



T.C.

**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MODİFİYE BIOGLASS:
SERT DOKU MÜHENDİSLİĞİ AÇISINDAN
İN VİTRO VE İN VİVO ETKİNLİK DEĞERLENDİRMESİ.**

YASİN ÖZKABADAYI

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Siyami KARAHAN

KIRIKKALE-2022



T.C.

**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MODİFİYE BIOGLASS:
SERT DOKU MÜHENDİSLİĞİ AÇISINDAN
İN VİTRO VE İN VİVO ETKİNLİK DEĞERLENDİRMESİ.**

YASİN ÖZKABADAYI

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Siyami KARAHAN

KIRIKKALE-2022

Yasin ÖZKABADAYI tarafından hazırlanan “MODİFİYE BIOGLASS: SERT DOKU MÜHENDİSLİĞİ AÇISINDAN İN VİTRO VE İN VİVO ETKİNLİK DEĞERLENDİRMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Siyami KARAHAN

İmza.....

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Başkan : Prof. Dr. Hakan KOCAMIŞ

İmza.....

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Prof. Dr. Emel ERGÜN

İmza.....

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Prof. Dr. Şerife TÜTÜNCÜ

İmza.....

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Doç. Dr. Uğur TİFTİKÇİ

İmza.....

Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: 28/06/2022

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Mehmet Akif KARSLI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dökümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza.....

Yasin ÖZKABADAYI

...../...../.....

ÖZET

MODİFİYE BIOGLASS: SERT DOKU MÜHENDİSLİĞİ AÇISINDAN *İN VİTRO* VE *İN VİVO* ETKİNLİK DEĞERLENDİRMESİ

Kırıkkale Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Siyami KARAHAN

Haziran 2022, 192 sayfa

Bu tez çalışmasının amacı; yüzey modifikasyonu yapılan bioglass'ın *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla sert doku mühendisliği açısından etkinliğinin değerlendirilmesidir. Kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanımı olan bioglass belirli ölçüde osteokondüktivitesi ve biyouyumluluğu olan bir biyomateryaldir. Ancak bioglass'ın üretim tekniğine bağlı olarak biyouyumluluk ve osteoindüktivite kapasitesi değişmektedir. Biyomateryal canlı dokuya uygulandığında doku-biyomateryal ilişkisi ilk olarak biyomateryalin yüzeyinde gerçekleşir. Bu nedenle konak doku ile biyomateryal yüzeyi arasındaki fiziksel ve kimyasal etkileşimler biyouyumluluk üzerinde önemli bir rol oynar. Bu tez çalışmasında bioglass'ın biyouyumluluğunun ve osteojenik potansiyelinin artırılması için yüzey modifikasyonu yapıldı. Üretilen bioglass yapay vücut sıvısı içerisine lizin, histidin, arjinin, fenilalanin, aspartik asit ve sisteinden oluşan amino asit karışımı katılarak elde edilen solüsyona maruz bırakılarak yüzey modifikasyonu gerçekleştirildi. Üretilen modifiye bioglass'ın FT-IR ve SEM incelemeleri ile fiziksel karakterizasyonu yapıldı. Modifiye bioglass'ın biyouyumluluğu ve etkinliği *in vitro* ve *in vivo* testlerle değerlendirildi. *İn vitro* olarak hücre canlılığını göstermek için yapılan MTT testinde modifiye bioglass'ın L929 ve MC3T3-E1 preosteoblastlar üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı ve hücre canlılık oranlarının 1:1 konsantrasyonda sırasıyla %84,64 ve %86,94 olduğu görüldü. MC3T3-E1 preosteoblastlarının hücre morfolojisini floresan mikroskopta değerlendirmek için yapılan Calcein AM testinde modifiye bioglass grubunda sferoid morfolojinin ve hücre canlılığının daha yüksek olduğu görüldü. Annexin V testinde apoptoz- nekroz oranlarının düşük olduğu (%98,23 $\pm$ 0,05 canlılık, %1,29 $\pm$ 0,15 apoptoz ve 0,46 $\pm$ 0,10 nekroz, 3.gün) görüldü. Genotoksisiteyi değerlendirmek için yapılan mikronükleus testinde çok düşük toksisite oranları belirlendi (3 saat uygulama için %1,36 S9 (+) ve %1,4 S9 (-), 24 saatlik uygulama için hesaplanan %1,56, $p>0,05$). Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 preosteoblast

hücrelerinin SEM görüntülerinde osteojenik farklılaşmasının ve hücre tutunmasının diğer gruplara göre daha iyi olduğu görüldü. Osteoblast farklılaşmasının erken belirteci olan ALP aktivitesinin modifiye bioglass grubunda daha yüksek olduğu ($2,893 \pm 0,514$ ng/mL, $p=0,036$) tespit edildi. Alizarin Red S boyaması ile *in vitro* mineralizasyonun modifiye bioglass grubunda daha iyi olduğu, semikantitatif ve kolorimetrik olarak belirlendi ($0,36 \pm 0,012$ mM, $p=0,0003$). *In vivo* çıplak farelerde yapılan osteoindüktif potansiyel testinde modifiye bioglass'ın osteoindüktif potansiyelinin %16,04 olduğu belirlendi. Ekstremité performans testi değerlendirmesinde modifiye bioglass'ın karşılaştırılan diğer gruplardan daha üstün olduğu görüldü (3 aylık değerlendirme skoru 6 (5-7), $p=0,03$). İmplantasyon sonrası lokal etki değerlendirmesinde ise iritan etkisinin bulunmadığı görüldü (Skorlar; 1 ay: 0,7; 2 ay: 0,43; 3 ay:0,2). Sonuç olarak bioglass yüzeyine amino asit karışımı içeren yapay vücut sıvısı ile yapılan yüzey modifikasyonunun biyouyumluluğu ve osteojeniteyi iyileştirdiği; bu çalışma kapsamında değerlendirilen modifiye bioglass'ın sert doku mühendisliği için umut verici bir biyomalzeme olduğu görülmektedir.

Anahtar kelimeler: Modifiye bioglass, osteoindüktif potansiyel, yüzey modifikasyonu, genotoksisite, biyouyumluluk, implantasyon, MC3T3-E1.

ABSTRACT

MODIFIED BIOGLASS: IN VITRO AND IN VIVO EFFICACY EVALUATION BY MEANS OF HARD TISSUE ENGINEERING

Kırıkkale University

Graduate School of Health Sciences

Department of Veterinary Histology and Embryology, Ph.D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Siyami KARAHAN

June 2022, 192 pages

The aim of this thesis study is to evaluate the efficiency of surface modified bioglass in terms of hard tissue engineering with *in vitro* and *in vivo* studies. Bioglass is a biomaterial with a certain degree of osteoconductivity and biocompatibility and, thus is used in bone tissue engineering. Biocompatibility and osteoinductivity properties of bioglass vary depending on the technique to synthesize bioglass. When the biomaterial is applied to living tissues, the tissue-biomaterial interaction first occurs on the surface of the biomaterial; therefore, the physical and chemical interactions between the host tissue and the surface of the biomaterial play a key role on biocompatibility. In this study, we aimed to modify bioglass surface to increase biocompatibility and osteogenic potential. Exposing to the simulated body fluid solution containing an amino acid mixture consisting of lysine, histidine, arginine, phenylalanine, aspartic acid and cysteine, the produced bioglass was surface modified. The surface modified bioglass was examined by FT-IR and SEM examinations. The biocompatibility and efficacy of the modified bioglass were evaluated by *in vitro* and *in vivo* tests. The MTT test, which was performed to evaluate cell viability *in vitro*, indicated that the modified bioglass did not exert a cytotoxic effect on L929 fibroblasts and MC3T3-E1 preosteoblasts with cell viability rates of 84,64% and 86,94%, respectively at the 1:1 dilution. Calcein AM test, a test to evaluate cell morphology of MC3T3-E1 preosteoblasts at a fluorescence microscope that indicated spheroid morphology and cell viability were higher in modified bioglass group. The Annexin V test revealed a low rate of apoptosis-necrosis with a cell viability rate of $98,23 \pm 0,05$ and apoptotic and necrotic rates of $1,29\% \pm 0,15$ and $0,46 \pm 0,10$, respectively at day 3. The micronucleus test to evaluate genotoxicity revealed very low toxicity rates; 1,36% S9 (+) and 1,4% S9 (-) for 3 hours and 1,56% for 24 hours, respectively ($p > 0.05$). SEM images of MC3T3-E1 preosteoblast cells cultivated on modified bioglass showed that osteogenic differentiation and cell adhesion were better than the other groups. The ALP activity,

which is an early marker of osteoblast differentiation, was higher in the modified bioglass group (2.893 ± 0.514 ng/mL, $p=0.036$). Alizarin Red S staining, an *in vitro* test to evaluate mineralization semi-quantitatively and colorimetrically, resulted in higher value in the modified bioglass group, (0.36 ± 0.012 mM, $p=0.0003$). In the osteoinductive potential test performed in nude mice *in vivo*, the osteoinductive potential of modified bioglass was determined to be 16.04%. The extremity performance test revealed that the modified bioglass was superior to the other groups (3-month evaluation score 6 (5-7), $p=0.03$). No local irritant effect was found after implantation (Scores; 1 month: 0.7; 2 months: 0.43; 3 months: 0.2). As a result, the surface modification process of the bioglass with a simulated body fluid containing an amino acid mixture applied to the bioglass surface improved biocompatibility and osteogenicity that indicates the modified bioglass evaluated within the scope of this study is a promising biomaterial for hard tissue engineering.

Keywords: Modified bioglass, osteoinductive potential, surface modification, genotoxicity, biocompatibility, implantation, MC3T3-E1.

TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın ilk gününden itibaren gerek bilimsel gerek sosyal anlamda yaptığı ince dokunuşlarla her anlamda yol göstericim olan danışman hocam Prof. Dr. Siyami KARAHAN'a; tez izleme komitemde yer alan Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hakan KOCAMIŞ'a ve Doç. Dr. Uğur TİFTİKÇİ'ye; histoloji camiasına girdiğimden bu yana desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Anabilim Dalı'mız öğretim üyesi Prof. Dr. Aytül KÜRÜM'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamın başından itibaren malzeme sentezi ve modifikasyonu ile ilgili bilgilerinden ve engin tecrübelerinden istifade ettiğim Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e; elektron mikroskop görüntülerim için zorlu pandemi koşullarında yoğun emek harcayan ve desteğini esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Ümit ERDEM'e; *in vitro* çalışmalarımda yardımcı olan KÜBTUAM'ın uzman personellerine teşekkür ederim.

