu saptanmıştır [53, 54]. Bunun yanı sıra genipin, doku mühendisliğinde çapraz bağlayıcı ajan olarak da kullanılmaktadır. Kitosan

gibi biyo polimerlerin çapraz bağlanmasında, doku iskeleti aygıtlarının sentezlenmesinde genipinden faydalanılır. Genipinin kitosanı çapraz bağlama reaksiyonu Şekil 2.6.'da gösterilmiştir [53].



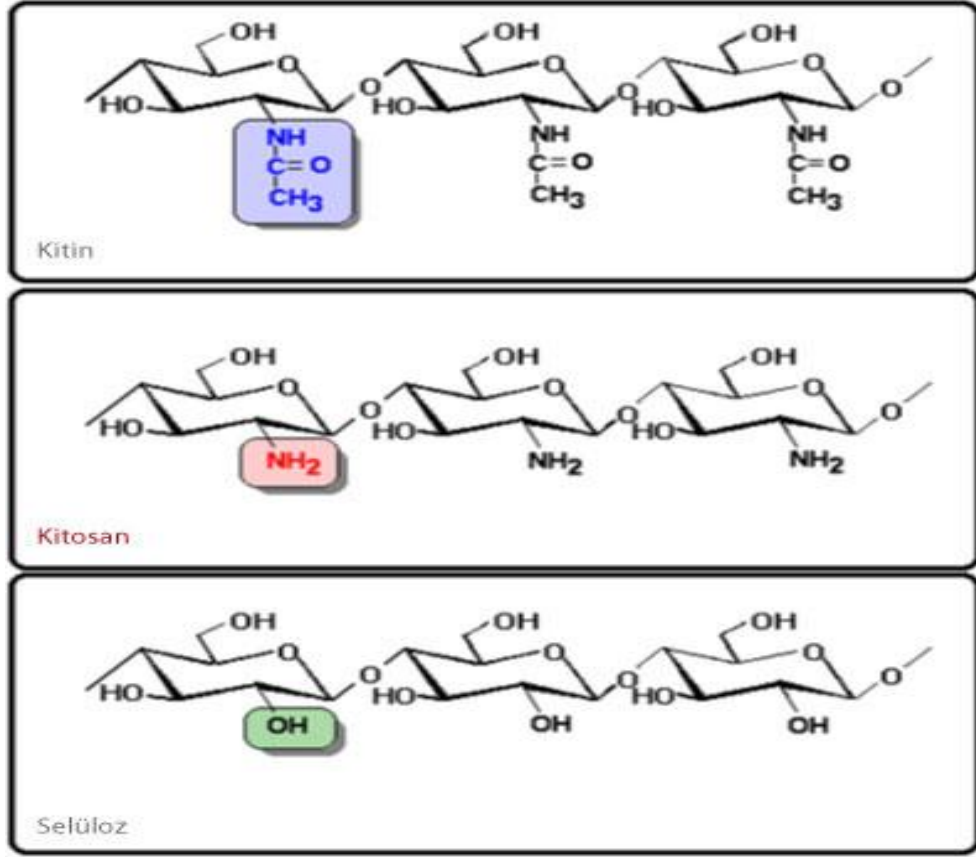
Şekil 2.6. Genipinin kitosanı çapraz bağlama reaksiyonu [53]

2.7. Biyomateryal Tipleri

2.7.1. Kitosan

Kitosan, 1859 yılında ilk kez Rouget tarafından derişik potasyum hidroksit çözeltisinde kitinin ısıtılması sonucu bulunmuştur. *N*-asetil-D-glukozaminden oluşan kitosanı selüloza benzer bir yapıya sahiptir. Yüksek sıcaklıkta alkali koşullarda doğrusal davranış gösterir. Farklı deasetile derecelerinde üretilmiş formları mevcuttur. Kitosan biyo uyumluluğu yüksek, hemostatik, fungistatik, anti-mikrobiyal, memeli hücrelerini bağlama yeteneği olan ve kemik formasyonunu hızlandıran bir polimer olduğundan yara iyileşmesi, yara örtüsü, diyaliz membran, kontak lens, anti-tümör, ilaç taşıyıcı sistemler ve kontrollü salım sistemlerinde sıkça tercih edilmektedir [4]. De-asetilasyon derecesine bağlı olarak kitosanda %5 ile %8 (w/v) arasında azot bulunur [4]. Reaktif amino gruplarına sahip olan kitosan, amin bağlayıcı ajanlarla modifikasyona açık bir polimerdir. Bu kimyasal yapı, kitosana diğer polimerler ile çapraz bağlanılabilirlik ve hücre adezyonunu artırıcı özellik sunar. Kitin,

kitosana göre daha inerttir. Bu yüzden tercih edilmez. Kitin, kitosan ve selülozun kimyasal şematik şekilleri Şekil 2.7.'de verilmiştir.



Şekil 2.7. Kitin, kitosan ve selülozun kimyasal yapıları [55]

Kitosanın piyasada düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı formları bulunmaktadır. Asidik ortamda çözünen kitosan genellikle çok düşük konsantrasyondaki formik asit, sitrik asit ve asetik asit içerisinde çözdürülürler. Kitosanın iki önemli avantajı mevcuttur. Bunlardan ilki içeriğindeki serbest amin gruplarından dolayı pozitif yüklü bir polimerdir. Diğeri ise çoğu kitosan ürününün molekül ağırlığının fazla olmasıdır ki bu da vücut yüzeyine nüfusu kolaylaştırır. Ucuz maliyetli olmaları ve hyaluronik asit gibi diğer polisakkaritler ile birlikte kullanıma elverişli olması sayesinde piyasadaki nemlendirici krem, losyon, oje, tırnak kaplaması, ruj , far, banyo ürünlerinde; dermatolojik yaşlanma karşıtı ve kırışık karşıtı ürünlerde de kullanılmaktadır [4].

Kitosan doku mühendisliği çalışmalarında yara örtüsü, ilaç taşıyıcı sistemler ve defekt sonucu oluşan boşlukların doldurulmasında implant görevi görmektedir. Kitosan diğer polimerlerle karşılaştırılacak olursa, poli katyonik doğası sayesinde kitosan doku mühendisliğinin ilerlemesinde önemli bir rol üstlenmiştir. Kitosanın bu özelliği hücreleri polimerin üzerine çekerek aktivitelerini artırdığı gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalarla bu özelliğin yüzde deasetilasyon derecesiyle ilgili olduğu tespit edilmiştir.

2000 yılında Prasitsilp ve arkadaşları farklı kaynaklardan elde edilen kitosanın asetilasyon derecesinin *in-vitro* koşullarda hücreler üzerine etkisini incelemişlerdir [56]. İki farklı kaynaktan elde edilen kitosan 4 farklı substratıyla 10 farklı deasetilasyon derecesinde denenmiş ve sonuç olarak yüksek asetilasyon derecesine sahip kitosanın hücreler için daha tutunulabilir olduğunu ortaya koymuştur [56].

Kitosan, doku mühendisliği çalışmalarında diğer materyaller ile uyum içerisindedir. Poli-glikolik asit/kitosan kompleksinde, poli-laktid/kitosan/heparin kompleksinde, kitosan/tioglikolik (CH/TGA) asit konjugatıyla olan komplekslerinin de hücre adezyonunu artırdığı gözlemlenmiştir [57-59].

Kitosanın ayrıca yara iyileşmesi ve yara örtüsü kullanımında iyileşme prosesini hızlandırdığı gözlenmiştir. Rejenere kitin fiberleri, dokuma olmayan matlar, süngerimsi iskeleler ve filmler yara iyileşmesini %30'a kadar hızlandırmıştır. Kitin ayrıca normal biyomedikal materyal olarak kullanılmaktadır. Kitin veya kitosanla kaplanmış standart ipek veya dikiş ipliklileri, tamamı kitin fibrinlerinden oluşan yapılara çok yakın etki göstermiştir [60, 61]. Kitin kaplı cerrahi gazlı bez ise kaplamasız kontrol grubuna göre hücre iyileşme aktivitesinde oldukça olumlu aktivite göstermiştir.

Kitosan yara iyileşmesinde kullanılmak üzere sert, su emici biyouyumlu filmler olarak tasarlanabilir. Bu filmler yanık yarasına direk olarak uygulanabilir. Kitosanın yanık yarasındaki başka bir avantajı ise mükemmel

oksijen transfer yeteneğidir. Yanık yarasının oksijen ihtiyacının fazla olmasından dolayı önemlidir. Bunun yanı sıra kitosan suyu emebilen ve vücut içerisinde ekstrasellüler enzimlerle doğal olarak biyo degrede olabildiği için uygulama sonrasında vücuttan çıkarılması gerekmez. Çoğu yanık yaralanmalarında yanık için uygulanan materyali çıkartmak yara bölgesine oldukça zarar vermektedir [61].

Köpeklerin abdominal yüzeylelerinde ameliyat neşteriyle oluşmuş yaralarda ve deri altı dokularında kitosan ve tuz çözeltisiyle tedavide fibroblastik iyileşme sağlandığı bildirilmiştir [62]. Yapay deri tasarımı, uzun süreli kronik yaralanmalardaki uygulamaları neodermal doku sentezi için biyo degrede olabilir bir doku mühendisliği ürünüdür [56]. Bu da kitosan polisakkaritlerinin yapısal karakteristik özelliklerinin glikoz amino glikanlarla karşılaştırıldığında deri onarımına zemin hazırladığını gösterir [63, 64]. Günümüzde halen daha araştırmalar kitosandan yapılan malzemelerle plastik cerrahi teknikleri üzerine yoğunlaşmaktadır.

Doğal polisakkaritlerin ilaç salımı için tasarımları da mevcuttur [65, 66].

2.7.2. Kollajen

Kollajen vücut içerisinde en çok bulunan proteindir. Genellikle bağlayıcı dokularda bulunur. Uzun, sert ve 3 adet polipeptit zincirinin birbirine bağlanmasıyla oluşur. Bu üçlü polipeptit zincir yapısı alfa-heliks olarak adlandırılır ve birbirlerine hidrojen bağlarıyla bağlıdırlar [67]. Vücudun her yerinde bulunabilir ancak yapıları buldukları yere göre farklılık gösterebilmektedir. Bazı kollajen tipleri ve vücutta buldukları yerler Tablo 2.5.'te verilmiştir.

Kollajenin fibril yapısından dolayı gerilme kuvvetine dayanıklıdır. Vücutta daha çok hareketli ve gerilme kuvvetinin olduğu yerlerde bulunur. Vücuttaki bulunuş yerlerine göre fibril dizilimleri değişkenlik gösterir. Örneğin derideki

kollajen fibrilleri her yönden oluşabilecek gerilme kuvvetine dayanıklıyken, tendon ve ligamentlerde bulunan kollajen fibrilleri tek doğrultudaki gerilme dayanıklıdır [68].

Tablo 2.5. Kollajenin vücut içerisinde buldukları yerler

Kollajen Tipi	Bulunduğu Bölge
Kollajen tip I	Kemik, deri, kas, kornea, damar çeperleri
Kollajen tip II	Vertebral disk, hiyalin kırıldak
Kollajen tip III	Fetal deri, kan damarları
Kollajen tip IV	Temel membranlarda ve kasta
Kollajen tip IIX	Epitel altı yassı tabakalarda
Kollajen tip IX	Kırıldak
Kollajen tip XII	Tendon ve ligamentler

Diğer proteinlerle karşılaştırıldığında kollajen antikora bağlanma yeteneğinden dolayı daha zayıf immünojenik bir moleküldür [69]. Cooperman ve Michael'in yaptığı klinik araştırmalar bovin tipindeki kollajenlerin popülasyonda %2-4 alerjik etki yaptığını göstermektedir [70].

Kollajen; düşük antijenitesi, düşük inflamatuvar etkisi ve düşük toksisitesinden dolayı doku iskelesi üretiminde tercih edilen doğal bir materyaldir. Son yıllarda, kollajen bazlı biyomateryal alanında birçok yenilikler ortaya çıkmaktadır. Kemik rejenarasyonunda enjekte edilebilir halde kollajen doku iskelelerinden üretim ve çapraz bağlama konusunda birçok metot geliştirilmiştir. Kollajen tabanlı biyomateryaller formları ve çeşitlerine göre avantajları değişiklik göstermektedir. Bazı kollajen biyomateryal uygulamalarının avantajları ve uygulama alanları Tablo 2.6.'da verilmiştir.