Tez çalışmamın hayvan deneyleri aşamasında kendi çalışmaları gibi sahiplenerek destek veren çok kıymetli ekip arkadaşlarıma teşekkür etmek istiyorum. Başta ekibimizin maestrosu olan kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ali KUMANDAŞ'a; Anabilim Dalı'mız doktora öğrencisi Öğr. Gör. Salih ERAT'a; hayvan deneylerini yaptığımız günlerde stajyer olan şu anda da yeni mezun olan meslektaşlarım Vet. Hek. Mert Feyzullah ÇOBAN'a, Vet. Hek. Süleyman ARKAÇ'a ve Vet. Hek. Abdullah Samet ALAGÖZ'e; sabahın erken saatlerinden gece yarısına kadar benimle birlikte çalışan, bana destek olan 2020-2021 yaz dönemi stajyer öğrencilerine; deney hayvanları ünitemizin kıymetli personeli Murat İĞDE'ye ve tez materyalimin sterilizasyonu için her daim yardımcı olan Hasan ALTUNTAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Doğduğum günden itibaren büyük zorluklarla beni bu günlere getiren maddi manevi her koşulda desteklerini esirgemeyen Anne ve Babama teşekkür ederim.

Bu zorlu ve sancılı tez sürecimde her zaman yanımda olan, en bunaldığım ve zorlandığım zamanlarda beni hep motive eden, tez çalışmalarım esnasında günlerce vakit ayıramadığım, ihmal ettiğim tüm zamanları sabırla ve hoşgörüyle karşılayan ve dualarını benden eksik etmeyen sevgili eşim Bakiye ÖZKABADAYI'ya ve biricik oğlum Emir Asaf'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET.....	III
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XXII
1. GİRİŞ	1
1.1. Kemik Doku	2
1.2. Kemiğin Histolojisi.....	4
1.3. Kemik Zarları	7
1.4. Kemiğin Vaskülarizasyonu.....	9
1.5. Kemiğin Bileşimi.....	10
1.5.1. Kemik Hücreleri.....	10
1.5.1.1. Osteoprogenitör Hücreler.....	10
1.5.1.2. Osteoblastlar	11
1.5.1.3. Osteositler	12
1.5.1.4. Osteoklastlar	14
1.6. Kemik Dokunun Hücrelerarası Maddesi	16
1.7. Kemik Fizyolojisi	18
1.7.1. Mineralizasyon	18
1.7.2. Kemik Oluşumu (Osteogenez, Ossifikasyon)	18
1.7.3. Kemik Büyümesi, Modelleme ve Remodeling	20
1.8. Kırık İyileşmesi	20
1.8.1. Primer Kırık İyileşmesi	21
1.8.2. Sekonder Kırık İyileşmesi.....	22
1.8.2.1. İnflamasyon Fazı.....	23
1.8.2.2. Proliferasyon Fazı	23
1.8.2.3. Remodeling Fazı	24

1.9.	Kemik Defektleri	25
1.10.	Doku Mühendisliği Yaklaşımı	26
1.10.1.	Doku Mühendisliğinde Büyüme Faktörlerinin Kullanımı	27
1.10.2.	Doku Mühendisliğinde Hücre Temelli Tedavi Yaklaşımları	29
1.10.3.	Doku Mühendisliğinde Doku İskelelerinin Kullanımı	31
1.10.3.1.	Doğal İskeleler	32
1.10.3.2.	Sentetik İskeleler	34
1.10.3.3.	Polimerler	34
1.10.4.	Kemik Doku Mühendisliği	35
1.10.5.	Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomateryaller	37
1.10.5.1.	Polimerler	37
1.10.5.2.	Biyoseramikler	38
1.10.6.	Kemik Greftleri	38
1.10.6.1.	Otogreftler	40
1.10.6.2.	Allogreftler	40
1.10.6.3.	Sentetik Kemik Grefti İkameleri	41
1.10.7.	Kemik Doku Mühendisliğinde Hayvan Modelleri	43
1.10.7.1.	Kalvaryal Kemik Defekti	44
1.10.7.2.	Segmental Kemik Defekti	45
1.11.	Bioglass	45
1.12.	Biyomalzeme Yüzey Modifikasyonu	48
1.13.	Yüzeylerin Biyolojik Modifikasyonu	51
1.13.1.	Amino Asitlerle Yüzey Modifikasyonu	52
1.14.	Çalışmanın Amacı	52
2.	MATERYAL METOT	54
2.1.	Hayvan Deneyleri İçin Etik Kurul Onayı	54
2.2.	<i>İn vitro</i> Hücre Kültürü	55
2.2.1.	Hücre Kültür Metodu	55
2.3.	Bioglass Sentezi	56
2.4.	Bioglass'ın Modifikasyonu	57
2.5.	MB'nin Fiziksel Karakterizasyonu	59
2.5.1.	FTIR Analizi	59
2.5.2.	Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Görüntüleme	60

2.6. <i>In vitro</i> Etkinlik ve Biyouyumluluk Testleri	62
2.6.1. MTT Testi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi.....	62
2.6.2. Apoptoz-Nekroz Testi.....	63
2.6.3. <i>İn vitro</i> Mikronükleus Testi	63
2.6.4. Hücre Tutunma Testi ve Taramalı Elektron Mikroskop İncelemesi	65
2.6.5. Alkalen Fosfataz Aktivitesi Testi.....	66
2.6.6. Alizarin Red S ile Kalsiyum Gösterilmesi.....	66
2.6.7. Alizarin Red S ile Kalsiyum Birikimlerinin Kolorimetrik Yöntemle Gösterilmesi	67
2.6.8. Calcein AM/Propidium İodide ile Hücre Canlılığının Gösterilmesi	68
2.7. Osteoindüktif Potansiyel Testi.....	69
2.7.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Bakım Besleme Koşulları	69
2.7.2. Hayvanların Hazırlanması	69
2.7.3. Demineralize Kemik Materyalinin Gluteal Kaslar Arası Boşluğa Uygulanması	70
2.7.4. Hayvanların Gözlemlenmesi.....	71
2.7.5. Değerlendirme.....	71
2.7.6. Makroskobik ve Mikroskopik Değerlendirme.....	71
2.8. Ekstremitte Performans Testi	72
2.8.1. Histokimyasal Boyamalar	74
2.8.2. Değerlendirme.....	75
2.9. İmplantasyon Testi	75
2.9.1. Tanım	75
2.9.2. Kullanılan Deney Hayvanları	75
2.9.3 Metot	76
2.9.4. Hayvanların gözlemlenmesi.....	76
2.9.5. Değerlendirme.....	76
2.9.6. Makroskobik Değerlendirme	76
2.10. İstatistik hesaplamalar	77
3. BULGULAR.....	78
3.1. Modifiye Bioglass'ın Fiziksel Karakterizasyonu	78
3.1.1. FT-IR Sonuçları.....	78
3.1.2. SEM Görüntüleme Sonuçları	82
3.2. <i>In vitro</i> Etkinlik ve Biyouyumluluk Testlerinin Sonuçları	85

3.2.1.	<i>In vitro</i> Sitotoksisite Testi Sonuçları.....	85
3.2.2.	<i>In vitro</i> Apoptoz-Nekroz Testi Sonuçları.....	86
3.2.3.	<i>In vitro</i> Genotoksisite Testi Sonuçları	92
3.2.4.	SEM ile Hücre Tutunma Testi Sonuçları.....	94
3.2.5.	<i>In vitro</i> Alizarin Red S ile Boyama sonuçları	101
3.2.6.	<i>In vitro</i> ALP Aktivite Testi Sonuçları.....	110
3.2.7.	Calcein AM ile Canlılığın Gösterilmesi.....	113
3.3.	Osteoindüktif Potansiyel Testi Sonuçları	120
3.4.	Kemik Defektinde Etkinlik Testi Sonuçları	123
3.5.	İmplantasyon Testi Sonuçları.....	140
4.	TARTIŞMA ve SONUÇ	146
	KAYNAKLAR	159
	EKLER.....	189
EK.1.	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı	189
	ÖZGEÇMİŞ.....	192

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. OECD 487 mikronükleus testinde yapılan uygulamalar.....	64
Çizelge 2.2. Ekstremitte performans testi için deney grupları.	73
Çizelge 2.3. Emery skorlama sistemine göre kemik defektinin histopatolojik değerlendirilmesi.....	75
Çizelge 2.4. ISO 10993-6 Tablo 1 (Annex 5) – Semikantitatif Histopatolojik Skorlama	77
Çizelge 3.1. L-929 hücre hattı için hesaplanan MTT testi sonuçları.	85
Çizelge 3.2. MC3T3-E1 hücre hattı için hesaplanan MTT testi sonuçları.....	86
Çizelge 3.3. Biyomateryaller üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin, kültürün 3, 7 ve 14. günlerinde Annexin V- FITC kiti ile belirlenen apoptoz-nekroz ve canlılık oranları.....	87
Çizelge 3.4. <i>İn vitro</i> mikronükleus testine ait hücre sayıları ve hesaplanan değerler.	92
Çizelge 3.5. <i>İn vitro</i> mikronükleus testinde hesaplanan mikronükleus oranlarının (%) istatistik olarak karşılaştırması.....	93
Çizelge 3.6. <i>In vitro</i> Alizarin Red S konsantrasyonunun gruplara ve zamana bağlı değişimi.....	109
Çizelge 3.7. <i>In vitro</i> Alizarin Red S konsantrasyonunun kültivasyonun 3. gününde gruplara ve zamana bağlı karşılaştırması	109
Çizelge 3.8. <i>In vitro</i> Alizarin Red S konsantrasyonunun kültivasyonun 7. gününde gruplara ve zamana bağlı karşılaştırması	110
Çizelge 3.9. <i>In vitro</i> Alizarin Red S konsantrasyonunun kültivasyonun 14. gününde gruplara ve zamana bağlı karşılaştırması	110
Çizelge 3.10. <i>In vitro</i> ALP aktivitesinin gruplara ve zamana bağlı değişimi.	112
Çizelge 3.11. <i>In vitro</i> ALP aktivitesinin kültivasyonun 3. gününde gruplara ve zamana bağlı karşılaştırması	112
Çizelge 3.12. <i>In vitro</i> ALP aktivitesinin kültivasyonun 7. gününde gruplara ve zamana bağlı karşılaştırması	112
Çizelge 3.13. <i>In vitro</i> ALP aktivitesinin kültivasyonun 14. gününde gruplara ve zamana bağlı karşılaştırması	113
Çizelge 3.14. Histomorfometrik Osteoindüktif Potansiyel Değerlendirme Sonuçları	122

Çizelge 3.15. Emery değerlendirme skoruna göre değerlendirilen grupların skorları ve istatistik olarak karşılaştırılması.....	140
Çizelge 3.16. 1 aylık uygulama sonunda ISO 10993-6 Tablo 1 (Annex5)'e göre semikantitatif histopatolojik skorları.	141
Çizelge 3.17. 2 aylık uygulama sonunda ISO 10993-6 Tablo 1 (Annex5)'e göre semikantitatif histopatolojik skorları.	142
Çizelge 3.18. 3 aylık uygulama sonunda ISO 10993-6 Tablo 1 (Annex5)'e göre semikantitatif histopatolojik skorları.	144



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Uzun kemiğin yapısı.	4
Şekil 1.2. Kompakt kemik yapısında osteon'a ait histolojik fotoğraf.	7
Şekil 1.3. Kompakt kemikte periost'un histolojik görüntüsü.	8
Şekil 1.4. Kompakt kemiğin diyafiz bölgesine ait histolojik fotoğraf.	10
Şekil 1.5. Osteoblast ve osteositlere ait histolojik fotoğraf.	11
Şekil 1.6. Osteosit ve osteoblastlara ait histolojik fotoğraf.	14
Şekil 1.7. Osteoklast, osteoblast ve osteositlere ait histolojik fotoğraf.	16
Şekil 1.8. Epifiz plağında endokondral ossifikasyon bölgeleri.	19
Şekil 1.9. Büyüme faktörleri dağıtımının bileşenleri	28
Şekil 1.10. Kemik doku mühendisliğinin enstrümanları.	36
Şekil 1.11. Yaygın kullanılan kemik defekt modelleri.	44
Şekil 1.12. Bioglass'ın iyonik çözünme ürünlerinin biyolojik etkileri.	47
Şekil 1.13. Yeni geliştirilen biyomateryallerin değerlendirilme aşamaları.	48
Şekil 2.1. Sol-jel yöntemiyle sentezlenen bioglass.	57
Şekil 2.2. Bioglass'ın modifikasyon işlemine ait fotoğraf.	57
Şekil 2.3. Bruker, VERTEX 70v FT-IR spektrometer cihazı.	59
Şekil 2.4. Modifiye bioglass'ın FT-IR spektrumunun ölçülmesi için spektrometer'e yerleştirilmesi.	60
Şekil 2.5. Taramalı elektron mikroskop ve görüntüleme ünitesi.	61
Şekil 2.6. Modifiye bioglass'ın sputter coater cihazı ile altınla kaplanması.	61
Şekil 2.7. MC3T3-E1 ve L929 hücre hatlarına ait MTT ölçüm plate'leri.	63
Şekil 2.8. Alizarin Red S ile kalsiyum boyaması.	67
Şekil 2.9. Kolorimetrik ölçüm için Alizarin Red S boyanması.	68
Şekil 2.10. Kolorimetrik ölçüm için mikropate'in hazırlanması.	68
Şekil 2.11. Test materyalinin yerleştiği kas bölgesi.	70
Şekil 2.12. Test materyalinin inceleme metodu.	72
Şekil 2.13. Kemik defektinde etkinlik testinin intra-operatif fotoğrafları.	73
Şekil 2.14. Kemik defektinde etkinlik testinin intra-operatif fotoğrafları.	74

Şekil 3.1. Ham bioglass'ın referans numune ile karşılaştırılması.....	79
Şekil 3.2. Ham bioglass'ın FT-IR spektrumu.	80
Şekil 3.3. Modifiye bioglass'ın FT-IR spektrumu.	81
Şekil 3.4. YVS'de işlem gören bioglass'ın FT-IR spektrumu.	81
Şekil 3.5. Ham bioglass'ın SEM görüntüsü.	82
Şekil 3.6. YVS'de bekletilen bioglass'ın SEM görüntüsü.	83
Şekil 3.7. Modifiye bioglass'ın (MB) SEM görüntüsü.	83
Şekil 3.8. Modifiye bioglass'ın (MB) SEM görüntüsü.	84
Şekil 3.9. Modifiye bioglass'ın (MB) SEM görüntüsü.	84
Şekil 3.10. 2d kültür ortamında kültivasyonun 3. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.....	88
Şekil 3.11. Ham bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinde, kültivasyonun 3. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.....	88
Şekil 3.12. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinde, kültivasyonun 3. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.....	89
Şekil 3.13. YVS'de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinde, kültivasyonun 3. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.	89
Şekil 3.14. 2d kültür ortamında kültivasyonun 14. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.....	90
Şekil 3.15. Ham bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinde, kültivasyonun 14. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.....	90
Şekil 3.16. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinde, kültivasyonun 14. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.....	91
Şekil 3.17. YVS'de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinde, kültivasyonun 14. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.....	91
Şekil 3.18. İn vitro mikronükleus testine ait negatif kontrol ve pozitif kontrol gruplarının floresan mikroskop incelemelerine ait fotoğraflar.	93
Şekil 3.19. Modifiye bioglass grubunun floresan mikroskop incelemelerine ait fotoğraflar.	94
Şekil 3.20. Modifiye bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin kültivasyonun 3. günündeki SEM görüntüsü.	95
Şekil 3.21. Sadece YVS'de tutulan bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin kültivasyonun 3. günündeki SEM görüntüsü.....	95

Şekil 3.22. Ham bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 3. günündeki SEM görüntüsü.	96
Şekil 3.23. Modifiye bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 7. günündeki SEM görüntüsü.	97
Şekil 3.24. Modifiye bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 7. günündeki SEM görüntüsü.	97
Şekil 3.25. Modifiye bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 7. günündeki SEM görüntüsü.	98
Şekil 3.26. Sadece YVS'de tutulan bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 7. günündeki SEM görüntüsü.	98
Şekil 3.27. Ham bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 7. günündeki SEM görüntüsü.	99
Şekil 3.28. Modifiye bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 14. günündeki SEM görüntüsü.	99
Şekil 3.29. Modifiye bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 14. günündeki SEM görüntüsü.	100
Şekil 3.30. Sadece YVS'de tutulan bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 14. günündeki SEM görüntüsü.	100
Şekil 3.31. İşlem uygulanmayan bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 14. günündeki SEM görüntüsü.	101
Şekil 3.32. MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu 2d kültür ortamında, kültivasyonun 3. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.	102
Şekil 3.33. Ham bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 3. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.	102
Şekil 3.34. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 3. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.	103
Şekil 3.35. YVS'de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 3. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.	103
Şekil 3.36. MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu iki boyutlu kültür ortamında, kültivasyonun 7. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.	104

Şekil 3.37. Ham bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 7. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.....	104
Şekil 3.38. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 7. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.	105
Şekil 3.39. YVS’de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 7. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.....	105
Şekil 3.40. MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu iki boyutlu kültür ortamında, kültivasyonun 14. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.	106
Şekil 3.41. İşlem görmemiş bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 14. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi....	106
Şekil 3.42. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 14. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi....	107
Şekil 3.43. YVS’de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 14. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.....	107
Şekil 3.44. Alizarin Red S Standart eğrisi ve regresyon denklemi.	108
Şekil 3.45. Alizarin Red S konsantrasyonunun zamana ve gruplara göre değişimi.	108
Şekil 3.46. SensoLyte pNPP ALP test kiti standart eğrisi ve regresyon denklemi. .	111
Şekil 3.47. ALP aktivitesinin gruplara ve zamana bağlı değişimi.	111
Şekil 3.48. MC3T3-E1 hücrelerinin 2d kültür ortamında, kültivasyonun 3. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.	114
Şekil 3.49. Ham bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 3. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.	114
Şekil 3.50. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 3. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.	114
Şekil 3.51. YVS’de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 3. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.	115

- Şekil 3.52. MC3T3-E1 hücrelerinin 2d kültür ortamında, kültürasyonun 7. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi. 115
- Şekil 3.53. Ham bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültürasyonun 7. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi..... 116
- Şekil 3.54. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültürasyonun 7. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi. 116
- Şekil 3.55. YVS’de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültürasyonun 7. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi. 117
- Şekil 3.56. MC3T3-E1 hücrelerinin 2d kültür ortamında, kültürasyonun 14. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi. 117
- Şekil 3.57. Ham bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültürasyonun 14. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi..... 118
- Şekil 3.58. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültürasyonun 14. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi. 118
- Şekil 3.59. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültürasyonun 14. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi. 119
- Şekil 3.60. YVS’de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültürasyonun 14. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi. 119
- Şekil 3.61. YVS’de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültürasyonun 14. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi. 120
- Şekil 3.62. Osteoindüktif potansiyel testinin değerlendirilmesinde kullanılan histolojik boyamalara ait görüntüler. 120
- Şekil 3.63. OİP testinin değerlendirilmesinde kullanılan toluidine mavisi ile boyanmış histolojik preparata ait görüntü..... 121
- Şekil 3.64. OİP testinin değerlendirilmesinde kullanılan Masson’un üçlü boyası ile boyanmış histolojik preparata ait görüntü..... 121
- Şekil 3.65. OİP testinin değerlendirilmesinde kullanılan Masson’un üçlü boyası ile boyanmış histolojik preparata ait görüntü..... 122
- Şekil 3.66. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 1 ay sonunda post-mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü. 123