Tablo 2.6. Bazı kollajen formlarının avantajları ve örnek uygulamaları [67]

	Doku Tabanlı Kollajen	Saflaştırılmış Kollajen
Avantajlar	Düşük immünite	Düşük immünite
	Devamlı kararlılık	Kontrollü turnover
	Hücre matriks interaksiyonu	Hücre matriks interaksiyonu
	Mekanik güç	Trombosit interaksiyonu
		Fibril reformasyonu

Örnek Uygulamalar	Kalp kapakçıkları	Enjekte edilebilir kollajen
	Damar stentleri	Yanık örtüsü
		Yara örtüsü

2.7.3. Trombositçe Zengin Plazma (TZP)

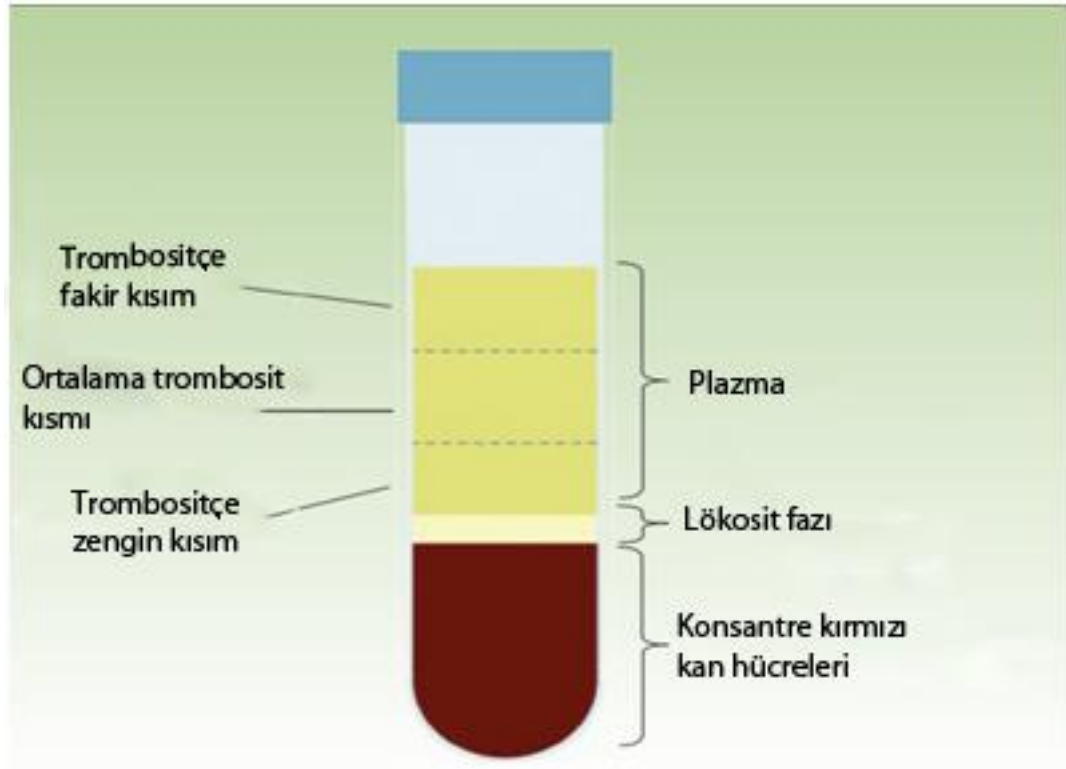
Trombositçe zengin plazma (TZP); kan plazmasının trombosit konsantrasyonu yüksek olan düşük hacimdeki bölümüdür. İçeriğindeki trombositlerden türemiş büyüme faktör (PDGF), değişken büyüme faktörü (TGF- β) ve insülin büyüme faktörü (IGF-1) gibi fibrinler, fibronektinler ve vitronektin proteinleri sayesinde hücre adezyonunun artırılması ve kemik formasyonu, bağlayıcı doku ve epitelyum için matriks gibi davranır [71, 72]. TZP'nin kan plazması içerisindeki bölümü Şekil 2.8.'de gösterilmiştir. Bunların yanı sıra trombositlerin doku rejenerasyonunda önemli görev alır. Bir doku veya vasküler yaralanmanın ardından trombositler aktif hale gelir ve çökelti oluştururlar. Trombositlerin bu hareketi proteinlerin sekresyonuna ve diğer biyolojik aktif moleküllerin tetiklenmesiyle doku iyileşme sürecinin dolaylı yoldan tetiklenmesini sağlar [73]. Teorik olarak trombositçe zengin plazmanın da bu süreci hızlandıracağı düşünülmektedir. Klinik gözlemler sonucunda TZP'nin hücre proliferasyonunu indüklediği ve anti-inflamatuar karakteristiğinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır [73]. TZP'nin ayrıca *in-vitro*

koşullarda birçok mikroorganizmaya karşı anti-mikrobiyal aktivite gösterdiği yapılan çalışmada gösterilmiştir [74, 75].

In-vitro hücre kültürü deneylerinde TZP, tıpkı klinik uygulamalardaki gibi hücre proliferasyonunu artırmaktadır. TZP ile kombine edilen biyomateryallerde ise TZP'nin biyomateryal üzerine adezyonunu artırdığı gösterilmiştir [76].

Yong Wen ve arkadaşlarının yaptığı bir *in-vitro* çalışmada ise göbek kordonundan izole edilmiş mezenşimal kök hücreler, kemik dokusu için aday hücrelerdir. Bu hücreler tek tabanlı hücre kültürlerinde yüksek hızda proliferasyon gösterdiklerinden dolayı kemik doku rejenerasyonunda kullanılabilme potansiyeli yüksektir [77, 78]. Bu hücreler ile TZP'nin kombine edildiğinde bu hücrelerin proliferasyonunun daha da arttığını göstermiştir [79].

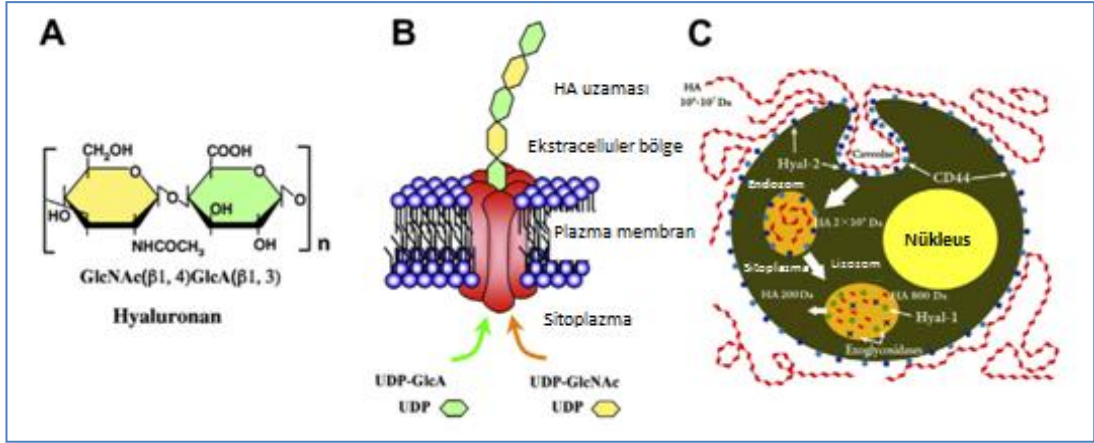
Long Bi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, trikalsiyum fosfat/kitosan ile hazırlanmış doku iskelesi, otolog TZP ile desteklenerek biyo malzemenin kemik rejenerasyonu üzerine etkileri *in-vitro* ve *in-vivo* olarak incelenmiştir. Yapılan çalışmada, *in-vitro* koşullarda, keçilerin kemik iliğinden izole edilmiş mezenşimal kök hücrelerin proliferasyonları 7 gün boyunca incelenmiştir. Trikalsiyum fosfat/kitosan ve TZP ile hazırlanmış doku iskelelerinde, TZP'siz ve yalnızca kitosan ile hazırlanmış doku iskelelerine kıyasla yaklaşık iki katı kadar daha fazla hücre sayısına sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Bu veriler ayrıca alkalin fosfataz enzim aktivitesi çalışmasıyla desteklenmiştir. Aynı çalışmada *in-vivo* koşullarda ise, TZP içeren grupta, TZP içermeyen ve boş gruba göre, yeni kemik oluşumu ve biyomalzemenin degradasyonu en fazladır [80].



Şekil 2.8. İnsan kanının anti koagulant içeren tüpe alınıp santrifüj edildikten sonra oluşan fragmentleri [73]

2.7.4. Hyaluronik Asit

Hyaluronik asit (HA), tüm yaşayan organizmalarda bulunan ve ekstraselüler boşlukta yer alan düz zincir polisakkaritlerden oluşan glikozaminoglikan ailesinin bir üyesidir [81]. İlk olarak 1934 yılında Karl Meyer tarafından sığır göz içi sıvısında saflaştırılmıştır. Su içerisine atıldığında hyaloid bir yapının şiştiğini gördüğü için buna hyaluronik asit adını vermiştir [82]. 1950'li yıllarda ise Meyer ve arkadaşları β -1,4-linked D-glucuronic acid ve β -1,3-linked N-acetyl-D-glucosamine dissakkarit birimlerinin tekrar etmesiyle oluşan lineer bir polisakkarit olduğunu keşfetmişlerdir. Hyaluronik asitin kimyasal yapısı Şekil 2.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Hyaluronan: basit bir polisakkarit olan hyaluronik asitin bazı biyolojik fonksiyonları [82]

Diğer glikozaminoglikanlar golgi aygıtında sentezlenirken Hyaluronik asit özelleşmiş membran proteinleri olan Hyaluronik asit sentetazlar (HAS) tarafından plazma membranında sentezlenir [82]. Memeli türlerinde 3 farklı HAS izoenzimleri tanımlanmıştır: HAS1, HAS2 ve HAS3. Bu enzimlerin her biri üridin difosfat glukoz (UDP) şekerleri için iki farklı bağlanma bölgelerine sahiptir. HAS1 ve HAS2 yüksek boyutlu HA üretiminde görev alırken (2000 kDA'a kadar) HAS3 düşük boyutlu HA üretiminde (100-1000 kDA) görev alır [82]. Hyaluronik asit ayrıca insan eklemlerine kayganlık ve yumuşaklık sağlayan özel bir proteindir. Yumuşak bağlayıcı dokularda ve gözü çevreleyen sıvıda yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır [83]. Aynı zamanda cilt dokusu içerisinde de bir miktar bulunmaktadır [84]. Diğer maddelere göre hyaluronik asitin su tutma kapasitesinin yüksek olması, ciltte ve bağ dokularında pürüzsüzlüğün ve yumuşaklığın eşsiz derecede olmasını sağlar. Yapısal ve biyolojik doku uyumluluğu sayesinde hücrel sinyalizasyon, yara onarımı, morfogenezis ve matriks organizasyonuna aracılık eder [81].

Bu özelliklerinden dolayı hyaluronik asitin türevleri 30 yılı aşkın süreden beri medikal ürünlerin içerisinde klinik olarak kullanılmaktadır [85]. Bunun yanı sıra ilerleyen yıllarda hyaluronik asit , doku mühendisliği ve rejeneratif tıp'a yeni

biyomateryaller temelleri oluşturacak bir malzeme olarak tanınmıştır [86-88]. Hyaluronik asit, üretilecek olan materyali uyumluluğunu artırmak amacıyla hidrofobositesi ve biyolojik olarak aktiflik özelliği modifiye edilebilir [89]. Yapılan bir çok hayvan deneylerinde de hyaluronik asitin ön çapraz bağlar, menisküs hasarlarında ve kırıldak yaralanmalarında olumlu etkileri literatüre kaydedilmiştir [81, 83]. Yapılan bazı hayvan deneylerinin özetlenmiş hali Tablo 2.7.'de verilmiştir. Klinik analizlerinin yanı sıra hyaluronik asitin *in-vitro* koşullarda pre-osteoblastik hücrelerin proliferasyonunu olumlu biçimde etkilediği görülmüştür [90].

Hyaluronik asitin genel olarak hücresel sinyalizasyon ve yara onarımında önemli bir rolünün olması, kemik hücrelerinde hem *in-vivo* koşullardaki kemik iyileşme aşamalarındaki olumlu etkileri hem de *in-vitro* koşullarda kemik rejenerasyonunda görevli olan hücrelere karşı pozitif etkilerinden dolayı, kemik dokuları için üretilen biyomateryallerde kullanımı tercih edilir.

Araştırmacılar	Denek sayısı	Denek hayvan	Hyaluronik asit enjeksiyon prosedürü	Analiz süresi	Sonuç	Etki
Ozkan ve ark. (2009)	32	Tavşan	5 hafta boyunca Haftada bir sefer	Defekt sonrasındaki 8. haftada	Morfolojik olarak olumlu	Olumlu
Jansen ve ark. (2008)	14	Tavşan	Cerrahi müdahaleden sonra 1 sefer	Cerrahi müdahaleden 2 gün ve 3 ay sonra	Sitolojik olarak küçük farklılıklar	Ortalama
Kaplan ve ark. (2009)	16	Koyun	0,8 ve 15. günlerde 1 defa	Cerrahi müdahaleden sonraki 12. haftada	Histolojik,sitolojik ve biyokimyasal gelişme	Ortalama
Mendelson ve ark. (2004)	9	Tavşan	Cerrahi müdahaleden sonra 3 hafta boyunca haftada 1 defa	2 ay'dan 6 ay'a kadar	Histolojik deneylerde dejeneratif proste hyaluronik asitin etkisi görülmemiştir.	Negatif

Tablo 2.7. Hyaluronik asit ile yapılmış bazı alışmalar [83]

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

Kitosan tabanlı doku iskelelerinin üretiminde kullanılan düşük viskoziteye sahip kitosan (Sigma, ABD). %1'lik hazır kollajen tip 1 (Advanced Biomatrix, ABD), hyaluronik asit (Hangzhou Singclean Medical, Çin), gluteraldehit çapraz bağlayıcı ajan (Sigma, ABD)

TZP izole etmek amacıyla, Vacutainer ACD-A (Anti caogulant-A) vakumlu kan alma tüpü(BD, ABD)