Şekil 3.67. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 1 ay sonunda post-mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.	123
Şekil 3.68. Modifiye bioglass grubuna ait defekt alanının 1 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.	124
Şekil 3.69. Sadece YVS’de bekletilen bioglass grubuna ait defekt alanının 1 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.	124
Şekil 3.70. Ham bioglass grubuna ait defekt alanının 1 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.	124
Şekil 3.71. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 2 ay sonunda post-mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.	125
Şekil 3.72. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 2 ay sonunda post-mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.	125
Şekil 3.73. Modifiye bioglass grubuna ait defekt alanının 2 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.	125
Şekil 3.74. Sadece YVS’de bekletilen bioglass grubuna ait defekt alanının 2 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.	126
Şekil 3.75. Ham bioglass grubuna ait defekt alanının 2 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.	126
Şekil 3.76. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 3 ay sonunda post-mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.	126
Şekil 3.77. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 3 ay sonunda post-mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.	127
Şekil 3.78. Modifiye bioglass grubuna ait defekt alanının 3 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.	127
Şekil 3.79. Sadece YVS’de bekletilen bioglass grubuna ait defekt alanının 3 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.	127
Şekil 3.80. Ham bioglass grubuna ait defekt alanının 3 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.	128
Şekil 3.81. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 1 ay sonundaki histolojik görüntüsü.	128
Şekil 3.82. Şekil 3.81.’deki negatif kontrol grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.	129
Şekil 3.83. Modifiye bioglass grubuna ait defekt alanının 1 ay sonundaki histolojik görüntüsü.	129

Şekil 3.84. Şekil 3.83'deki modifiye bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.	130
Şekil 3.85. Sadece YVS'de bekletilen bioglass grubuna ait defekt alanının 1 ay sonundaki histolojik görüntüsü.	130
Şekil 3.86. Şekil 3.85.'deki sadece YVS'de bekletilen bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.	131
Şekil 3.87. İşlem uygulanmayan bioglass grubuna ait defekt alanının 1 ay sonundaki histolojik görüntüsü.	131
Şekil 3.88. Şekil 3.87.'deki işlem uygulanmayan bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.....	132
Şekil 3.89. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 2 ay sonundaki histolojik görüntüsü.....	132
Şekil 3.90. Şekil 3.89.'daki negatif kontrol grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.	133
Şekil 3.91. Modifiye bioglass grubuna ait defekt alanının 2 ay sonundaki histolojik görüntüsü.....	133
Şekil 3.92. Şekil 3.91'deki modifiye bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.	134
Şekil 3.93. Sadece YVS'de bekletilen bioglass grubuna ait defekt alanının 2 ay sonundaki histolojik görüntüsü.	134
Şekil 3.94. Şekil 3.93'deki sadece YVS'de bekletilen bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.	135
Şekil 3.95. İşlem uygulanmayan bioglass grubuna ait defekt alanının 2 ay sonundaki histolojik görüntüsü.	135
Şekil 3.96. Şekil 3.95.'deki işlem uygulanmayan bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.....	136
Şekil 3.97. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 3 ay sonundaki histolojik görüntüsü.....	136
Şekil 3.98. Şekil 3.97'deki negatif kontrol grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.	137
Şekil 3.99. Modifiye bioglass grubuna ait defekt alanının 3 ay sonundaki histolojik görüntüsü.....	137

Şekil 3.100. Şekil 3.99.'daki modifiye bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.	138
Şekil 3.101. Sadece YVS'de bekletilen bioglass grubuna ait defekt alanının 3 ay sonundaki histolojik görüntüsü.	138
Şekil 3.102. Şekil 3.101.'deki sadece YVS'de bekletilen bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.	139
Şekil 3.103. İşlem uygulanmayan bioglass grubuna ait defekt alanının 3 ay sonundaki histolojik görüntüsü.	139
Şekil 3.104. Şekil 3.103.'deki işlem uygulanmayan bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.	140

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A°	Angström
ALP	Alkalen fosfataz
ASTM	American Society for Testing and Materials
BMP	Kemik morfogenetik protein
BSP	Kemik siyaloprotein
Ca ₁₀ (P ₀₄) ₆ (OH) ₂	Hidroksiapatit
CaCl ₂ H ₂ O	Kalsiyum klorid monohidrat
CaO	Kalsiyum oksit
CollA1	Kolajen A1
Dlx5	Distalsiz homeobox 5 geni
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMP1	Dentin matriks protein 1
DMSO	Dimetil sulfoksit
ECM	Ekstrasellüler matriks
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spektroskopi
HCl	Hidroklorik asit
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HV	Vickers sertliği
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
ISO 10993	Medical tıbbi cihazların biyolojik değerlendirmesi

K_2HPO_4	Dipotasyum fosfat
KBD	Kritik boyutlu kemik defekti
KCl	Potasyum klorür
MB	Modifiye bioglass
M-CSF	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Magnezyum klorid hegzahidrat
mM	Milimolar
MPa	Megapaskal
Na_2SO_4	Sodyum sülfat
NaCl	Sodyum klorür
$NaHCO_3$	Sodyum bikarbonat
ng	Nanogram
OCN	Osteoklasin
OPG	Osteoprotegerin
Osx	Osterix
PBS	Fosfat tamponu
PCL	Polikaprolakton
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PGA	Poliglikolik asit
pI	İzoelektrik nokta
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asittir
PTFE	Politetrafloroetilen
RANK	Reseptör aktivatör nükleer faktör κ
RGD	Arjinin-glisin-aspartik asitten

RI	Replikasyon indeksi
RPM	Dakikadaki devir sayısı
Runtx2	Runt-ilişkili dönüştürücü faktör 2
TCP	Trikalsiyum fosfat
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
YVS	Yapay vücut sıvısı



1. GİRİŞ

Bilim ve teknoloji alanındaki hızlı ve yaygın ilerlemeler, hayatın birçok alanında olduğu gibi tıp alanında da önemli mesafeler kat edilmesine yol açmıştır. Ortalama insan ömrünün uzaması, yaşam kalitesinin sürdürülebilirliği konusunu taze tutarak, geçmişe kıyasla tıbbi tedavi yaklaşımlarına daha fazla sorumluluk yüklemektedir. Devamlı bir dinamizm taşıyan bilimsel bilgi, birçok alanda olduğu gibi tıp alanında da güncel kalmayı, gelişmeleri takip etmeyi zorunlu kılmıştır. Bu durum ise güncel tedavi yaklaşımlarının çeşitliliğini arttırarak tıp uygulamalarına yeni bakış açıları getirmiş ve bu alanı daha da ileriye taşıyarak tek başına tıp uygulaması olmaktan çıkarp disiplinler arası bir hale getirerek rejeneratif tıp yaklaşımını doğurmuştur. Her ne kadar ayrı ifadeler olarak söylene de doku mühendisliği ve rejeneratif tıp yaklaşımları aynı çatı altında birbirinin parçası veya tamamlayıcısı olarak değerlendirilen bir yaklaşımdır ve insanlığa olan hizmetini durmaksızın devam ettirerek her geçen gün yeni uygulamalarla yerini sağlamlaştırmaktadır. Doku mühendisliği uygulamalarına bakıldığında üç önemli ayağı olduğu görülmektedir. Bunlar; doğal dokuya uygun özellikte doğru doku iskelesi seçimi, uygun hücre seçimi ve ideal büyüme faktörlerinin kullanılmasıdır. Rejeneratif tıp uygulamaları için doku mühendisliği yaklaşımıyla ilgili verilen bu özellikler aynı anda kullanılabileceği gibi ayrı ayrı da ele alınabilir. Örneğin bir defekt modeli için sadece doku iskelesi kullanılabileceği gibi doku iskelesiyle birlikte doğal dokuya uygun hücre kaynağı da kullanılabilir.

“İnsan vücudu metalik ve sentetik polimerik materyalleri skar dokusu oluşturarak reddeder, çünkü canlı dokular bu gibi maddeleri içermezler. Kemik dokuya baktığımızda, yapısında hidroksiapatit olarak adlandırılan hidratlı bir kalsiyum bileşeni vardır. “Eğer bir malzeme in vivo olarak hidroksiapatit oluşturabiliyorsa, vücut tarafından reddedilmez” hipotezi üzerinden yola çıkılarak 1969-1971 yılları arasında keşfedilen bioglass (Hench, 2006), doku mühendisliği uygulamalarının özellikle sert doku mühendisliği alanında kullanımı olan bir biyomateriyaldir. Sinyal moleküllerini, çeşitli hücre hatlarını ve doku iskelelerini tek tek veya birlikte

kullanarak, hasara uğramış veya kaybedilen bir dokunun yerini alarak doğal dokuyu taklit edebilecek kabiliyette yeni bir doku elde etme amacı güden doku mühendisliği uygulamalarına sert doku mühendisliği açısından baktığımızda, kullanılan doku iskelelerinin bazı özellikleri taşıması beklenir (Chen, Thompson ve Boccaccini, 2006). Bu özellikleri; hücre taşıma kabiliyeti, iyi bir osteokondüktivite, kontrollü biyobozunurluk, uygun mekanik özellik, porözite ve por çapının 400-500 µm'den büyük olması, düzensiz şekillerde üretilebilirlik ve ticarileştirilebilme potansiyeli olarak sıralayabiliriz (Temenoff ve Mikos, 2000; Bruder ve Caplan, 2000; Jones ve Boccaccini, 2005; Freyman, Yannas ve Gibson, 2005). Bioglass'ın yukarıda sayılan özelliklerden hücre taşıma kabiliyetinin, osteokondüktivitesinin, biyouyumluluğunun ve biyobozunurluluğunun iyi olması, bioglass'ı sert doku mühendisliği uygulamalarında umut verici bir doku iskelesi haline getirmektedir (Laurencin, Lu ve Khan, 2002; Jones ve Hench, 2003; Boccaccini, 2003). Bunlarla birlikte kırılğan oluşu, düşük dayanım gücü ve zayıf osteoindüktivitesi gibi özellikleri bioglass'ın sert doku mühendisliği uygulamalarındaki kullanımını kısıtlamaktadır (Yao vd., 2014). Bu kısıtlayıcı durumlar bioglass'ın sert doku mühendisliği uygulamalarında başarıyla kullanılabilecek bir ürün haline gelebilmesi için bünyesinde geliştirilebilme potansiyeli taşıdığının bir göstergesidir. Bu durum ise bioglass'ın sert doku mühendisliğinde kullanımı açısından bazı zayıf yanlarının olduğu ve bu zayıf yanlarının iyileştirilmeye açık olduğu düşüncesini akla getirerek bu tez çalışmasının ana omurgasını oluşturmuştur. Bu tez çalışmasıyla sert doku mühendisliği uygulamalarında kullanım alanı olan bioglass'ın modifiye teknikle üretilerek biyouyumluluğunun ve performansının *in vitro* ve *in vivo* testlerle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

1.1. Kemik Doku

Kemik doku vücutta hareket, yük taşıma, yumuşak dokular için mekanik destek ve koruma, kalsiyum ve fosfat depolama ve kemik iliğini barındırma gibi vücut için çok önemli fonksiyonları olan oldukça dinamik ve vaskülarize bir dokudur (Robling, Castillo ve Turner, 2006). Embriyolojik dönemde mezenkimden köken alan kemik doku mineralize bir destek dokusudur (Buckwalter, Glimcher, Cooper ve Recker, 1996). Kemik dokuda osteoprogenitör hücre, osteoblast, osteoklast ve osteosit isimlerinde dört çeşit hücre vardır (Downey ve Siegel, 2006). İnert görünümüne

rağmen kemik doku oldukça dinamik bir dokudur. Osteoklastlar tarafından bir taraftan yıkılırken, osteoblastlar tarafından yenilenen bir dokudur. Osteositler ise bu yeniden şekillenme sürecinin düzenleyicileridirler (Teitelbaum, 2007; Clarke, 2008; Karsenty, Kronenberg ve Settembre, 2009; Bonewald, 2011). Kemikte meydana gelen rezorpsiyon ve yeniden şekillenme olayları büyüme ve gelişme sırasında yeni kemik oluşumu, iskeletin mekanik adaptasyonu, kırık iyileşmesi ve vücudun ihtiyaç duyduğu kalsiyum ve fosfat gereksinimlerine hızla yanıt verme gibi süreçlere olanak sağlar (Grabowski, 2009). Hücresel düzeyde osteoblastların ve osteoklastların rol aldığı yapım ve yıkım süreçlerine moleküler düzeyde hormonlar, sitokinler, kemokinler ve biyomekanik stimülasyon gibi bir dizi sistemik ve lokal faktörler etki eder (Raisz ve Rodan, 1998; Phan, Xu ve Zheng, 2004; Grabowski, 2009; Crockett, Mellis, Scott ve Helfrich, 2011). Bunların yanı sıra kemikler, büyümeleri ve gelişmeleri için mineral maddelerin ve besinlerin absorpsiyon, reabsorpsiyon ve ekskresyonunun yapıldığı böbrek ve bağırsak gibi organlara ve kemik büyümesi, mineral madde homeostazı için gerekli hormonal faktörleri üreten hipotalamus, hipofiz, tiroid, paratiroid ve eşey bezleri ile karaciğer ve deri gibi organlara oldukça bağımlıdır (Grabowski, 2009).

Kemikler lokasyonuna, şekline, sertliğine ve boyuna göre sınıflandırılabilir. Ancak bu çoklu sınıflandırma sistemi kafa karışıklığına yol açabilir. Bu yüzden literatürde en yaygın kortikal (kompakt) ve trabeküler (spongiyöz/kanselloz) kemik olarak sınıflandırılmaktadır (Buckwalter, Glimcher, Cooper ve Recker, 1995; Clarke, 2008; Safadi vd., 2009). Hücresel ve moleküler bileşimi bakımından çok benzer olan kortikal ve trabeküler kemikler, fonksiyon ve mekanik özellikleri bakımından birbirinden farklıdır (Grabowski, 2009). Bu farklılık ise dansite veya gözeneklilik, üç boyutlu yapı ve metabolik aktivite gibi üç önemli özellikten kaynaklanmaktadır (Buckwalter vd., 1995; Clarke, 2008; Safadi vd., 2009). Kortikal kemik uzun kemiklerin diyafizinde bulunurken (Şekil 1.1.) trabeküler kemik ise uzun kemiklerin uç kısımlarında (metafiz), vertebralarda ve eklem yüzeylerinin yakınında (epifiz) bulunur (Buckwalter vd., 1996; Grabowski, 2009). Genel olarak olgun bir yetişkin iskeletinin %80'i kortikal kemikten oluşur. %5-10 poroziteye sahip olan kortikal kemik, burulma ve bükülmeye karşı maksimum direnç sağlar ve kemiğe basınca karşı dayanma gücü verir. Trabeküler kemik ise yetişkin insan iskeletinin %20'sini oluşturur ve sahip olduğu %50-90 poroziteyle birim hacim başına daha yüksek yüzey

alanına sahiptir. Trabeküler kemik yüksek metabolik aktivite ve yeniden şekillenme (remodeling) oranına sahiptir. Trabeküler kemikte birincil kemik hücreleri yüzeye yakın olduğundan dolaşımdaki sitokinlere ve büyüme faktörlerine daha yakındır ve bu durumun etkisiyle metabolik uyarılara daha hızlı yanıt verir. Sayılan bu özellikleriyle trabeküler veya spongiyöz kemiğin görevi yüklerin absorbe edilmesi ve deformasyona izin vermektir (Eriksen, Axelrod ve Melsen,1994; Buckwalter vd., 1995; Clarke, 2008; Safadi vd., 2009).



Şekil 1.1. Uzun kemiğin yapısı.

‘a’ uzun kemiğin sagittal kesit yüzeyi; ‘b’ uzun kemiğin metafiz ve epifiz bölgesindeki trabeküler kemiğin makroskopik görüntüsü (yıldız); ‘c’ uzun kemiğin diyafiz bölgesindeki kompakt kemiğin makroskopik görüntüsü (ok).

1.2. Kemiğin Histolojisi

Histolojik olarak kemik primer (örgümsü, immatür, olgunlaşmamış) ve sekonder (lamellar, matür, olgun) olmak üzere iki tipten oluşur (Buckwalter vd., 1995). Primer kemik embriyonik iskeletin yapısını oluşturur ve iskelet gelişimi sürecinde rezorbe olarak olgun kemik haline gelir. Yetişkin iskeletinde ise kırık iyileşmesinin erken kallus döneminde, büyüme plaklarında, ligament ve tendoların kemiğe giriş bölgelerinde ve kafatası yassı kemiklerinin eklem yerlerinde (suture margin) primer kemik dokusu görülür (Buckwalter vd., 1995). Primer kemikte kollajen fibrilleri ve

mineralizasyon dağınık ve düzensiz karakterizasyon gösterir. Bu durum ise primer kemiği esnek ancak nispeten zayıf yapar (Buck ve Dumanian, 2012).

Sekonder kemik iyi organize olmuş, kemik matriksinin ve osteositlerin uniform dağılım gösterdiği sıkıca paketlenmiş kollajen fibril tabakalarıyla karakterize kemik türüdür. İskelet gelişimi sırasında ve kırık iyileşmesinin geç aşamalarında primer kemiğin yerini alır. Organizasyonu nedeniyle sekonder kemik sert ve güçlü bir yapı gösterir (Buckwalter vd., 1995; Matos, Araújo ve Paixão, 2008).

Sekonder veya lamellar kemik sert ve güçlü yapısını oldukça iyi organize olmuş konsantrik tabakalarının oryantasyonundan alır. Lameller yoğun paketlenmiş kollajen fibrillerinden oluşur. Komşu lamellerdeki kollajen fibriller farklı yönlerde ilerler. Bu fibriller lamel içinde birbiriyle bağlantı kurarken aynı zamanda lameller arasında da bağlantı kurarlar. Lamellerin ve fibrillerin kendine has oryantasyonu ve dizilimi kemiğin gücünü artırır (Buckwalter vd., 1995; Matos vd., 2008; Jepsen, 2009).