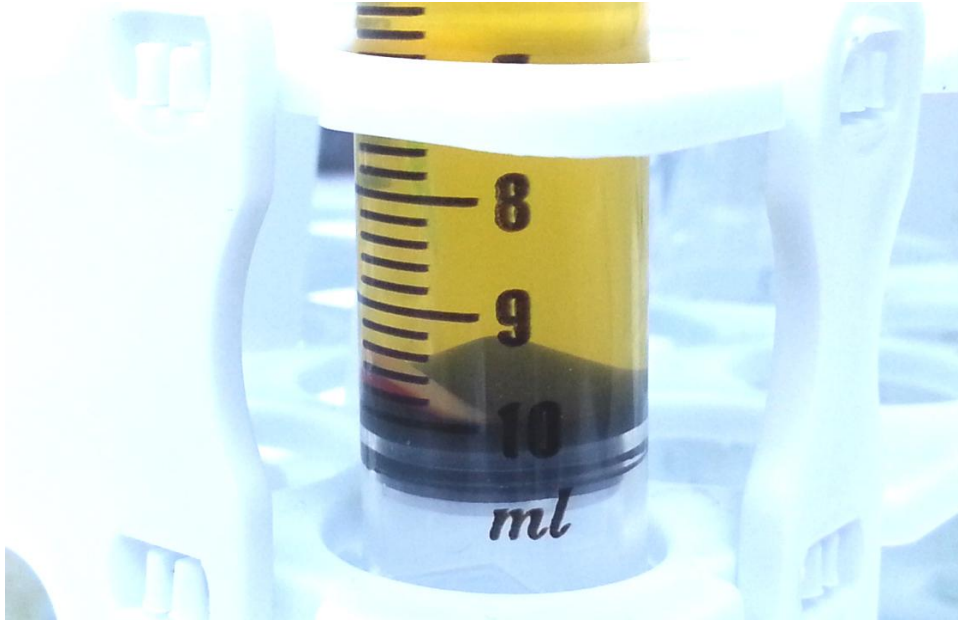
Hücre kültürü aşamasında kullanılan minimum essetial medium-alpha (Mem- α , Biological Industries, İsrail), fetal bovin serum (FBS, Biological Industries, İsrail), penisilin-streptomisin (Biological Industries, İsrail), askorbik asit (Sigma, ABD), β -gliserofosfat (Sigma, Almanya), PBS içerisinde 5000:1 tripsin-EDTA (Biological Industries, İsrail), WST-1 (Roche, Almanya), colorometric alkalen fosphatase assay kit (Anaspec, Belçika), hoechst 33342 (Life technologies, Almanya), propodium iodide (Sigma, ABD), 25 cm²'lik hücre kültür flaskı (Corning, ABD), 0,2 μ m filtre (Sartorius, Almanya), 15 ml santrifüj tüpü (Corning, ABD), mikropipet (20 μ m, 100 μ m, 1000 μ m, Scaltec, Almanya), 96 çok gözlü plate (Corning, ABD), kullan-at pipet (2ml, 5ml, 10ml), etanol (Merck, Almanya), PBS (phosphate buffered saline) (Sigma, ABD) ve çeşitli cam malzemeler kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. TZP'nin İzolasyonu

Histopatolojik incelemeye alınmak üzere olan 6 farklı erkek ratlardan, ACD-A içeren Vacutainer® vakumlu tüpler yardımı ile 5'er ml alınan kanlar; 2600 g⁻¹

'de 3 dakika santrifüj edilerek kırmızı kan ile serum kısmı birbirinden ayrılır. Süpernatant kısımda kalan serum dar boğazlı bir şırınga yardımıyla başka bir tüpe alınarak 2'nci santrifüj işlemi yapılır. 2. santrifüj işleminde ise $3500g^{-1}$ 'de 10 dakika santrifüj edilerek serumun trombositçe zengin kısmı ile trombositçe fakir kısmı ayrılır. Süpernatant kısımda kalan trombositçe fakir kısım atılır ve geriye kalan trombositçe zengin plazma (TZP) kısmı 1 ml serum fizyolojik içerisinde dilüe edilir. Bu işlem aynı serum fizyolojik ile diğer 2 tüpte de yapılarak TZP konsantrasyonu artırılır. Böylelikle deneylerde kullanılacak olan TZP elde edilmiş olur. TZP konsantrasyonu bu yöntemle bağlı kalınarak optimize edilmiştir.



Şekil 3.1. TZP hazırlanırken 2. santrifüjden sonraki görünümü

3.2.2. Çalışma Grupları

Deneyisel çalışmalarda kullanılmak üzere kitosan tabanlı 7 farklı kombinasyonda destekleyici madde ile hazırlanmış doku iskeleleri, deneyisel çalışmalarda kullanılan gruplar ve içeriğindeki Tablo 3.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Kitosan tabanlı doku iskelesiyle hazırlanan çalışma grupları

Çalışma Grubu (Kitosan tabanlı)	İçerik (Kitosan Tabanlı)
Kitosan-Kollajen	1 mL %1'lik kollajen ile hazırlanmış kitosan doku iskelesi
Kitosan-Hyaluronik asit	Kitosan doku iskelesi üzerine emdirilmiş 100 µL hyaluronik asit (20mg/mL)
Kitosan TZP	Kitosan doku iskelesi üzerine emdirilip 1 saat havada kurutulmuş 300 µL TZP
Kitosan Kollajen Hyaluronik asit	1 mL %1'lik kollajen ile hazırlanmış kitosan doku iskelesi + 100 µL hyaluronik asit emdirilir
Kitosan Kollajen TZP	1 mL %1'lik kollajen ile hazırlanmış kitosan doku iskelesinin üzerine 300 µL TZP emdirilerek hazırlanır
Kitosan Hyaluronik asit TZP	Kitosan doku iskelesi + 100 µL hyaluronik asit liyofilize edilir. 300 µL TZP emdirilir
Kitosan Kollajen Hyaluronik asit TZP	1 mL %1'lik kollajen ile hazırlanmış kitosan doku iskelesi + 100 µL hyaluronik asit emdirilir ve liyofilize edilir. Ardından 300 µL TZP emdirilir.

3.2.3. Kitosan Tabanlı Doku İskelelerinin Üretilmesi

3.2.3.1. Kitosan-Kollajen Doku İskelelerinin Hazırlanması

Düşük viskoziteye sahip kitosan %0,8 (w/v) olacak şekilde 8 mL 2,4 pH'a sahip %1'lik (v/v) asetik asit içerisinde manyetik karıştırıcıda 30 dakika çözdürülür [38]. Ardından kollajen içerecek olan doku iskeleleri için 1 mL

%1'lik sığırdan izole edilmiş kollajen, asetik içerisinde çözünmüş kitosana ilave edilir ve 30 dakika daha karıştırılır. Süre sonunda tüm gruplar ve gluteraldehit çözeltisi +4 °C'de 1 saat ardından -20 °C'de 5 dakika inkübe edilir [82]. Hemen ardından kitosan gruplarının içerisinde 2 mL soğuk gluteraldehit çözeltisi konularak 5 saniye vortekslenir, kalıplara dökülür ve -80 °C'de 16 saat çapraz bağlanmaya bırakılır. Çapraz bağlanma sonrasında oluşan kitosan doku iskeleleri 3 ayrı %50'lik (v/v) alkol serisinden geçirilir. Ardından 5 defa distile su ile yıkama yapılır. Kalıptan çıkartılan doku iskeleleri, kurutma kağıdı yardımı ile kaba suyu alınır. Ardından -55 °C'de 24 saat liyofilize edilerek sünger dokular içerisindeki su tamamen uzaklaştırılır. Katı halde elde edilen kitosan, 96 gözlü hücre kültür kaplarına girecek şekilde biçimlendirilir. %70'lik (v/v) etil alkol içerisinde UV ışığında 45 dakika steril edilir.

3.2.3.2. Kitosan-Hyaluronik Asit Doku İskelelerinin Hazırlanması

Düşük viskoziteye sahip kitosan %0,8 (w/v) olacak şekilde 8 mL 2,4 pH'a sahip sulu asetik asit içerisinde manyetik karıştırıcıda 30 dakika çözdürülür [38]. Sıvı haldeki kitosan ve gluteraldehit çözeltisi +4 °C'de 1 saat ardından -20 °C'de 5 dakika inkübe edilir [82]. Hemen ardından kitosan gruplarının içerisinde 2 ml gluteraldehit çözeltisi konularak vortekslenir, kalıplara dökülür ve -80 °C'de 16 saat çapraz bağlanmaya bırakılır. Çapraz bağlanma sonrasında oluşan kitosan doku iskeleleri 3 ayrı %50'lik (v/v) alkol serisinden geçirilir. Ardından 5 defa distile su ile yıkama yapılır. Kalıptan çıkartılan doku iskeleleri, kurutma kağıdı yardımı ile kaba suyu alınır. Ardından -55 °C'de 24 saat liyofilize edilerek sünger dokular içerisindeki su tamamen uzaklaştırılır. Katı halde elde edilen kitosan, 96 gözlü hücre kültür kaplarına girecek şekilde biçimlendirilir. %70'lik (v/v) etil alkol içerisinde UV ışığında 45 dakika steril edilen ve üzerlerine 100 µL hyaluronik asit (20 mg/mL) emdirilir ve tekrar liyofilize edilir. Böylelikle kitosan tabanlı hyaluronik asit doku iskeleleri hazırlanmış olur.

3.2.3.3. Kitosan-TZP Doku İskelelerinin Hazırlanması

Düşük viskoziteye sahip kitosan %0,8 (w/v) olacak şekilde 8 ml 2,4 pH'a sahip sulu asetik asit içerisinde manyetik karıştırıcıda 30 dakika çözülür[38]. Çözünmüş kitosan ve gluteraldehit çözeltisi +4 °C'de 1 saat ardından -20 °C'de 5 dakika inkübe edilir [82]. Hemen ardından kitosan gruplarının içerisinde 2 ml gluteraldehit çözeltisi konularak vortekslenir, kalıplara dökülür ve -80 °C'de 16 saat çapraz bağlanmaya bırakılır. Çapraz bağlanma sonrasında oluşan kitosan doku iskeleleri 3 ayrı %50'lik alkol serisinden geçirilir. Ardından 5 defa distile su ile yıkama yapılır. Kalıptan çıkartılan doku iskeleleri, kurutma kağıdı yardımı ile kaba suyu alınır. Ardından -55 °C'de 24 saat liyofilize edilerek sünger dokular içerisindeki su tamamen uzaklaştırılır. Katı halde elde edilen kitosan, 96 gözlü hücre kültür kaplarına girecek şekilde biçimlendirilir. Kitosan doku iskeleleri, %70'lik (v/v) etil alkol içerisinde UV ışığında 45 dakika steril edilir ve tekrar liyofilize edilir. İzole edilen TZP, her deney doku iskelesine 60 µL olacak şekilde emdirilir ve 37 °C'lik kuru etüvde 30 dakika bekletilerek TZP'nin doku iskelesi üzerinde kuruması sağlanır. Böylelikle kitosan tabanlı TZP destekli doku iskeleleri hazırlanmış olur.

3.2.3.4. Kitosan-Kollajen-Hyaluronik Asit Doku İskelelerinin Hazırlanması

Düşük viskoziteye sahip kitosan %0,8 (w/v) olacak şekilde 8 mL 2,4 pH'a sahip sulu asetik asit içerisinde manyetik karıştırıcıda 30 dakika çözdürülür [38]. Ardından kollajen içerecek olan doku iskeleleri için 1 mL %1'lik sığırdan izole edilmiş kollajen, asetik içerisinde çözünmüş kitosana ilave edilir ve 30 dakika daha karıştırılır. Süre sonunda tüm gruplar ve gluteraldehit çözeltisi +4 °C'de 1 saat ardından -20 °C'de 5 dakika inkübe edilir [82]. Hemen ardından kitosan gruplarının içerisinde 2 mL gluteraldehit çözeltisi konularak vortekslenir, kalıplara dökülür ve -80 °C'de 16 saat çapraz bağlanmaya bırakılır. Çapraz bağlanma sonrasında oluşan kitosan doku iskeleleri 3 ayrı %50'lik (v/v) alkol serisinden geçirilir. Ardından 5 defa distile su ile yıkama

yapılır. Kalıptan çıkartılan doku iskeleleri, kurutma kağıdı yardımı ile kaba suyu alınır. Ardından -55 °C'de 24 saat liyofilize edilerek sünger dokular içerisindeki su tamamen uzaklaştırılır. Katı halde elde edilen kitosan, 96 gözlü hücre kültür kaplarına girecek şekilde biçimlendirilir. %70'lik (v/v) etil alkol içerisinde UV ışığında 45 dakika steril edilen ve üzerlerine hyaluronik asit emdirilir ve tekrar liyofilize edilir. Böylelikle kitosan tabanlı kollajen, hyaluronik asit destekli doku iskeleleri hazırlanmış olur.

3.2.3.5. Kitosan-Kollajen-TZP Doku İskelelerinin Hazırlanması

Düşük viskoziteye sahip kitosan %0,8 (w/v) olacak şekilde 8 mL 2,4 pH'a sahip sulu asetik asit içerisinde manyetik karıştırıcıda 30 dakika çözdürülür [38]. Ardından kollajen içerecek olan doku iskeleleri için 1 mL %1'lik sığırdan izole edilmiş kollajen, asetik içerisinde çözülmüş kitosana ilave edilir ve 30 dakika daha karıştırılır. Süre sonunda tüm gruplar ve gluteraldehit çözeltisi +4 °C'de 1 saat ardından -20 °C'de 5 dakika inkübe edilir [82]. Hemen ardından kitosan gruplarının içerisinde 2 mL gluteraldehit çözeltisi konularak vortekslenir, kalıplara dökülür ve -80 °C'de 16 saat çapraz bağlanmaya bırakılır. Çapraz bağlanma sonrasında oluşan kitosan doku iskeleleri 3 ayrı %50'lik (v/v) alkol serisinden geçirilir. Ardından 5 defa distile su ile yıkama yapılır. Kalıptan çıkartılan doku iskeleleri, kurutma kağıdı yardımı ile kaba suyu alınır. Ardından -55 °C'de 24 saat liyofilize edilerek sünger dokular içerisindeki su tamamen uzaklaştırılır. Katı halde elde edilen kitosan, 96 gözlü hücre kültür kaplarına girecek şekilde biçimlendirilir. %70'lik (v/v) etil alkol içerisinde UV ışığında 45 dakika steril edilen doku iskeleleri üzerine izole edilen TZP, her deney doku iskelesine 60 µL olacak şekilde emdirilir ve 37 °C'lik kuru etüvde 30 dakika bekletilerek TZP'nin doku iskelesi üzerinde kuruması sağlanır. Böylelikle kitosan tabanlı kollajen ve TZP destekli doku iskeleleri hazırlanmış olur.