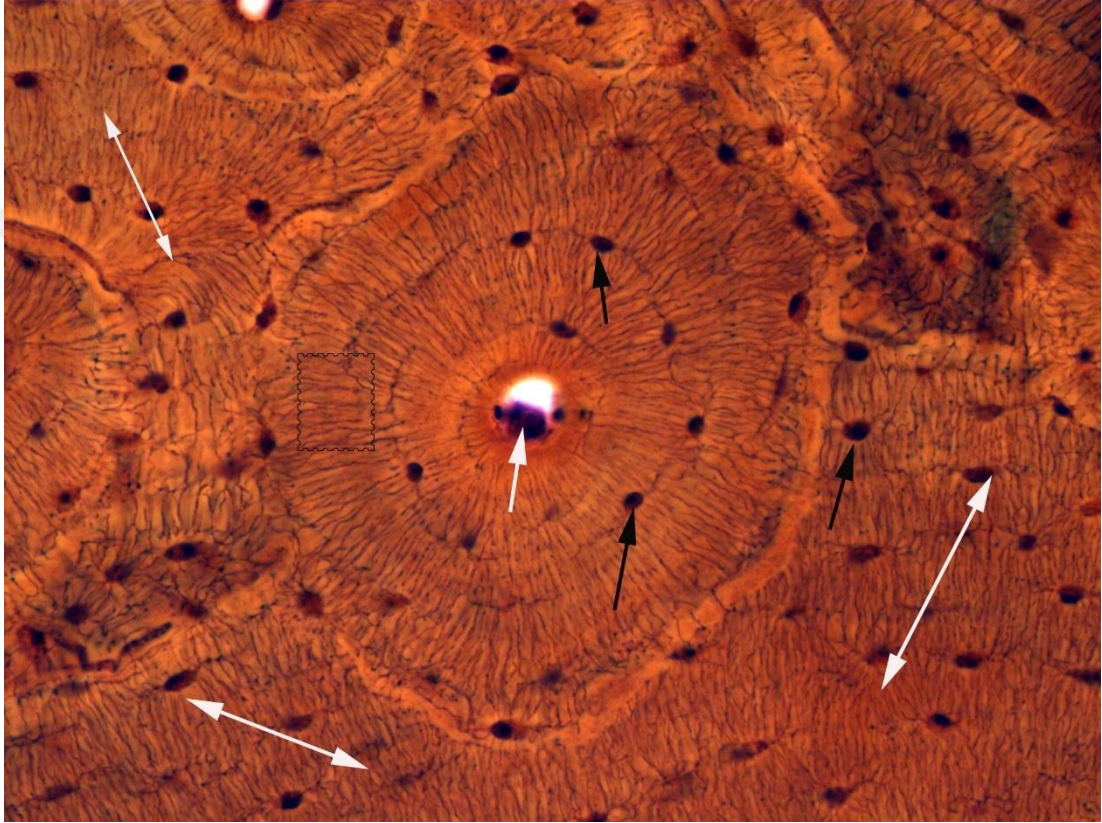
Primer ve sekonder kemik yapılarına, bileşimine, organizasyonuna ve mekanik özelliklerine göre farklılık gösterir. Primer kemik hızlı bir birikim ve dönüşüm oranına sahipken, sekonder kemik daha az aktiftir. Primer kemikte kollajen fibrilleri (tip-1 kollajen) düzensiz bir yerleşim gösterirken, sekonder kemikte kollajen fibrilleri oldukça düzenli bir organizasyon gösterir. Primer kemikte osteositlerin sayısı sekonder kemiğe göre çok daha fazladır ve büyüklük, oryantasyon ve dağılım açısından tek düzelik görülmezken; sekonder kemikte osteositler nispeten bir örnektir ve muntazam bir yerleşim gösterirler. Primer kemikte mineralizasyon düzensiz bir yapı gösterir ve mineral birikintileri boyut ve kollajen fibrilleriyle ilişkileri bakımından bir örnek değildir. Bu durum ise radyografide düzensiz görünümüne yol açar. Lamellar (sekonder) kemiğe baktığımızda boyutları 4-12 μm arasında değişen birbirine paralel seyreden kollajen fibrilleri ve eşit dağılım gösteren mineral birikimleri gözlenmektedir (Martin ve Burr, 1989; Currey, 2012). Sekonder kemiğin kendine özgü bu organizasyonu sayesinde radyografide homojen bir görünüm gözlenir (Buckwalter vd., 1995). Düzensiz mineralizasyon ve fibril organizasyonu, daha fazla hücre ve su içermesi primer kemiğe esneklik kazandırır ancak sekonder kemiğe göre daha zayıf ve dayanıksız olmasına yol açar. Lamellar veya sekonder kemik ise primer kemiğe göre daha az esnek ve oldukça dayanıklıdır. Kırık

iyileşmesinin erken iyileşme fazında oluşan kallus primer kemik karakterindedir ve yukarıda sayılan mekanik özelliklerden ötürü kırık iyileşmesinde şekillenen kallusun iyileşmenin son aşamasında lamellar kemiğe dönüşmesi elzemdir (Buckwalter, 1991; Bonfield, 2018).

Lamellar kemiğin dört genel formu vardır: Bunlar, spongiyöz kemiğin trabeküler lamelleri, kortikal kemikteki iç ve dış sirkümferensiyal lameller, kortikal kemikteki interstisyel lameller ve osteon olarak isimlendirilir. Osteon kortikal kemiğin temel yapısal birimidir ve diyafizin büyük kısmını oluşturan kemiğin uzun eksenine paralel seyreden silindirlere oluşur. Her bir osteon ya da “Havers Sistemi” merkezde Havers kanalı ve onu çevreleyen konsantrik spesiyal lamellerden oluşur (Şekil 1.2.). İçerisi endosteal hücreler tarafından kaplanmış, kan damarları, lenf damarları ve sinirleri içeren Havers kanalı kemiğin uzunlamasına eksenine paralel olarak seyreder. Spesiyal lamellerin üzerinde lakun denilen kompartmanlarda osteositler bulunur ve osteositler lameller üzerinde bir örnek ve muazzam bir yerleşim gösterirler (Şekil 1.2.). Osteositlerin sitoplazmik uzantıları kanalikül (Şekil 1.2.) denilen ince kanalcıklar aracılığıyla bağlantı halindedir. Kanaliküller radyer bir seyir göstererek osteositleri Havers kanalına bağlar. Bu sayede osteositlerin besin maddelerini difüzyonuna olanak sağlar (Buckwalter vd., 1995; Matos vd., 2008; Jepsen, 2009; Safadi vd., 2009). Osteonun merkezinde bulunan Havers kanalları “Volkmann kanalı” olarak bilinen kemiğin uzunlamasına eksenine oblik veya dik olarak seyreden kanallar aracılığıyla komşu osteonlardaki Havers kanallarıyla, endosteumla, periosteumla ve kemik iliğiyle bağlantı kurarlar. Kompleks iç kanal ağı, lakunlar ve kanaliküller olgun lamellar kortikal kemiğin en dikkat çekici yapısal özelliklerindendir (Cooper, Milgram ve Robinson, 1966; Stevens, 2008). Kompakt kemik içindeki bu kanallar ve boşluklar ağı iyonların ve sıvıların mineralize matris içinde serbestçe akabildiği ekstrasvasküler bir alan oluşturur (Pienkowski ve Pollack, 1983; Mak, 1990; Kowalchuk ve Pollack, 1993).

Lamellar kemiğin osteon haricinde trabeküler, intersitisyel ve sirkümferensiyal formları vardır. Trabeküler kemikte görülen trabeküler lameller yarım daire şeklinde düzenlenmiş, üç boyutlu olarak trabeküler kemik ağını oluşturan yapılardır. Trabeküler yapı süngerimsi kemiğe muazzam yüzey alanı kazandırır. Kompakt kemikte görülen merkezi Havers kanalı trabeküler lamellerde görülmez, ancak onun yerine sinüzoidler vardır. Hücresel açıdan da kompakt kemikteki lamellerden daha

zengin olan trabeküler lamellerde, vaskülarizasyonun iyi olması ve kemik iliği ile kemik lamelleri arasındaki temasa izin veren sinuzoidlerin varlığı trabeküler kemiği kompakt kemikten metabolik olarak daha aktif yapar (Jepsen, 2009). İntersitisyel lameller (Şekil 1.2.) Havers sistemlerinin ve sirkümferensiyal lamellerin aralarını dolduran lamellerdir ve kemik homeostazı sürecinde şekillenen eski osteonların kalıntılarıdır. Sirkümferensiyal lameller ise kompakt kemiğin iç ve dış yüzeyinde bulunan lamellerdir (Erdost, 2011; Eşrefoğlu, 2016).



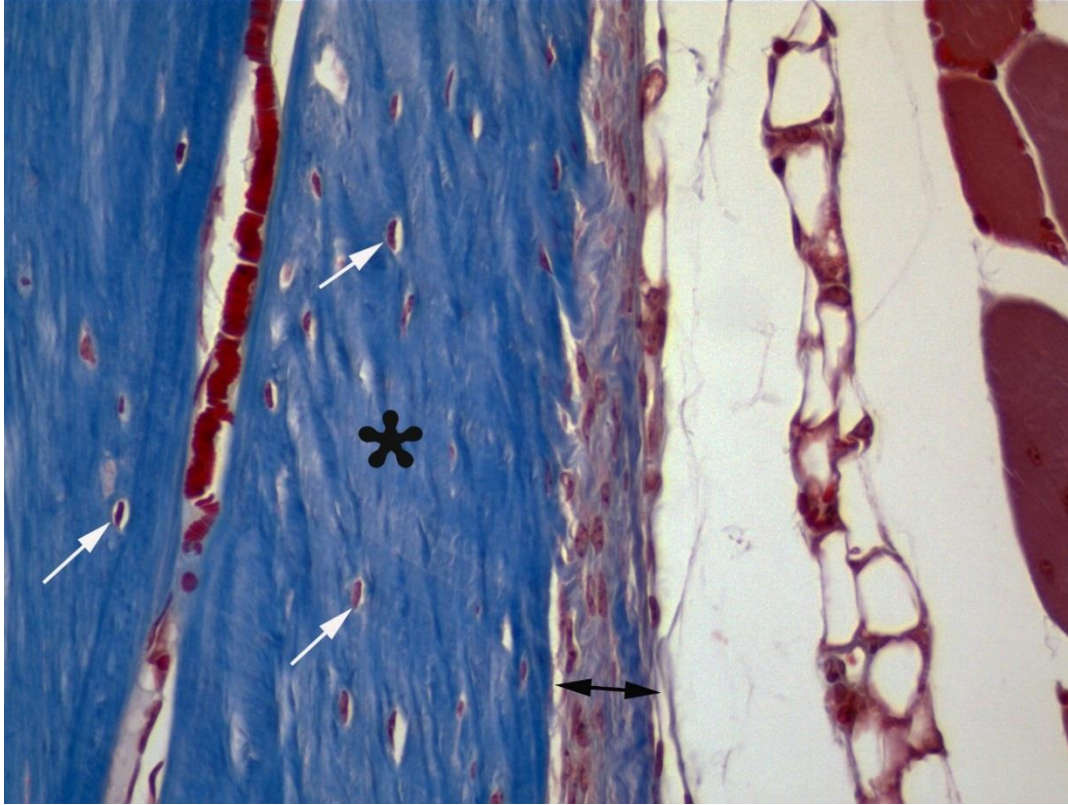
Şekil 1.2. Kompakt kemik yapısında osteon'a ait histolojik fotoğraf.

Osteon'un merkezinde bulunan Havers kanalı (beyaz ok), lakunlar içerisindeki osteositler (siyah oklar), ara (intersitisyel) lameller (iki uçlu oklar) ve kanaliküller (dikdörtgen içindeki kılcal benzeri yapılar). Thionin boyama, x40 büyütme.