3.2.3.6. Kitosan-Hyaluronik Asit-TZP Doku İskelelerinin Hazırlanması

Düşük viskoziteye sahip kitosan %0,8 (w/v) olacak şekilde 8 mL 2,4 pH'a sahip sulu asetik asit içerisinde manyetik karıştırıcıda 30 dakika çözdürülür [38]. Süre sonunda tüm gruplar ve gluteraldehit çözeltisi +4 °C 'de 1 saat ardından -20 °C'de 5 dakika inkübe edilir [82]. Hemen ardından kitosan gruplarının içerisinde 2 ml gluteraldehit çözeltisi konularak vortekslenir, kalıplara dökülür ve -80 °C'de 16 saat çapraz bağlanmaya bırakılır. Çapraz bağlanma sonrasında oluşan kitosan doku iskeleleri 3 ayrı %50'lik (v/v) alkol serisinden geçirilir. Ardından 5 defa distile su ile yıkama yapılır. Kalıptan çıkartılan doku iskeleleri, kurutma kağıdı yardımı ile kaba suyu alınır. Ardından -55 °C'de 24 saat liyofilize edilerek sünger dokular içerisindeki su tamamen uzaklaştırılır. Katı halde elde edilen kitosan, 96 gözlü hücre kültür kaplarına girecek şekilde biçimlendirilir. %70'lik (v/v) etil alkol içerisinde UV ışığında 45 dakika steril edilen ve üzerlerine hyaluronik asit emdirilir ve tekrar liyofilize edilir. İzole edilen TZP, her deney doku iskelesine 60 µL olacak şekilde emdirilir ve 37 °C'lik kuru etüvde 30 dakika bekletilerek TZP'nin doku iskelesi üzerinde kuruması sağlanır. Böylelikle kitosan tabanlı, hyaluronik asit ve TZP destekli doku iskeleleri hazırlanmış olur.

3.2.3.7. Kitosan-Kollajen-Hyaluronik asit-TZP Doku İskelelerinin Hazırlanması

Düşük viskoziteye sahip kitosan %0,8 (w/v) olacak şekilde 8 mL 2,4 pH'a sahip sulu asetik asit içerisinde manyetik karıştırıcıda 30 dakika çözülür [38]. Ardından kollajen içerecek olan doku iskeleleri için 1 mL %1'lik sığırdan izole edilmiş kollajen, asetik içerisinde çözülmüş kitosana ilave edilir ve 30 dakika daha karıştırılır. Süre sonunda tüm gruplar ve gluteraldehit çözeltisi +4 °C'de 1 saat ardından -20 °C'de 5 dakika inkübe edilir [82]. Hemen ardından kitosan gruplarının içerisinde 2 mL gluteraldehit çözeltisi konularak vortekslenir, kalıplara dökülür ve -80 °C'de 16 saat çapraz bağlanmaya bırakılır. Çapraz bağlanma sonrasında oluşan kitosan doku iskeleleri 3 ayrı

%50'lik (v/v) alkol serisinden geçirilir. Ardından 5 defa distile su ile yıkama yapılır. Kalıptan çıkartılan doku iskeleleri, kurutma kağıdı yardımı ile fazla suyu alınır. Ardından -55 °C'de 24 saat liyofilize edilerek sünger dokular içerisindeki su tamamen uzaklaştırılır. Katı halde elde edilen kitosan, 96 gözlü hücre kültür kaplarına girecek şekilde biçimlendirilir. %70'lik (v/v) etil alkol içerisinde UV ışığında steril edilen ve üzerlerine hyaluronik asit emdirilir ve tekrar liyofilize edilir. İzole edilen TZP, her deney doku iskelesine 60 µL olacak şekilde emdirilir ve 37 °C' lik kuru etüvde 30 dakika bekletilerek TZP'nin doku iskelesi üzerinde kuruması sağlanır. Böylelikle kitosan tabanlı kollajen, hyaluronik asit ve TZP destekli doku iskeleleri hazırlanmış olur.

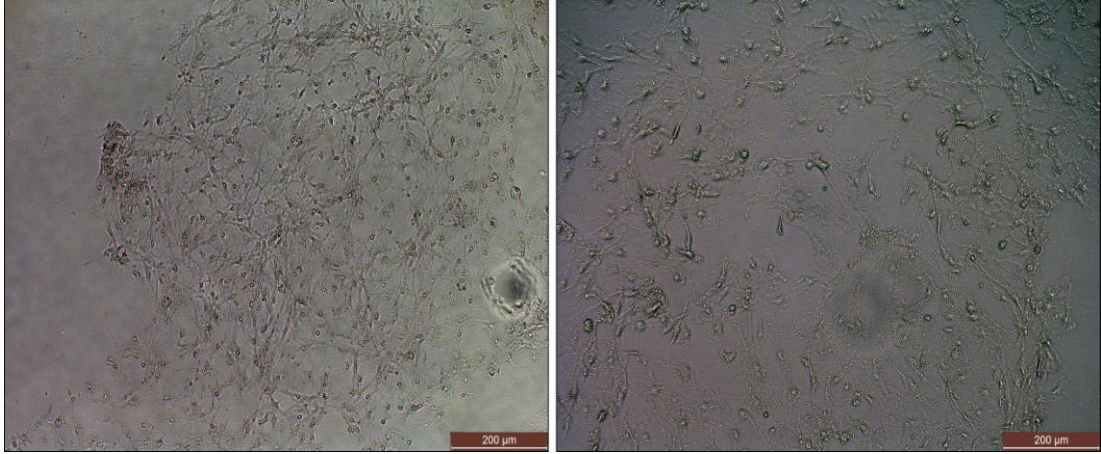
3.2.4. Taramalı Elektron Mikroskobu(SEM) ile İnceleme-Karakterizasyon

SEM ile incelemeden hemen önce 10 Angstrom (A) çözünürlüğünde vakum altında paladyum kaplama yapılarak numuneler iletken hale getirilir. Ardından 20 kV gerilimde çeşitli büyütme oranlarında incelemeler yapılır. Kitosan oluşumu sırasında oluşan lif bağlarının kalınlıkları, bunların aralarında oluşan porların büyüklükleri belirlenir.

3.2.5. Hücre Kültürü Deneyleri

3.2.5.1. Besi Ortamının Hazırlanması ve Hücre Kültür Ortamı

MC3T3-E1 hücre hattı, %10 FBS, %1 penicillin-streptomisin antibiyotik karışımı, 50 µg/ ml askorbik asit ve 10 mM β-gliserofosfat ile desteklenmiş MEM-α besi ortamı içerisinde %5 karbondioksit içeren etüvde inkübe edilmiştir. Sağlıklı MC3T3-E1 hücrelerinin sağlıklı morfolojik görünümü Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Flask üzerinde sağlıklı MC3T3-E1 Hücrelerinin görüntüleri

Flask üzerinde çoğaltılan hücreler, %80 yoğunluğa ulaştığında kültür kabı üzerinden tripsin-EDTA yardımı ile süspansiyon edilerek, çöktürülür. Çöktürülen hücreler hücre sayım cihazı ile sayılır ve canlılık oranı tespit edilir. Hazırlanan kitosan tabanlı doku iskeleleri üzerlerine 20,000 hücre doku iskelesi 5 µL besi ortamı olacak şekilde hücre ekimi yapılır. Hücre ekiminin ardından 2 saat boyunca hücre kültür koşulları altında hücrelerin doku iskelesi üzerine yapışması beklenir ve ardından uygun miktarda besi ortamı eklenir. Bu doku iskelelerinin besi ortamları 3 günde bir değiştirilir.

3.2.5.2. Hücre Proliferasyonunun Tespiti

1, 3, 7 ve 10 günlük doku iskeleleri üzerine ekilmiş olan hücreler ve kontrol gruplarının besi yerleri çekilir. Her birine eşit miktarda fenol red içermeyen DMEM eklenir. Kit üretici firmanın yönergelerine uyularak üzerlerine 8 µL WST-1 çözeltisi damlatılır ve 4 saat karanlık hücre kültürü şartlarında inkübasyona bırakılır. 4 saat sonunda hücrelerin mitokondriyel enzimlerinin WST-1 içerisindeki tetrazolyum tuzları ile reaksiyon vererek aktivitesi yüksek olan kuyucukların daha fazla sarı renk aldığı gözlenir. Karanlık şartlar altında tüm kuyucuklardaki renk değiştirmiş olan besi yerleri eşit miktarda çekilerek başka bir 96 gözlü doku kültür kabına aktarılır ve mikropalak okuyucuda her

bir kuyucuğun 16 farklı bölgesinden 440 nm dalga boyunda kolorimetrik okuma yapılır ve sonuçlar yorumlanır (BioTEK Gen5 Elisa Reader PowerWave XS2).

3.2.5.3. Alkalen Fosfataz Analizi

Tüm alkalen fosfataz deneyleri kit üretici firma tarafından hazırlanan kullanıcı el kitabına bağlı kalınarak yapılmıştır. Özetlenecek olursa, doku iskeleleri üzerine ekilmiş hücreler 1, 3, 7 ve 10 günlük inkübasyon sonunda doku iskeleleri yıkama solüsyonu ile yıkanır ve aspire edilir. Ardından taze yıkama solüsyonunun içerisinde %0,4 (v/v) Triton X-100 konularak +4 °C'de 10 dakika inkübe edilerek hücrelerin patlaması sağlanır. Ardından 2500 g'de 10 dakika santrifüj edilerek örneklerin süpernatant kısmı toplanır. Ardından süpernatantlar 96 gözlü doku kültür kabına alınarak üzerlerine 50 µL pNPP eklenir ve 35 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Süre sonunda 50 µL stop solüsyonu eklenerek ALP enzimi ile pNPP etkileşimi durdurulur. 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuma yapılarak ALP enzim miktarları standartlarla karşılaştırılarak hesaplanır (BioTEK Gen5 Elisa Reader PowerWave XS2).

3.2.5.4. Taramalı Elektron Mikroskobu ile İnceleme-Hücre Ekimi Yapılmış Gruplar

1, 3, 7 ve 10. günlerde hücre ekilmiş doku iskelelerinin besi ortamları çekilerek PBS ile yıkanır. Fiksasyon amacı ile 30 dakika gluteraldehit çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında inkübe edilir. Ardından gluteraldehit ortamdan uzaklaştırılır ve PBS ile 5 defa yıkama yapılarak fiksasyon tamamlanır. Taramalı elektron mikroskobu incelemesine dek numuneler +4 °C'de saklanır.

SEM ile incelemeden hemen önce 10 A çözünürlüğünde vakum altında paladyum kaplama yapılarak numuneler iletken hale getirilir. Ardından 20 kV gerilimde çeşitli büyütmelemlerde incelemeler yapılır.

3.2.5.5. Histolojik İnceleme

1, 3, 7 ve 10. günlerde hücre ekilmiş doku iskelelerinin besi ortamları çekilerek PBS ile yıkanır. Fiksasyon amacı ile 30 dakika gluteraldehit çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında inkübe edilir. Ardından gluteraldehit ortamdan uzaklaştırılır ve PBS ile 5 defa yıkama yapılarak fiksasyon tamamlanır. Doku iskeleleri, kriyojel doku gömme medyası içerisinde -20 °C'de 30 dakika dondurulur. Ardından -20 °C'de kriyostat ile kesitler alınır. Alınan kesitler propodium iyodür ile boyanarak ters floresan mikroskop altında hücre adezyonunun değerlendirilmesi yapılır.

3.2.5.6. Apoptotik Nekrotik İnceleme

İkili boyama soluyonu; Ribonükleaz A, Hoechst ve Propodium Iodide'den oluşan bir karışımdır. Bir çeşit mavi floresan boya olan hoechst 33342, DNA'ya bağlanarak çekirdek içerisindeki kromatinleri boyar. Apoptotik morfoloji olan çekirdek küçülmesi durumunda ise bu boya, sağlıklı hücrelere oranla kromatin ipliklerini daha yoğun ve parlak boyayarak daha yüksek bir emisyon gösterir [91]. Böylelikle apoptotik morfolojinin belirlenmesinde büyük kolaylık sağlar. Propodium iyodür ise hücre duvarında hasar oluşmuş hücrelerin içerisine girerek bu hücrelerin DNA'sını boyar ve kırmızı floresan bir ışık yaymasını sağlar [91]. Böylelikle hücre duvarında hasar oluşmuş, dolayısıyla ölmüş hücrelerin değerlendirilmesi sağlanır. Ribonükleaz-A ise hücreler içerisindeki RNA'ları parçalayarak spesifik olmayan boyanmaları engeller. Böylelikle ikili boyama işlemi ile apoptotik ve nekrotik hücre sayısı indeksi çıkarılarak hücre ölümlerinin değerlendirilmesi yapılır.

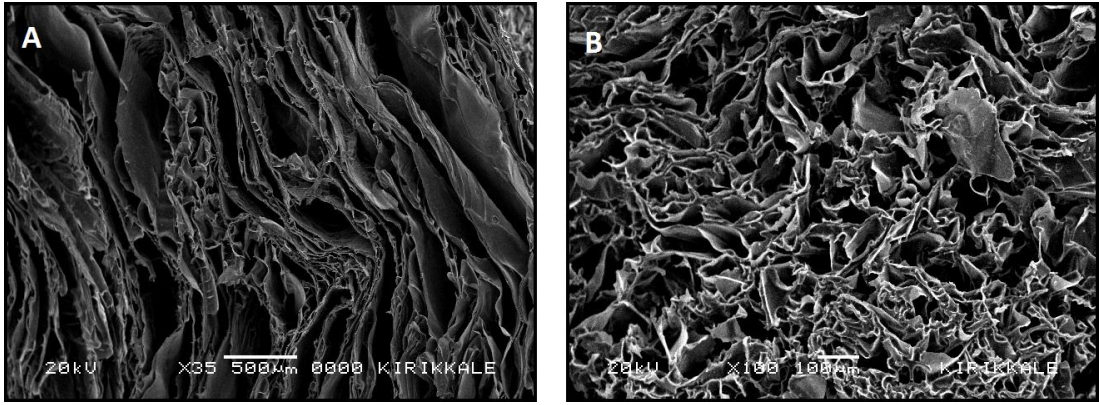
Steril edilmiş doku iskeleti grupları 1 mg/mL hücre kültürü besi yeri ortamı olacak şekilde inkübe edilir. Bu çözelti içerisindeki besi ortamı deney amacıyla kullanılacaktır.

Doku kültür kabında kültüre edilmiş ve yüzde 80 yoğunluğa ulaşmış olan hücreler, 96 gözlü hücre kültür kabına 5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılır ve taze besi ortamı içerisinde inkübe edilir. Bu şekilde çok gözlü doku kültür kabındaki 1 günlük inkübasyonun ardından, bu hücrelerin ortamı, daha önce kitosan doku iskeletinin içerisinde bekletildiği besi ortamı ile değiştirilir ve 1 günlük inkübasyona bırakılır. Süre sonunda hücre besi ortamı çekilerek her bir kuyucuğun içerisine 70 μ L ikili boyama solüsyonu damlatılır ve 10 dakika inkübasyona bırakılır. Ardından karanlık ortamda floresan mikroskopta DAPI filtresi ile apoptoza uğramış hücreler ve FITC filtresi ile nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılır. Toplam hücre sayısı ile bu apoptotik ve nekrotik hücreler birbirine oranlanarak bir indeks çıkartılır. Bu sayede maddelerin hücreler üzerine olan etkisi değerlendirilir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Doku İskelelerinin SEM ile Görüntülenmesi

Kitosan tabanlı doku iskeleleri ve kollajen ile desteklenmiş kitosan tabanlı doku iskeleleri SEM ile incelenerek doku iskelesinin gözenekli yapıda oldukları, hücre proliferasyonu için gerekli poroziteye ve yüzey alanına sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu görüntüleme işlemi sonrasında hyaluronik asit ve TZP kullanılarak hazırlanan doku iskeleleri SEM ile incelenmesi sonucunda, modifikasyon öncesindeki benzer fiziksel özellikler gösterdikleri gözlemlenmiştir.



Şekil 3.3. Üretilen kitosan tabanlı doku iskelelerinin SEM görüntüleri A) 35X büyütme (Bar: 500 µm) B) 100X büyütme (Bar: 100 µm), fotoğraflar Jeol JSM 5600 taramalı elektron mikroskobu ile çekilmiştir.

4.2. Hücre Kültürü Deneyleri

4.2.1. WST-1 Hücre Canlılık ve Proliferasyon Testi

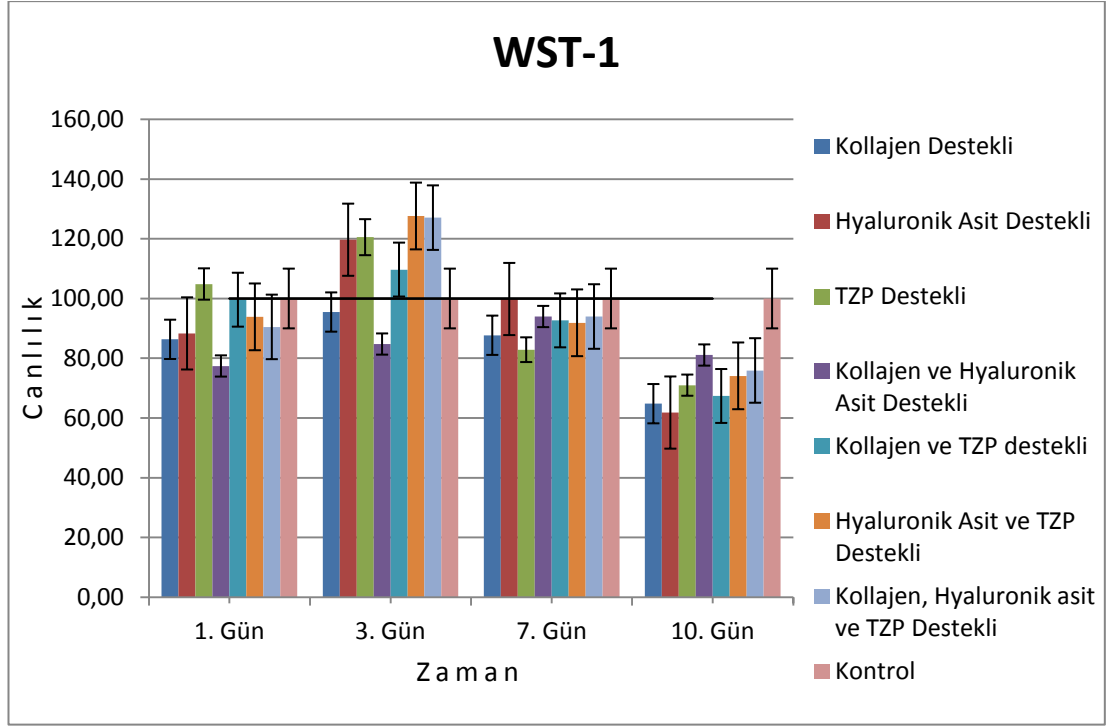
Kitosan tabanlı hazırlanan çeşitli kombinasyonlarda hazırlanmış doku iskelelerinin üzerinde MC3T3-E1 pre-osteoblastik hücrelerin 1, 3, 7, ve 10. günlerde canlılık oranı WST-1 testi ile belirlenmiştir. Yapılan çalışmanın

sonuçları Şekil 4.1'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre ilk günde yalnızca TZP ile üretim yapılmış grupta %104,86 canlılık görülürken, kollajen ve hyaluronik asit ile desteklenmiş grupta %77,40 canlılık tespit edilmiştir. Üretilen tüm gruplarda 1. günde canlılık kontrol grubuna yakın seyir etmiştir.

3 günlük canlılık testinde ise TZP içeren tüm gruplarda canlılık seviyesi %120'den fazladır. TZP ile hyaluronik asitin beraber kullanıldığı grupta ise canlılık oranı %127,63'e ve kollajen hyaluronik asit ve TZP'nin kullanıldığı grupta ise %127,08'e ulaşmaktadır. Bu canlılık oranları TZP içermeyen gruplara göre çok daha yüksektir. Kollajen ve hyaluronik asit ile desteklenmiş doku iskelesinde ise %84.75 ile 1. günde olduğu gibi diğer gruplara oranla canlılık seviyesi daha düşük olduğu görülmüştür. Canlılık oranı kontrol grubuna oranla en düşük olan 2. grup ise %95.47 ile kollajen destekli gruptur.

Pre-osteoblastik hücrelerin ekildiği doku iskeleleri üzerindeki 7. günde ise hyaluronik asit destekli grup kontrol grubunun canlılığı ile aynı oranda iken diğer tüm gruplarda canlılık oranının 3. güne göre düştüğü gözlemlenmiştir.

10. günde doku iskelesi üzerine ekilmiş hücrelerin canlılık analizinde ise tüm gruplarda istisnasız canlılık düşüşü gözlemlenmektedir. Bu halde dahi en düşük canlılık oranı %61,8 ile hyaluronik asit ile desteklenmiş grupta, en yüksek canlılık ise kontrol grubuna oranla %81,08 ile kollajen ve hyaluronik asit ile desteklenmiş grupta tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. MC3T3-E1 hücrelerinin zamana bağlı olarak proliferasyonlarındaki değişimler

4.2.2. ALP Alkalen Fosfataz Enzimi Aktivitelerinin Ölçümü Testi

Kitosan tabanlı olarak kollajen, hyaluronik asit ve TZP ile farklı kombinasyonlarda hazırlanmış doku iskelelerinin alkalen fosfataz enzim aktivitesi 1, 3, 7 ve 10. günlerde ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2'de grafik ile gösterilmiştir.

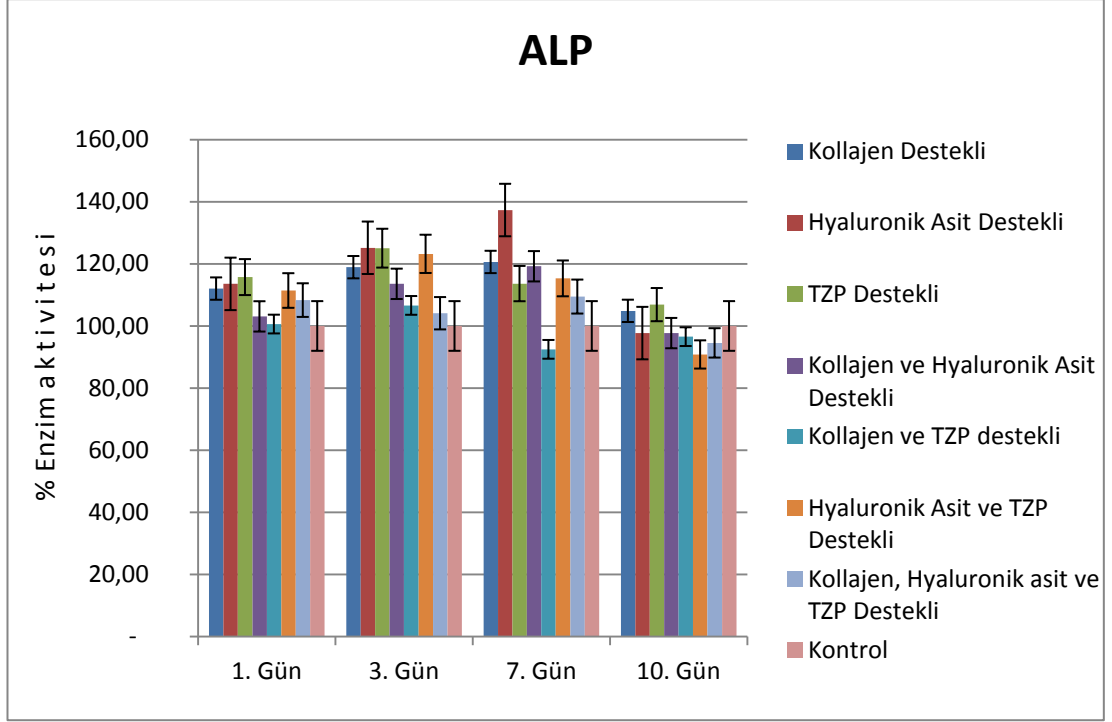
Bir günlük alkalen fosfataz enzim aktivitesi, kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, tüm gruplarda kontrolden daha fazla bir alkalen fosfataz enzim aktivitesi göstermiştir. En yüksek enzim aktivitesi %115,74 ile TZP ile desteklenmiş grupta gözlemlenmiştir. En yüksek aktivite gösteren 2. grup ise %113,56 ile hyaluronik asit ile desteklenmiş gruptur. Diğer tüm gruplarda ise en yüksek %112,04 ile kollajen destekli grupta, en düşük kollajen ve TZP ile desteklenmiş grupta %100,62 ALP aktivitesi arasında değişmektedir.

Hazırlanan doku iskeleleri üzerinde proliferen olan 3 günlük MC3T3-E1 pre-osteoblastik hücrelerde alkalen fosfataz aktivitesi en yüksek olan grup hyaluronik asit ile desteklenmiş gruptur, %125,18 ile tıpkı 1. günde olduğu gibi oldukça yüksek enzim aktivitesine sahiptir. Bu grubu %125,05 ile TZP ve hemen ardına %123,22 ile hyaluronik asit ve TZP ile desteklenmiş grup takip etmektedir. Diğer grupların ALP enzim aktivitesi oranları aralarında ise en yüksek kollajen destekli grupta %118,93 ve en düşük kollajen, hyaluronik asit ve TZP ile desteklenmiş grupta %104,1 arasında seyretmektedir.

Yedi günlük alkalen fosfataz enzim aktivitesi testinde ise %137,33 ile hyaluronik asit ile desteklenmiş grup önceki deney günlerinde olduğu gibi oldukça yüksek aktiviteye sahiptir. Bu grubu %120,61 ile kollajen destekli grup ve %119,22 ile kollajen ve hyaluronik asit destekli grup izlemektedir. Hyaluronik asit ve TZP ile desteklenmiş grupta ise kontrol grubuna oranla %115,32 enzim aktivitesi mevcuttur. Bunu %113,65 ile TZP ile desteklenmiş doku iskelesi takip etmektedir. En düşük alkalen fosfataz enzim aktivitesine sahip grup ise %92,48 ile kollajen ve TZP destekli gruptur. Bu sonuçlar özetlenecek olursa hyaluronik asit, hücre ekiminden itibaren 7 gün sonra bile enzim aktivitesini olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir.

Alkalen fosfataz enzim aktivitesinin 10. gününde ise tüm grupların enzim aktivitesi kontrol grubunun enzim aktivite oranına yaklaştıkları gözlemlenmiştir. Buna rağmen en yüksek aktivite %106,88 ile TZP ile desteklenmiş gruptadır. Bunu %104,87 ile kollajen destekli grup takip etmiştir. En düşük aktivite ise %90,83 ile hyaluronik asit ve TZP ile desteklenmiş gruptadır. Diğer gruplar ise %96 civarında bir enzim aktivitesi göstermiştir.

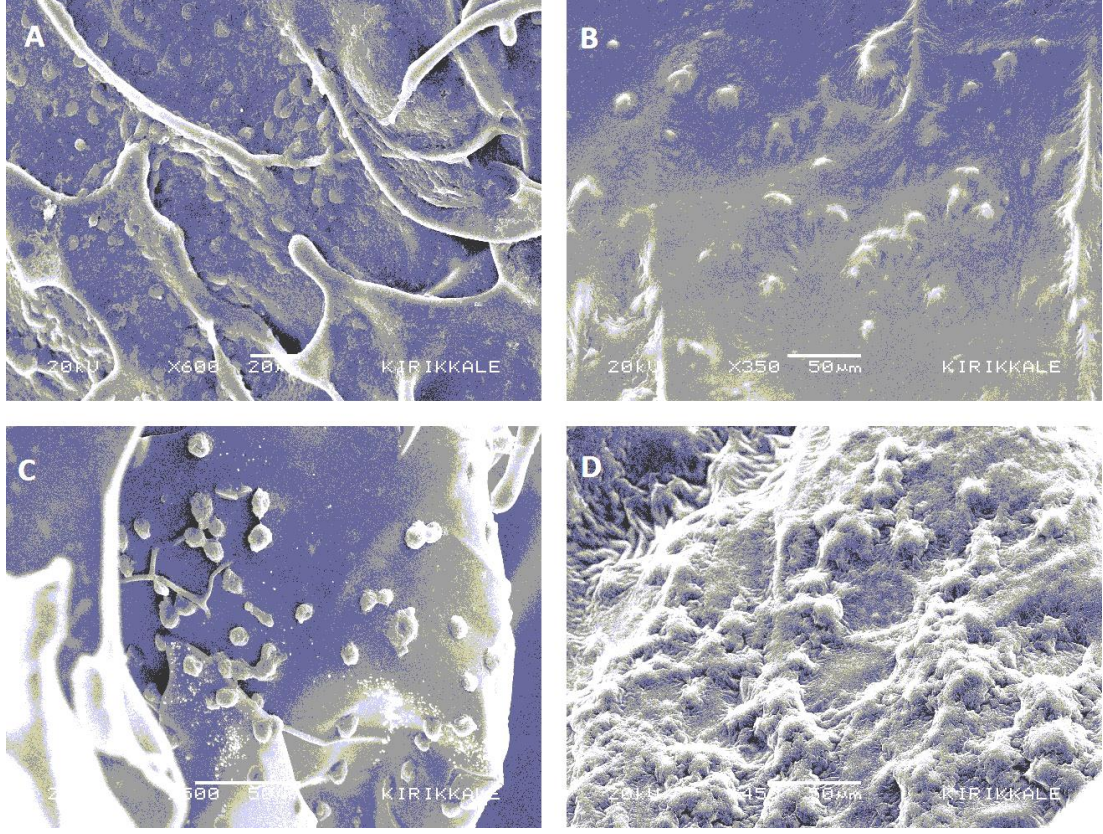
Tüm günler için alkalen fosfataz enzim aktivitesinin günlere bağlı olarak gösterimi Şekil 4.2.'de mevcuttur.