1.3. Kemik Zarları

Periosteum kemiğin dış yüzeyini saran zardır (Şekil 1.3.). Periosteum, Sharpey ipliği denilen kalın kollajen fibriller aracılığıyla dış sirkümferensiyal ve interstisyel lamellere sıkıca bağlanır (Kuroiwa, Chihara ve Higashi, 1994). Periosteum kemikteki kan dolaşımına katkı sağlar ayrıca kemik korteksinin dış üçte birlik

kısının baskın vaskülarizasyon kaynağıdır. Bunlara ilaveten bazı tendon ve ligamentler için bağlanma yeri olarak görev yapar (Clarke, 2008). Periostun dış katmanı hücresel açıdan fakir, fakat kollajen bakımından zengin sıkı bağ doku karakterindeyken; iç katman hücresel açıdan zengin, gevşek bağ doku karakterindedir ve vasküler bir pleksus içerir (Clarke, 2008). Periosteal hücreler lokal veya sistemik uyarıların etkisiyle kemik rezorpsiyonu veya yeni kemik oluşumu gibi görevleri üstlenerek kemik metabolizmasında görev yaparlar. Ayrıca akut kırık iyileşmesi esnasında ilk stabilitede ve kallus oluşumunda rol alırlar. Periosteal hücreler kemik matriksinde bulunan Volkmann kanalları aracılığıyla endosteum ve kemik iliğiyle doğrudan irtibat halindedir (Buckwalter vd., 1995). Periosttaki hücresel ve fibröz tabakalarda yaşa bağlı olarak değişimler gözlenir ve bu durum periostun osteojenik kapasitesini etkiler. Örneğin, gençlerde periostun hücresel tabakası daha kalınken yaş ilerledikçe hücresel tabaka oldukça incilir ve yaşlılıkta osteojenik kapasitenin azaldığı söylenebilir (Buckwalter vd., 1995). Yaşla birlikte periostun hücresel tabakasında incelmeler ve hücre sayısında azalma görölse de mevcut periosteal hücreler yaşam boyunca aktivitesini devam ettirir (Buckwalter vd., 1995; Clarke, 2008).



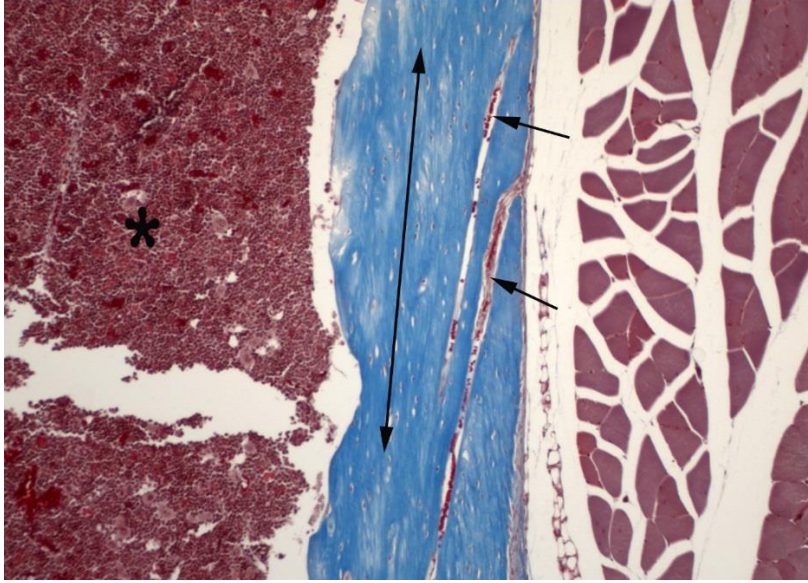
Şekil 1.3. Kompakt kemikte periost'un histolojik görüntüsü.

Periost (iki uçlu siyah ok). Periost'un kemik lamellerine yakın olan iç kısmının hücresel olarak daha zengin olduğu görülmektedir. Lakun içerisindeki osteositler (beyaz oklar), kompakt kemik lamelleri (siyah asteriks). Masson'un üçlü boyası, x40.

Endosteum kemiğin iç yüzeylerini, Havers ve Volkmann kanallarını kaplayan zardır. Endosteum hücresel olarak periosttan daha zengindir ve damar ağına sahiptir. Endosteumda bulunan osteoprojenitör hücreler kemik iliği ile doğrudan irtibat halindedir (Clarke, 2008). Periosteum ve endosteum kemik büyümesi ve onarımı için gereklidir. Her ikisi de kemik doku için gerekli osteoprojenitör hücre ve osteoblast kaynağıdır (Sağlam, Özer ve Aştı, 2008; Erdost, 2011).

1.4. Kemiğin Vaskülarizasyonu

Kemiğin vaskülarizasyonu kompleks bir intraosseöz kanal ve sinuzoidlerden oluşmaktadır. Kalp debisinin %10-20'lik kısmı iskelet sistemine iletilir, fakat kemiklerdeki kan akışı kemiğin bulunduğu bölgeye göre farklılık göstermektedir (Clarke, 2008; Safadi, 2009; Yang ve Gellman, 2011). Tubuler kemiklerde ikili besleme vardır. Baskın besleme genellikle diyafiz arterleri tarafından sağlanır. Diyafiz arterlerine (Şekil 1.4.) ilaveten bitişik eklemi besleyen damarlardan, metafiz ve epifizden çıkarak diyafiz damarlarıyla anastomoz yapan küçük arteriyoller de vardır (Buckwalter vd., 1995; Safadi, 2009; Yang ve Gellman, 2011). Tubuler kemiklerin bir diğer önemli kan kaynağı periosteal vasküler pleksustur. Periosteal pleksustaki damarlar korteksin dış 1/3'lük kısmını vaskülarize eder. Periosteal damarlar Volkmann kanalları aracılığıyla diyafizdeki kapillar damarlarla anastomoz yaparlar. Venöz drenaj ise besleyici arterlere ve pleksuslara eşlik ederek kemiği terkeder (Safadi, 2009; Yang ve Gellman, 2011). Tubuler kemiklerde olduğu gibi yassı kemiklerde de ikili bir kan dolaşımı vardır. Hem besleyici arterlerden vaskülarize edilirken hem de periosteal vasküler pleksustan vaskülarize edilir. Venöz drenaj ise arterlere ve pleksuslara eşlik ederek seyreder (Cutting, McCarthy ve Berenstein, 1984).



Şekil 1.4. Kompakt kemiğin diyafiz bölgesine ait histolojik fotoğraf.

Kan damarları (siyah oklar), lamellar kemik (iki uçlu siyah ok) ve kemik iliği (asteriks). Masson'un üçlü boyaması, x10.

1.5. Kemiğin Bileşimi

1.5.1. Kemik Hücreleri

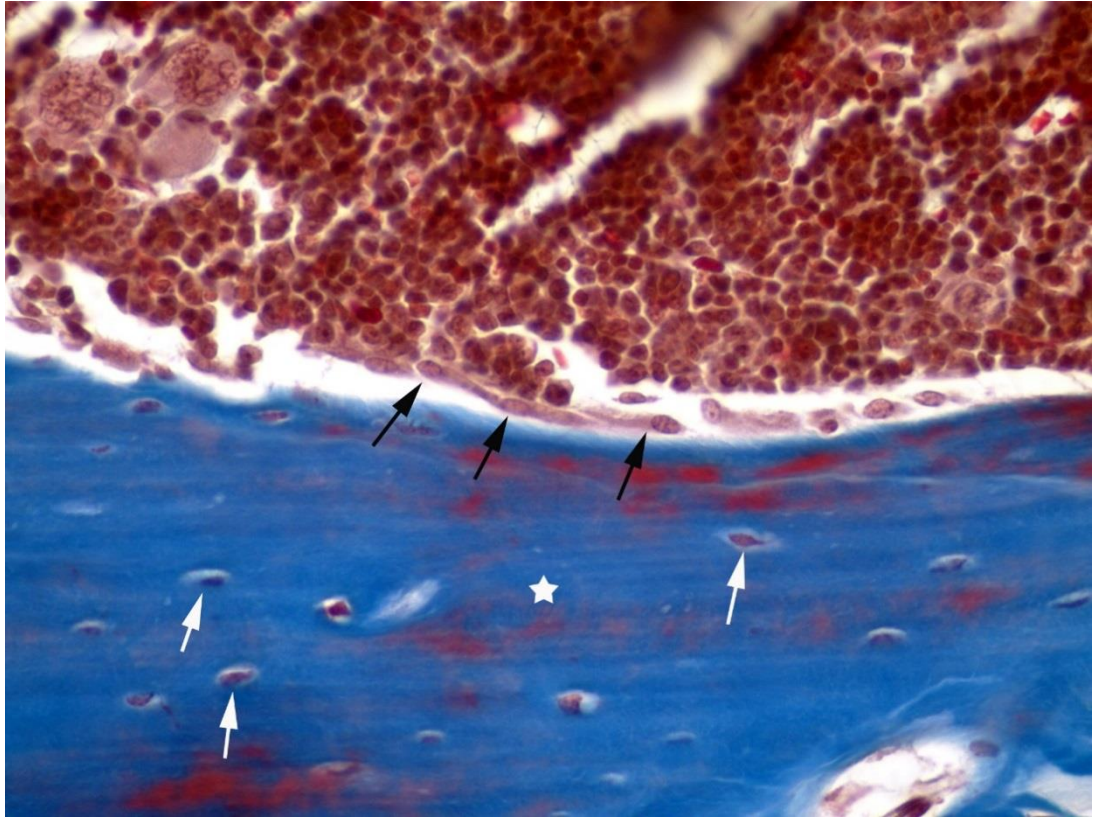
Kemik dokunun total hacminin yaklaşık %10'u hücrelerden oluşur. Kemikte 4 çeşit hücre bulunur. Hücre hattı olarak değerlendirildiğinde mezenkimal kök hücre hattından gelen osteoprogenitör hücreler ve osteoprogenitör hücrelerden farklılaşan osteoblast ve osteositler ile hematopoietik orjinli osteoklastlar olarak sınıflandırılır (Buckwalter vd., 1995; Clarke, 2008).