Şekil 4.2. MC3T3-E1 hücrelerinin zamana bağlı olarak doku iskelesi üzerindeki alkalen fosfataz enzim aktiviteleri

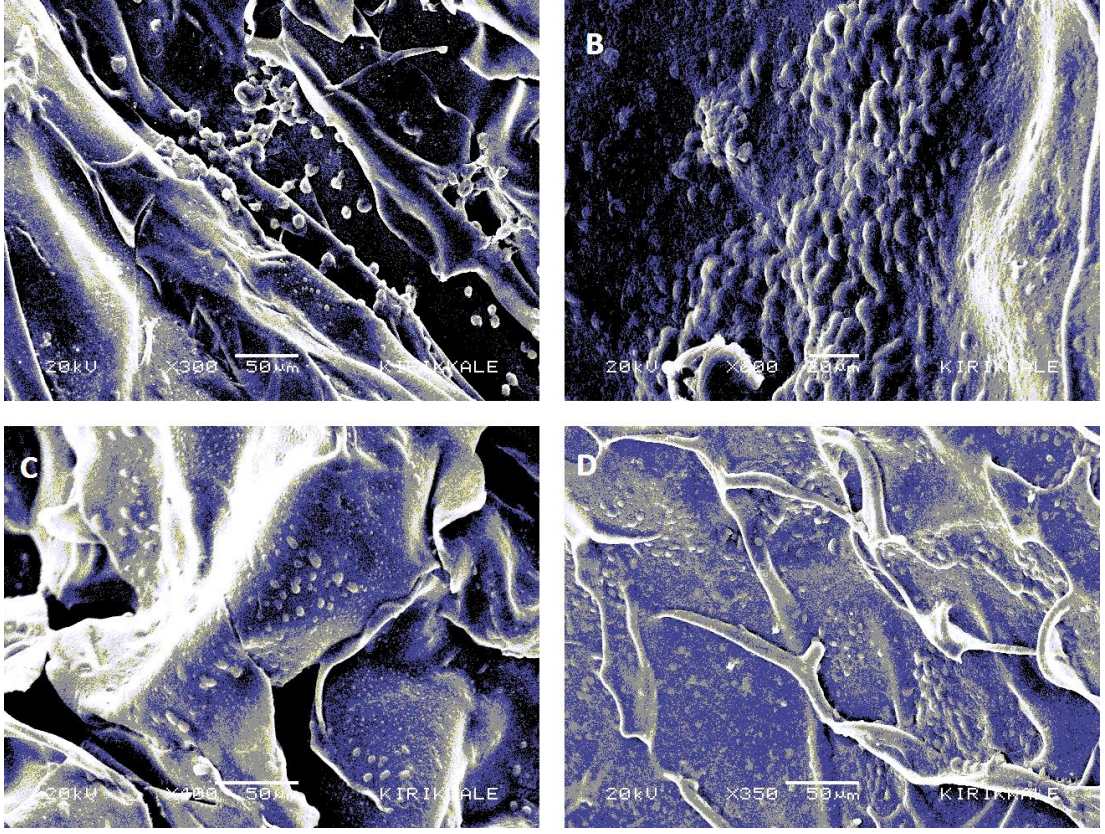
4.2.3. Hücre Ekimi Yapılmış Doku İskelelerinin SEM Görüntüleri

Kitosan tabanlı ve 3 farklı destekleyici maddelerle desteklenmiş doku iskelelerinin üzerine hücre ekimi yapılması ve SEM ile incelemeye gönderilmeden önceki fiksasyon aşamalarının, SEM ile incelemede doku iskelesinin gözenekli yapısını kaybetmediği, hücre kültürü kullanımı için gerekli poroziteye sahip oldukları ve yüzey alanı sahip oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca 1, 3, 7 ve 10. günlerde ekilen hücreler bu doku iskelelerine karşı hücre adezyonu gösterdikleri belirlenmiştir.

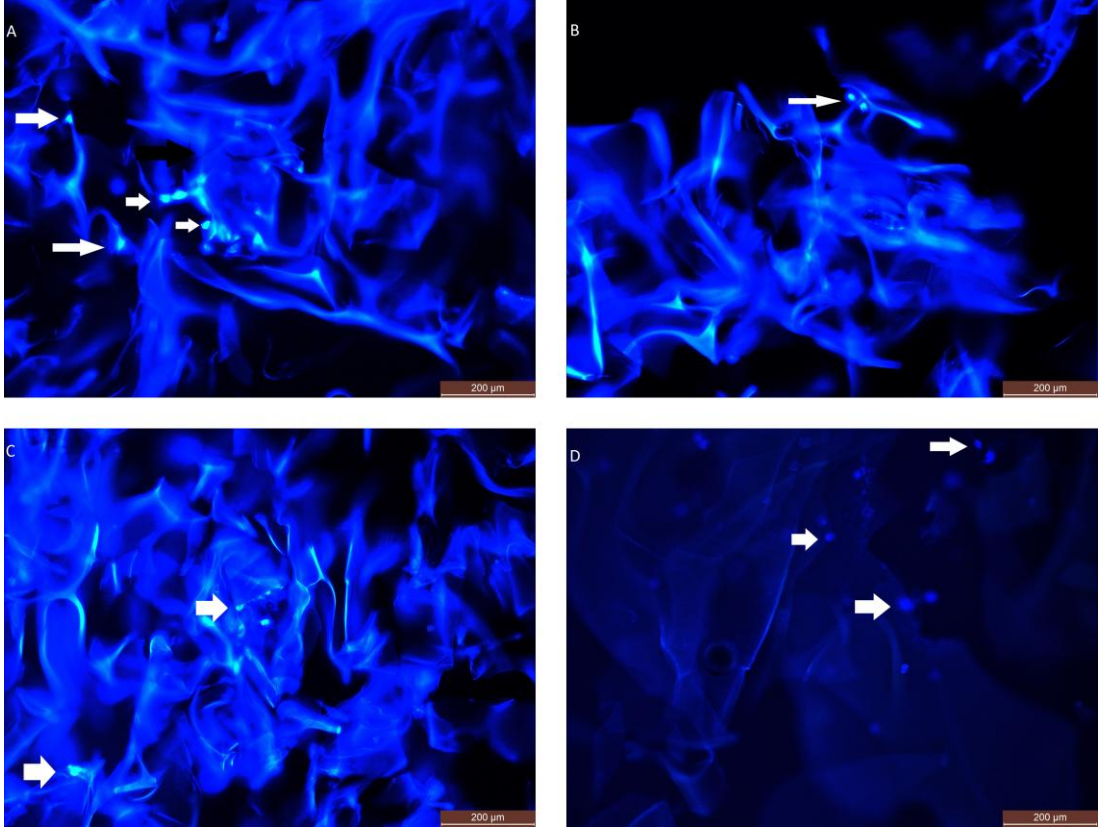


Şekil 4.3. Hücre fiksasyonu yapılmış doku iskelelerinin SEM görüntüleri A) 1 günlük hyaluronik asit ve TSP ile desteklenmiş doku iskelelerinin üzerinde 600X büyütmede (Bar: 20 µm), B) 3 günlük hyaluronik asit ve TSP ile desteklenmiş doku iskelelerinin üzerinde 350X büyütmede (Bar: 50 µm), C) 3 günlük kollajen, hyaluronik asit ve TSP ile desteklenmiş doku iskelelerinin üzerinde 500X büyütmede (Bar: 50 µm), D) 7 günlük kollajen, hyaluronik asit ve TSP ile desteklenmiş doku iskelelerinin üzerinde 450X büyütmede (Bar: 50 µm) MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri. Fotoğraflar Jeol JSM 5600 taramalı elektron mikroskobu ile çekilmiştir.

Doku iskeleleri üzerine ekilip fikse edilmiş doku iskeleleri üzerine 1, 3, 7 ve 10. günlerde hücre ekimi yapılmış kitosan tabanlı ve 3 farklı destekleyici maddelerle desteklenmiş doku iskeleleri kriyostatlı mikrotom'da kesitler alınarak boyama yapılmıştır. Boyama ardından floresan mikroskop altında hücrelerin doku iskeleleri üzerine olan adezyonları incelenmiş ve çoğu doku iskelesi üzerinde hücre adezyonu tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. Hücre fiksasyonu yapılmış doku iskelelerinin SEM görüntüleri A) 1 günlük TZP ile desteklenmiş doku iskelelerinin üzerinde 300X büyütmede (Bar: 50 μ m), B) 3 günlük TZP ile desteklenmiş doku iskelelerinin üzerinde 600X büyütmede (Bar: 20 μ m), C) 3 günlük kollajen ve hyaluronik asit desteklenmiş doku iskelelerinin üzerinde 400X büyütmede (Bar: 50 μ m), D) 7 günlük kollajen ve hyaluronik asit desteklenmiş doku iskelelerinin üzerinde 350X büyütmede (Bar: 50 μ m) MC3T3-E1 hücrelerinin SEM görüntüleri. Fotoğraflar Jeol JSM 5600 taramalı elektron mikroskobu ile çekilmiştir.

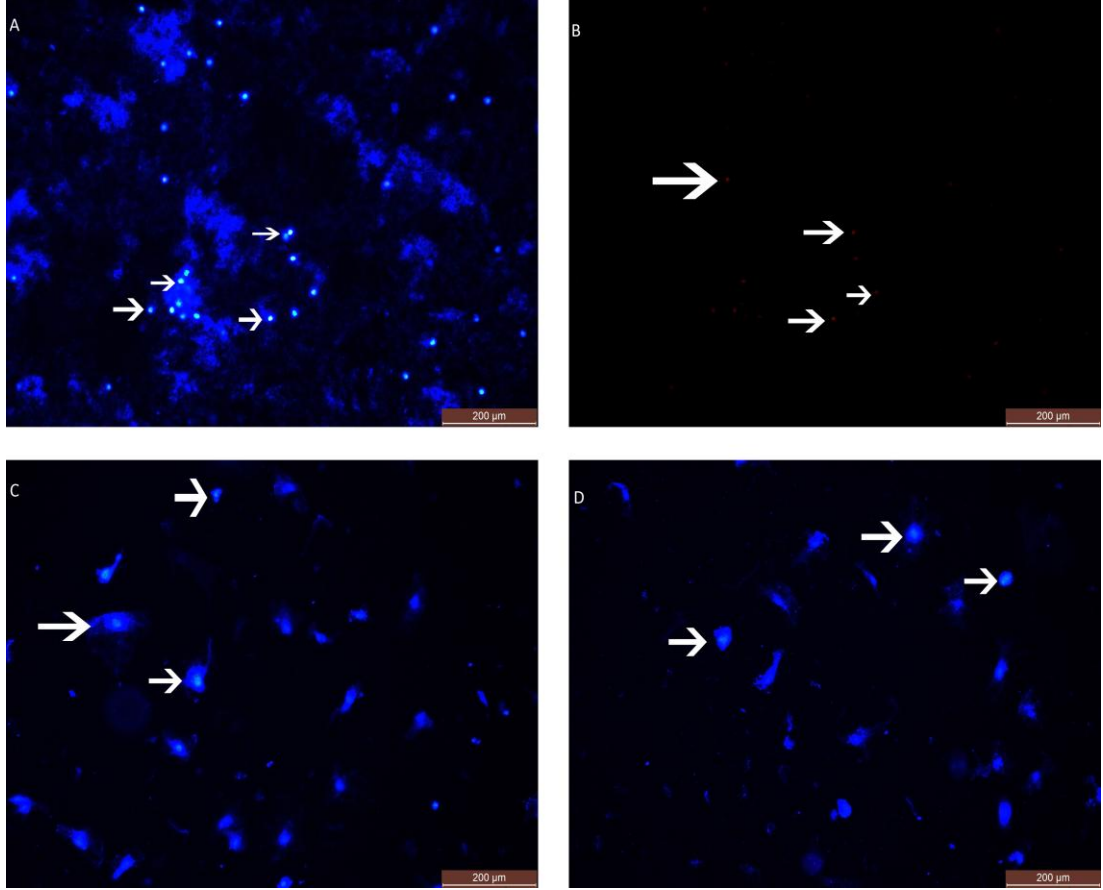


Şekil 4.5. Fikse edilmiş hücrelerin floresan mikroskoptaki görüntüleri A) 3 günlük hyaluronik asit destekli kitosan doku iskelesinin üzerindeki, B) 7 günlük hyaluronik asit destekli kitosan doku iskelesinin üzerindeki C) 3 günlük TZP doku iskelesi üzerindeki, D) 3 günlük kollajen destekli doku iskelesi üzerindeki hücrelerin görüntüsü verilmiştir. Bar: 200 µm-Leica DM6000 floresan ataçmanlı mikroskop ile görüntülenmiştir

4.2.4. İkili Boyama ile Elde Edilen Hücrelerin Çekirdek Morfolojilerinin Analizi

Hücre ekimi ardından sitotoksite belirlemek amacıyla yapılan ikili boyama testinde, hücrelerin apoptotik ve nekrotik indeksi belirlenmiştir.

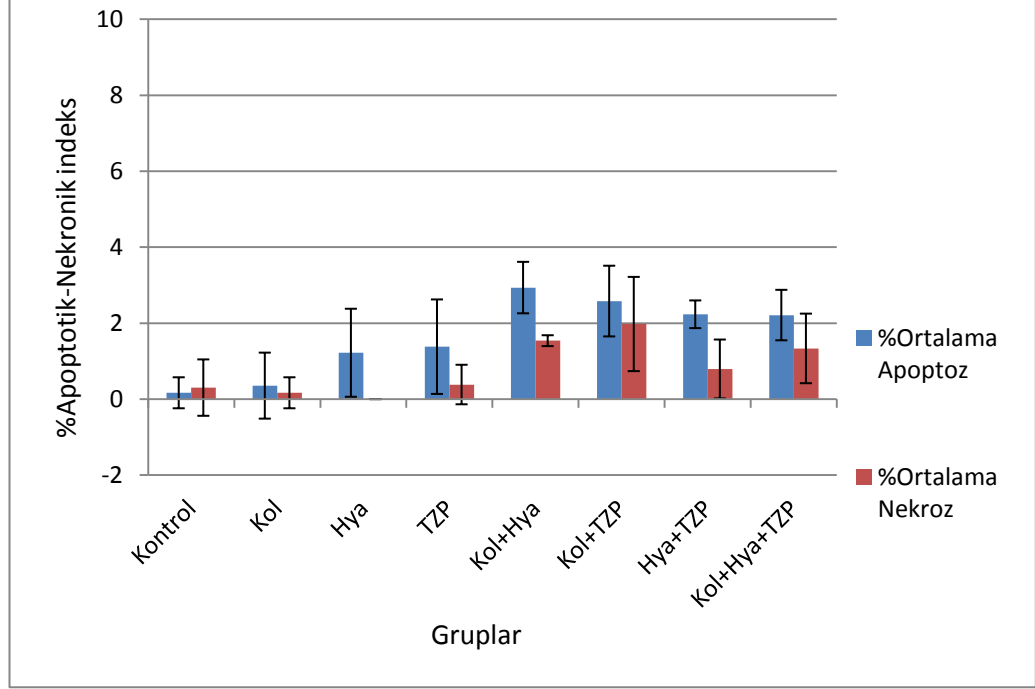
İkili boyama fotoğraflarının tamamı değerlendirilerek 1 gün için 7 farklı doku iskelesinin apoptotik ve nekrotik indeksleri çıkartılmıştır. Bu indekslerin ortalama değerleri Şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Doku iskelesi üzerinde 24 saatlik hücrelerin floresan mikroskoptaki görüntüleri A) Kollajen ve TZP destekli doku iskelesinin MC3T3-E1 hücreleri üzerindeki apoptotik etkiler B) A'nın DAPI filtresiyle nekrotik hücrelerinin görüntüleri C,D) kontrol gruplarının sağlıklı hücrelerin floresan mikroskoptaki görüntülerine yer verilmiştir. Bar: 200 µm-Leica DM6000 floresan ataçmanlı mikroskop ile görüntülenmiştir

24 saatlik apoptotik nekrotik indeks sonuçlarına bakılacak olursa kontrol grubundaki apoptotik ve nekrotik hücre ölümü oranları beklenildiği gibi seyretmiştir. Kollajen grubu, hyaluronik asit grubu, TZP ile desteklenmiş grup, hyarluronik asit ve TZP ile desteklenmiş grubu ve kollajen hyaluronik asit ve TZP ile desteklenmiş grupta apoptotik ve nekrotik hücre ölümleri oldukça düşüktür. Bu oranın düşüklüğü, destekleyici maddelerin tek başlarına veya kombine halde bir sitotoksisite göstermedikleri sonucuna varılmıştır. Ancak kollajen ve hyaluronik asit içeren grupta %3 apoptoz, %1,5 nekroz tespit edilmiştir. Bu oran, yaklaşık %4,5'luk bir toksisiteyi ifade etmektedir.

Hyaluronik asit ve TZP içeren grupta ise yaklaşık %2,5 apoptoz ve %2'lik bir nekroz değerlendirilmiştir. 24 saatlik bu deney grubunda toplamda %4,5'luk bir sitotoksisite mevcuttur.



Şekil 4.7. 24 saatlik apoptotik nekrotik indeks

5. TARTIŞMA

Yapılan bu tez çalışmasında, kitosan tabanlı doku iskelelerinin kollajen, hyaluronik asit, trombositçe zengin plazma, ve bunların tek dozdaki kombinasyonlarının MC3T3-E1 pre-osteoblastik hücre hattındaki proliferasyon, sitotoksisite, alkalen fosfataz enzim aktiviteleri ve hücre adezyon performansları incelenmiştir.

Doku iskeleleri hazırlandıktan sonraki SEM incelemesinde, kitosan çapraz bağlanmasından sonra beklenen, porozite tespit edilmiş ve bu porozitenin hücre adezyonuna uygun olduğu kanısına varılmıştır. Daha sonra doku iskeleleri üzerine hücre ekilerek hücre kültürü aşamasına geçilmiştir.

Hücre kültürü aşamasında WST-1 testi uygulanan tüm günlerde ve tüm gruplarda hücre canlılığı tespit edilmiştir. 24 saatlik proliferasyon testinde tüm grupların canlılığı kontrol grubunun altında olmasına rağmen, en düşük canlılık %78 ile kollajen ve hyaluronik asit destekli doku iskelesi grubundadır. Bu sonuçlar göz önüne alınarak, tüm gruplarda 24 saatlik proliferasyonda önemli derecede toksisite gözlenmemiştir. Aynı gruplar ve için alkalen fosfataz enzim aktivitesinin ölçümü çalışmasında da ALP enzim aktiviteleri kontrol grubuna yakın seyir göstermiştir. Bu sonuçlarda 24 saatlik süre içerisinde doku iskelelerinin hücre toksisitesi göstermediği destekler niteliktedir. Bir günlük apoptotik nekrotik örnekleri bu sonuçlar ile karşılaştırılacak olursa, özellikle WST-1 testinin sonuçlarını desteklemektedir. Kollajen ve hyaluronik asit ile kombine edilmiş doku iskelelerinde yaklaşık %20'lik bir sitotoksisite meydana gelmiştir. Bu oran WST-1 testinde yaklaşık %18'lik bir toksisite gösterdiğinden dolayı 24 saatlik süre içerisinde hücrelerin hyaluronik asitin hücre tutunmasını artırmadığı söylenebilir.

Hücre proliferasyonunun en yüksek olduğu 72. saatte ise yine en düşük canlılık kollajen ve hyaluronik asit destekli doku iskelesi grubundadır. Ancak 24 saat ile karşılaştırıldığında bu grupta canlılık artışı olduğu söylenebilir.

Diğer gruplarda ise hücre mitokondriyel aktivitesi kontrol grubuna göre daha yüksek olduğundan herhangi bir sitotoksosite söz konusu değildir. Aksine bir miktar hücre aktivitesinin indüklendiği söylenebilir. Özellikle TZP kullanılan gruplarda kontrol grubuna göre yaklaşık %20'lik bir ekstra hücre canlılığı söz konusudur. Hyaluronik asit ve TZP kullanıldığında bu canlılık oranı %28'lere çıkmaktadır. 72 saatlik testte tüm gruplar karşılaştırıldığında ise hyaluronik asit ve TZP'li grupta az bir miktar fazla canlılık göstermektedir. Bu durum, TZP'nin hücre canlılığına olan önemli etkisini tekrar vurgulamaktadır. Alkalen fosfataz enzim aktivitesi testinde özellikle TZP'li gruplarda enzim aktivitesi diğer gruplara göre daha yüksek seyretmiştir. SEM çalışmaları da TZP'nin MC3T3-E1 hücrelerinin adezyonunun artırdığını fotoğraflar ile desteklemektedir.

Bir haftalık WST-1 hücre proliferasyon çalışmasında, tüm gruplarda 72 saatlik deney grubuna göre daha düşük, kontrol grubuna yakın bir canlılık göstermektedir. Bu durum, destekleyici maddelerin hücreler tarafından tüketildiği şeklinde yorumlanabilir. Alkalen fosfataz aktivitesi sonuçları incelendiğinde tüm gruplarda enzim aktivitesi kontrol grubuna yakın seyretmiştir. En düşük canlılığın %82,86 ile TZP ile desteklenmiş gruptadır. Trombositin bozunması kolay olduğundan dolayı 3 günden sonraki süreçte TZP'li grubun düşük proliferasyon göstermesi beklenen bir sonuçtur. Ancak alkalen fosfataz enzim aktivitesinde bu grup, kontrol grubuna yakın bir aktivite göstermiştir.

On günlük çalışma sonuçları tartışılacak olursa, WST-1 hücre proliferasyon testinde tüm gruplarda kontrol grubuna göre canlılıkta bir azalma söz konusudur. Ancak alkalen fosfataz enzim aktivitesine incelenecek olursa tüm gruplar kontrol grubuna yakın ALP enzim aktivitesi göstermiştir. En yüksek hücre canlılığı %81,08 ile kollajen ve hyaluronik asit ile desteklenmiş gruptadır. Aynı grup için alkalen fosfataz aktivitesi %97,71 dir. En düşük aktivite ise %61,8 ile hyaluronik asit ile desteklenmiş gruptadır. Aynı grup için alkalen fosfataz enzim aktivitesi %97 dir.

Tüm bu sonuçlar değerlendirilecek olursa kitosan tabanlı üretilen doku iskelelerinde alkalen fosfataz enzim aktiviteleri, polistren hücre kültür kabındaki göre daha fazladır. MC3T3-E1 hücrelerinin kitosan doku iskelelerine ekilmesiyle bir osteoblast dokusu oluşturmak amacıyla enzim aktivitelerini artırdıkları yorumu yapılabilir. Bu şekilde bir doku iskelesi hazırlandığında özellikle ilk üç günde TZP'nin hücre canlılığına olan olumlu etkisi göze çarpmaktadır. TZP'nin etkisinin kısa sürmesi, yapısının kısa sürede bozulmasıyla ilgili olduğu söylenebilir. Bu durum Shrivats ve arkadaşları tarafından desteklenmektedir [20]. TZP'nin kemik doku oluşumunda kısa süreli bu etkisinin uzatılmasıyla kemik rejenerasyonu için daha verimli doku iskeleleri elde edilebilir. Hyaluronik asitin ise hücre canlılığına etkisi 3. ve 7. günlerde en fazladır. TZP ve hyaluronik asitin birlikte kullanılarak kontrollü salımları söz konusu olduğunda daha verimli doku iskeleleri üretilebilir. Kollajenin MC3T3-E1 hücreleri üzerine canlılık konusunda bir etkisi TZP'ye göre biraz düşüktür. Ancak hiçbir şekilde desteklenmeyen kitosan doku iskelelerinde kollajenin etkisi, hücre canlılığının yüksekliği göze çarpmaktadır [92]. ALP enzim aktivitesinde diğer grupların tümüyle karşılaştırıldığında on gün boyunca bir kararlılık sağladığı söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Gümüřdereliođlu M, Mavis B, Karakeçili A, Kahraman AS, Çakmak S, Tığlı S, Demirtař TT, Aday S, Doku Mühendisliğinde Nanoteknoloji. Bilim ve Teknik 2007.
2. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL, Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Deliv Reviews* 59: 207-233, 2007.
3. Işıklı C, Preparation and characterization of chitosan-gelatin/hydroxyapatite scaffolds for hard tissue engineering approaches. Yüksek Lisans Tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, 2010.
4. Dutta PK, Dutta J, Tripathi VS, Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research* 63: 20-31, 2004.
5. şenköylü A, Korkusuz F, Kıkırdak Onarımında Doku Mühendisliği Uygulamaları. TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliđi Derneđi) Dergisi 2004.
6. Subramanian G, Bialorucki C, Yildirim-Ayan E, Nanofibrous yet injectable polycaprolactone-collagen bone tissue scaffold with osteoprogenitor cells and controlled release of bone morphogenetic protein-2. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 51: 16-27, 2015.
7. Brydone AS, Meek D, Maclaine S, Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H-Journal of Engineering in Medicine* 224: 1329-1343, 2010.
8. Berlemann U, Ferguson SJ, Nolte LP, Hein PF, Adjacent vertebral failure after vertebroplasty - A biomechanical investigation. *Journal of Bone and Joint Surgery* 84B: 748-752, 2002.
9. Ryu K-S, Shim J-H, Heo H-Y, Park C-K, Therapeutic Efficacy of Injectable Calcium Phosphate Cement in Osteoporotic Vertebral Compression Fractures: Prospective Nonrandomized Controlled Study at 6-Month Follow-up. *World Neurosurgery* 73: 408-411, 2010.
10. Amini AA, Nair LS, Injectable hydrogels for bone and cartilage repair. *Biomedical Materials* 7: 2012.
11. Kulinets I., Regulatory Affairs for Biomaterials and Medical Devices. Biomaterials and their applications in medicine. 1-10. S. F. Amato and R.M.E. Jr. Woodhead Publishing, UK, 2015.

12. Bisceglie V, Über die antineoplastische immunität; heterologe einpflanzung von tumoren in hühner-embryonen. Ztschr Krebsforsch 40: 122-140, 1933.
13. Chick W, Like A, Lauris V, Beta cell culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas. ;. Science 187:847-849., 1975.
14. Burke J, Yannas I, Quinby WJ, Bondoc C, Jung W, Successful use of aphysiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. Ann Surg. 194: 413-428, 1981.
15. West Jennifer L, Hubbell Jeffrey A, Polymeric Biomaterials with Degradation Sites for Proteases Involved in Cell Migration. Macromolecules 32: 241-244, 1998.
16. Burg K, Porter S, Kellam J, Biomaterial developments for bone tissue engineering. Biomaterials 2000.
17. LeGeros R, Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. Clin Orthop Relat Res 81-98, 2002.
18. Sachlos E, Czernuszka JT, Making tissue engineering scaffolds work. review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. European Cells and Materials 5: 29-40, 2003.
19. Bone Diseases. US National Library of Medicine. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/bonediseases.html> (Erişim tarihi: 09.05.2015)
20. Shrivats Arun R, Alvarez P, Schutte L, Hollinger JO, Bone regeneration. Principles of Tissue Engineering 1201-1221, 2014.
21. Hollinger J, Wong MEK, The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics 82: 594-606, 1996.
22. Anonim, Low bone density.<http://nof.org/articles/8> (Erişim tarihi: 09.05.2015)
23. Taylor RB, Living with osteoporosis. <http://www.webmd.com/osteoporosis/living-with-osteoporosis7/causes> (Erişim tarihi: 09.05.2015)
24. Anonim, <http://www.oif.org/>.<http://www.oif.org/> (Erişim tarihi: 09.05.2015)

25. Anonim, Paget's disease of bone.http://en.wikipedia.org/wiki/Paget's_disease_of_bone (Erişim tarihi: 9.5.2015)
26. Anonim, Bone Cancer.US National Library of Medicine.<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/bonecancer.html> (Erişim tarihi: 09.05.2015)
27. Pilipchuk Sophia P, Plonka Alexandra B, Monje A, Taut Andrei D, Lanis A, Kang B, Giannobile William V, Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. *Dental Materials* 31: 317-338, 2015.
28. Wieman TJ, Smiell JM, Su YC, Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers - A phase III randomized placebo-controlled double-blind study. *Diabetes Care* 21: 822-827, 1998.
29. Nevins M, Giannobile WV, McGuire MK, Kao RT, Mellonig JT, Hinrichs JE, McAllister BS, Murphy KS, McClain PK, Nevins ML, Paquette DW, Han TJ, Reddy MS, Lavin PT, Genco RJ, Lynch SE, Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: Results of a large multicenter randomized controlled trial. *Journal of Periodontology* 76: 2205-2215, 2005.
30. Saygin NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, Somerman MJ, Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. *Journal of Periodontology* 71: 1591-1600, 2000.
31. Yamano S, Haku K, Yamanaka T, Dai J, Takayama T, Shohara R, Tachi K, Ishioka M, Hanatani S, Karunagaran S, Wada K, Moursi AM, The effect of a bioactive collagen membrane releasing PDGF or GDF-5 on bone regeneration. *Biomaterials* 35: 2446-2453, 2014.
32. Seo BB, Choi H, Koh JT, Song SC, Sustained BMP-2 delivery and injectable bone regeneration using thermosensitive polymeric nanoparticle hydrogel bearing dual interactions with BMP-2. *J Control Release* 209: 67-76, 2015.
33. Sefat F., Denyer MC, Youseffi M, Effects of different transforming growth factor beta (TGF-beta) isomers on wound closure of bone cell monolayers. *Cytokine* 69: 75-86, 2014.
34. Khan SN, Bostrom MPG, Lane JM, Bone growth factors. *Orthopedic Clinics of North America* 31: 375-387, 2000.

35. Mohamad MI, Khater MS, Evaluation of insulin like growth factor-1 (IGF-1) level and its impact on muscle and bone mineral density in frail elderly male. Arch Gerontol Geriatr 60: 124-127, 2015.
36. Bliley Jacqueline M, Marra Kacey G. Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences. Polymeric Biomaterials as Tissue Scaffolds. 149-161. Elsevier, 2015.
37. Dietmar WH, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials 21: 2529-2543, 2000.
38. Kathuria N., Tripathi A., Kar KK., Kumar A., Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan-gelatin cryogels for tissue engineering. Acta Biomater 5: 406-418, 2009.
39. Subia B, Kundu J, Kundu SC, Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications. Intech Open 2010.
40. Nilay C, Sabri EM, Nanofiber Structured Polymeric Tissue Scaffolds. Tekstil ve Mühendis 38-50, 2014.
41. Lu L, Mikos AG, The importance of new processing techniques in tissue engineering. MRS Bull 1996.
42. Mikos AG, Bao Y, Linda LG, Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. J. Biomed. Mater. Res 27: 183-189, 1993.
43. Maquet V, Jerome R. Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation. in Materials Science Forum. 1997. Trans Tech Publ.
44. YANG S, LEONG K-F, DU MSMEZ, CHUA C-K, The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. Tissue Engineering 7: 679-689, 2001.
45. Harris LD, Kim BS, Mooney DJ, Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. J Biomed Mater Res 5: 396-402, 1998.
46. Anonim, ppl.ippt.gov.pl Poland. (Erişim tarihi: 03.05.2015)
47. Harriger MD, Supp AP, Warden GD, Boyce ST, Glutaraldehyde crosslinking of collagen substrates inhibits degradation in skin substitutes grafted to athymic mice. J. Biomed. Mater. Res 35: 137-145, 1997.

48. Wu X, Black L, Santacana-Laffitte G, Patrick CW, Preparation and assessment of glutaraldehyde-crosslinked collagen-chitosan hydrogels for adipose tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res* 81: 59-65, 2007.
49. Chvapil M, Owen JA, Clark DS, Effect of collagen crosslinking on the rate of resorption of implanted collagen tubing in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res* 11: 297-314, 1977.
50. Yannas IV, Burke JF, Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *Journal of biomedical materials research* 14: 65-81, 1980.
51. Rémi P-B, Robert G, François B, Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials* 3: 1863-1887, 2010.
52. Gonçalves VL, Laranjeira MCM, Fávere VT, Effect of Crosslinking Agents on Chitosan Microspheres in Controlled Release of Diclofenac Sodium. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 15: 6-12, 2005.
53. Muzzarelli RAA, Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers* 77: 1-9, 2009.
54. Koo HJ, S, Song YS, Kim HJ, Park EH, Anti-inflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *European Journal of Pharmacology* 495: 201–208, 2004.
55. Anonim, <http://www.Boyutft.Com/Biostat>.(Erişim tarihi: 28.4.2015)
56. Prasitslip M, Jenwithisuk R, Kongsuwan K, Damrongchai N, Watts P, Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation. *Journal of Mater Sci:Mater med* 2000.
57. Wang YC, Lin MC, Wang DM, Hsieh HJ, Fabrication of a novel porous PGA-Chitosan Hybrid Matrix for Tissue engineering. *Biomaterials* 24: 1047–1057, 2003.
58. Zhu A, Zhang M, Wu J, Shen J, Covalent immobilization of chitosan/heparin complex with a photosensitive heterobifunctional crosslinking reagent on PLA surface. *Biomaterials* 23: 2002.
59. Jarry C, Chaput C, Chenite A, Renaud MA, Buschmann M, Leroux JC, Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels. *Journal of Biomed Material Res* 58: 127-135, 2001.
60. Anonim, www.bae.ncsu.edu.(Erişim tarihi: 09.05.2015)
61. Anonim, www.vanson.com.(Erişim tarihi: 09.05.2015)

62. Dutta PK, Ravikumar MNV, Dutta J, Chitin and Chitosan for versatile applications. *JMS polimer rev* 2002.
63. Mucha M, Rheological characteristics of semi-dilute chitosan solutions. *Macromol Chem Phys* 198: 471-484, 1997.
64. Wu S, Shen J, Electrorheological properties of chitin suspensions. *J Appl Polym Sci* 60: 2159-2164, 1996.
65. Shilpa A, Agrawal SS, Ray AR, Controlled delivery of drugs from alginate matrix. *JMS polimer rev* 2003.
66. Felt O, Buri P, Gurny R, Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug dev Ind Pharm* 24: 979-993, 1998.
67. John AMR, Jerome A, Werkmeister, Glattauer V, Collagen-Based Biomaterials. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 335-382, 1995.
68. Vrana NE, Collagen-Based Scaffolds For Cornea Tissue Engineering. *Yüksek Lisans Tezi. Orta doğu teknik üniversitesi, Ankara*, 2006.
69. Gorham S. Biomaterials. Collagen as a biomaterial. 55-122. Stockton Press New York, 1991.
70. Cooperman L, Michaeli D, The immunogenicity of injectable collagen. 1. 1-year prospective study. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1984.
71. Maria JHN, Michel RM, Flaviai ACF, Stephen EF, Alvaro FB, Valdir GG, Tatiana MD, Luiz GNdM, Effectiveness of Two Methods for Preparation of Autologous Platelet-Rich Plasma: An Experimental Study in Rabbits. *European Journal of Dentistry* 4: 395-402, 2010.
72. Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H, Platelet-Rich plasma contains high level of platelet-derived growth factor and transforming growth factor and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *Journal of Periodontol* 74: 849-857, 2003.
73. Conde Montero E, Fernández Santos ME, Suárez Fernández R, Platelet-Rich Plasma: Applications in dermatology. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)* 106: 104-111, 2015.
74. Mariani E, Filardo G, Canella V, Berlingeri A, Bielli A, Cattini L, Landini MP, Kon E, Marcacci M, Facchini A, Platelet-rich plasma affects bacterial growth in vitro. *Cytotherapy* 16: 1294-1304, 2014.

75. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, Szczepanski T, Krol W, Wielkoszynski T, Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *Journal of Bone And Joing Surgery-British* Volume 417-420, 2007.
76. Diaz-Gomez L, Alvarez-Lorenzo C, Faheem A, Sheikh, TravisCantu, Desai R, Garcia VL, JavierMacossay, Concheiro A, Silva M, Dominguez F, Biodegradable electrospun nanofibers coated with platelet-rich plasma for cell adhesion and proliferation. *Material science and Engineering* 2013.
77. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu DL, Chen ZZ, Han ZC, Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica-the Hematology Journal* 91: 1017-1026, 2006.
78. Troyer DL, Weiss ML, Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 26: 591-599, 2008.
79. Wen Y, Gu W, Cui J, Yu M, Zhang Y, Tang C, Yang P, Xu X, Platelet-rich plasma enhanced umbilical cord mesenchymal stem cells-based bone tissue regeneration. *Arch Oral Biol* 59: 1146-54, 2014.
80. Bi L, Cheng W, Fan H, Pe G, Reconstruction of goat tibial defects using an injectable tricalcium phosphate/chitosan in combination with autologous platelet-rich plasma. *Biomaterials* 31: 3201-3211, 2010.
81. Burdick JA, Prestwich GD, Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Adv Mater* 23: H41-56, 2011.
82. Dicker KT, Gurski LA, Pradhan-Bhatt S, Witt RL, Farach-Carson MC, Jia X, Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater* 10: 1558-70, 2014.
83. Edouard P, Rannou F, Coudeyre E, Animal evidence for hyaluronic acid efficacy in knee trauma injuries. *Review of animal-model studies. Phys Ther Sport* 14: 116-23, 2013.
84. Anonim, <http://www.pharmetic.org/> (Erişim tarihi: 08.06.2015)
85. F. KJ, Sandrine R, Practical aspects of hyaluronan based medical products. *International Journal of Biological Macromolecules* 39: 321-322, 2006.
86. Prestwich G, Ghaly T, Brudnicki P, Ratliff B, Goligorsky M, *Regenerative Nephrology*, London, 2010.

87. D. AD, Jane G-AK, Review. Hyaluronan: A powerful tissue engineering tool. *Tissue Engineering* 12: 2131-2140, 2006.
88. Condie RC, Prestwich GD, *Injectable biomaterials: science and application*. Woodhead Publishing 2010.
89. Prestwich GD, *Biomaterials from chemically modified hyaluronan*. <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA18/HA18E.html> (Erişim tarihi: Kasım 2010).
90. Cui N, Qian J, Liu T, Zhao N, Wang H, Hyaluronic acid hydrogel scaffolds with a triple degradation behavior for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* 2015.
91. GenScript U, *Double stain apoptosis detection kit technical manual*.
92. Wang C, Xie XD, Huang X, Liang ZH, Zhou CR, A quantitative study of MC3T3-E1 cell adhesion, morphology and biomechanics on chitosan-collagen blend films at single cell level. *Colloids Surf B Biointerfaces* 132: 1-9, 2015.

EKLER

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi: 07.08.2014

Toplantı Sayısı: 14/08

Karar No: 14/67

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 07.08.2014 Perşembe günü saat 13:00'de Prof.Dr.Siyami KARAHAN'ın başkanlığında toplanarak gündemdeki konuları görüştü.

:Üniversitemiz Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyesi .Doç.Dr.Mustafa TÜRK tarafından yürütülecek '**Elektrospinleme ve Freeze-drying Yöntemleriyle Hazırlanmış Üç Boyutlu Skafoldların In vivo Sert Doku İyileşmesindeki Etkilerinin Araştırılması**' isimli proje incelenerek Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu Yönergesinde belirtilmiş olan Etik İlkelerine uygun olduğuna karar verilmiştir.

PROJEDE GÖREVLİ PERSONEL			
Sıra	Proje Görevi	İsim	Kurum
1	Proje Yürütücüsü	.Doç.Dr.Mustafa TÜRK	K.Ü.Mühendislik Fakültesi
2	Araştırmacı	Prof.Dr.Siyami KARAHAN	K.Ü.Veteriner Fakültesi
3	Araştırmacı	Aykut TOPÇU	K.Ü.Fen-Edebiyat Fakültesi
		Selçuk TOKLUCA	K.Ü.Fen Bilimleri Ens.
		Murat DEMİRBİLEK	Hacettepe Üniversitesi Merkezi Arş.Lab.

Prof.Dr.Siyami KARAHAN

Başkan

Prof.Dr.Zuhar AKTUNA

Üye

Yrd.Doç.Dr.Özlem BOYBEYL

Üye

Dr.Serap YÖRÜBULUT

Üye

Ümit ÖZGÜ

Üye

Prof.Dr.Hakan KALENDER

Başkan Vekili

Prof.Dr.Umut TEKİN

Üye

Yrd.Doç.Dr.Nahit PAMUKOĞLU

Üye

Mustafa AKIN

Üye