1.5.1.1. Osteoprogenitör Hücreler

Osteoprogenitör hücreler mezenkimal kök hücrelerden köken alan ve osteoblast ve osteosit gibi kemik yapan hücrelere farklılaşabilen kemiğin kök hücreleridir. Kemik kanallarında, endosteumda, periosteumda ve kemik iliğinde bulunur. Ayrıca vasküler perisitler de preosteoblast kaynağıdır (Doherty vd., 1998). Şekil olarak fibroblastlara benzer. Kemik büyümesi ve kırık iyileşmesi gibi durumlarda birtakım sinyallerin (büyüme faktörleri gibi) etkisiyle migrasyonu, proliferasyonu ve farklılaşması sitümüle edilir. Herhangi bir uyarım ya da sinyal olmadığı durumlarda farklılaşmamış halde kalırlar (Barrere, Van Blitterswijk ve Groot, 2006; Buck ve Dumanian, 2012; Eşrefoğlu, 2016).

1.5.1.2.Osteoblastlar

Kemikteki toplam hücre hacminin yaklaşık %4-6'sını oluşturan ve “kemik yapan hücreler” olarak bilinen osteoblastlar, kemik yüzeyinde sıkıca paketlenmiş olarak bulunan kübik şekilli hücrelerdir. Kemiğin organik matriksini sentezleyen bu hücreler granüllü endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtı yönünden zengindir (Şekil 1.5.) (Marks Jr ve Popoff, 1988; Damoulis ve Hauschka, 1997; Capulli, Paone ve Rucci, 2014).



Şekil 1.5. Osteoblast ve osteositlere ait histolojik fotoğraf.

Lamellar kemik yüzeyinde görülen osteoblastlar (siyah oklar), mineralize kemik matriksine gömülü olarak bulunan osteositler (beyaz oklar) ve lamellar kemik (yıldız). Masson'un üçlü boyaması, x40 büyütme.

Osteoblastlar mezenkimal kökenli osteoprogenitör hücrelerden köken alır. Osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşması spesifik genlerin ekspresyonuna bağlıdır. Osteoblast farklılaşmasının en önemli araçları Kemik Morfogenetik Proteinleri (BMP), Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF) ailesinin üyeleri ve Wnt sinyal yolağıdır (Grigoriadis, Heersche ve Aubin, 1988; Yang ve Gellman, 2011). Osteoblast farklılaşmasında Runt-ilişkili dönüştürücü faktör 2

(Runx2), distalsiz homeobox 5 geni (Dlx5) ve osterix (Osx) genlerinin ekspresyonu oldukça önemlidir. Bunların içerisinde Runx2 geni osteoblast farklılaşmasının ana genidir ve Runx2 geni susturulmuş çıplak farelerde osteoblastların olmayışı bu gerçeği destekler niteliktedir. Ayrıca Runx2 geni ekspresyonunun alkalen fosfataz (ALP) (Komori vd.), 1997, kollagenA1 (CollA1), kemik siyaloprotein (BSP) ve osteokalsin (OCN) gibi osteoblastla ilişkili genlerin ekspresyonunu yukarı regüle ettiği bilinmektedir (Ducy, Zhang, Geoffroy, Ridall ve Karsenty, 1997; Fakhry, Hamade, Badran, Buchet ve Magne, 2013). Ayrıca fibroblast büyüme faktörü (FGF), bazı mikroRNA'lar (miRNA) ve Konneksin 43 gibi faktörlerin de osteoblast farklılaşmasına etki ettiği söylenebilir (Kapinas, Kessler, Ricks, Gronowicz ve Delany, 2010; Buo ve Stains, 2014). Örneğin, FGF-2 geni susturulmuş farelerde kemik kütlesinde azalma görülmesi, miRNA'ların birçok hücre tipinde gen ekspresyonunu regüle ettiği gibi osteoblast farklılaşmasını da sitümüle veya inhibe etmesi (Tomé vd., 2011; Hassan vd. 2012) ve kemikteki ana konneksin olan konneksin 43'ü kodlayan gendeki bir mutasyonun osteoblast farklılaşmasını bozması osteoblast farklılaşma sürecindeki etkilerini göstermektedir (Flenniken vd., 2005).

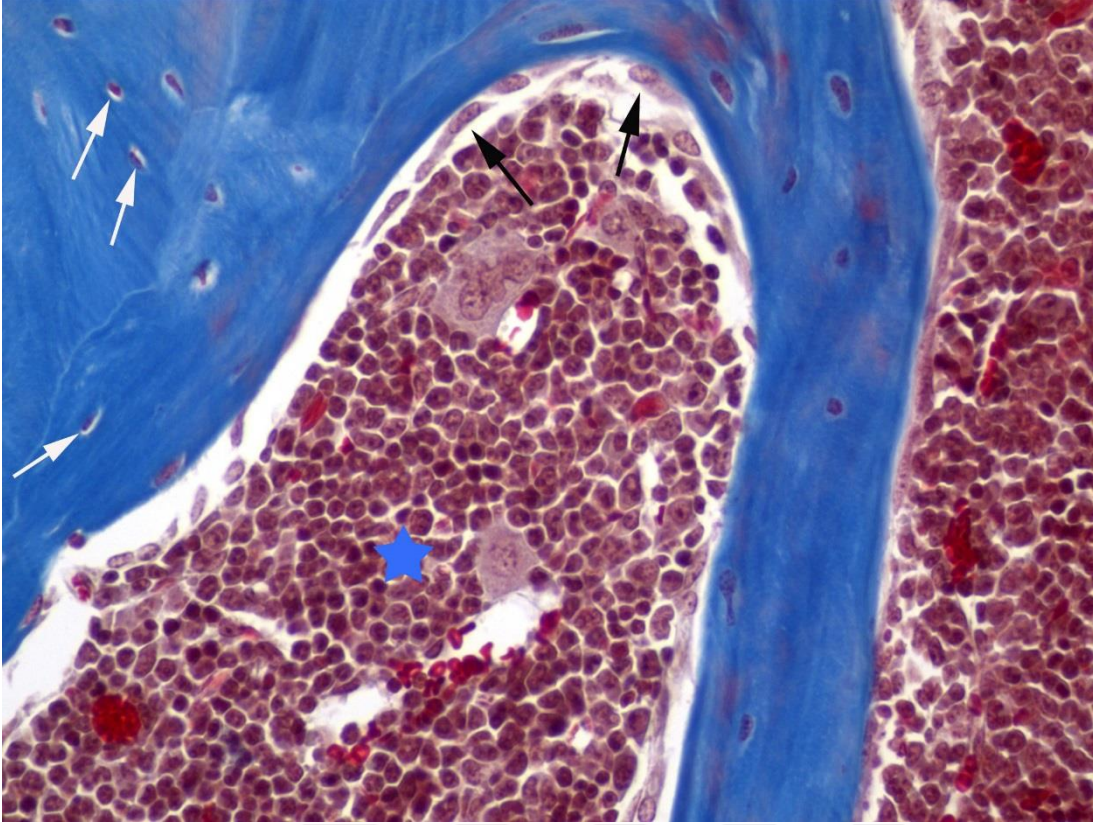
Osteoblastların farklılaşma sürecindeki bazı aşamalar şunlardır: Osteoprogenitör hücreler Runx2 ve CollA1'in ekspresyonuyla bir proliferasyon fazına girer. Bu fazdaki hücrelere preosteoblastlar denir ve preosteoblastlarda ALP aktivitesi artar. Farklılaşmanın ilerleyen aşamalarında Osx, OCN, BSP 1-2 ve kollajen tip 1 gibi kemiğin ekstrasellüler matriks proteinlerinde bir artış gözlenir. Böylelikle preosteoblastlar morfolojik değişimlerini de tamamlayarak büyük ve küboidal şekilli osteoblastlara farklılaşırlar (Ducy vd., 1997; Nakahsima vd., 2002; Hu vd. 2005; Florencio-Silva, Sasso, Sasso-Cerri, Simões ve Cerri, 2015).

1.5.1.3.Osteositler

Osteositler kemikteki toplam hücre sayısının yaklaşık %90-95'ini oluştururlar. Aynı zamanda kemikte bulunan hücrelerden yaşam süresi en uzun olan ve en bol olarak bulunanıdır (Franz-Odenaal, Hall ve Witten, 2006). Osteoblast ve osteoklastların kemik oluşumu ve rezorbsiyonundaki görevleri tanımlanırken osteositlerin kemik matriksi içerisinde pasif hücreler olduğu düşüncesi hâkim olduğundan osteositlerle ilgili olarak morfolojik ve kemikteki konumları itibarıyla tanımlamalar yapılmaktaydı (Rocheft, Pallu ve Benhamou, 2010). Bu durumun başlıca sebebi

osteositlerin izolasyonundaki zorluklara bağılı olarak işlevlerinin yanlış yorumlanmasıydı. Ancak yeni hayvan modellerinin kullanılmaya başlanması, kemik hücrelerinin izolasyonunun ve kültür tekniklerinin gelişmesi ve osteosit fenotipini devam ettirebilen hücre hatlarının oluşturulması gibi teknolojik ilerlemeler osteosit fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (Bonewald, 2011).

Osteositler mineralize kemik matriksi içinde lakun adı verilen boşluklarda yaşarlar (Şekil 1.6.). Kemik matriksi içerisine gömülü olarak bulunan osteositlerin kemik tiplerine göre morfolojisi değerlendirildiğinde; trabeküler kemikte daha yuvarlak bir morfoloji görülürken, kompakt kemikte ise daha yassı bir morfoloji görülmektedir. Osteositler komşu oldukları diğer osteositlerle sitoplazmik uzantıları aracılığıyla iletişim kurarlar. Osteositlerin sitoplazmik uzantıları ile komşu hücrelerle iletişimi ise mineralize kemik matriksi içerisinde kanalikül adı verilen kanalcıklar sayesinde olur. Lakunlar ve her bir lakundan çıkan yaklaşık 50 adet kanalikül birlikte lakuno-kanaliküler sistemi oluşturur (Manolagas, 2006). Lakuno-kanaliküler sistem sinyal moleküllerinin, oksijen ve besin maddelerinin osteositlere ulaşmasını sağlar (Civitelli, Stains, Shin ve Jørgensen, 2008; Dallas, Prideaux ve Bonewald, 2013). Ayrıca kemiğin günlük mekanik kuvvetlere adaptasyonuna yardımcı olur. Çünkü osteositler lakuno-kanaliküler sistem aracılığıyla birbirleriyle irtibat halindedir ve mekanik basınçları ve yükleri algılayarak mekanosensör olarak hareket ederler (Rochefort, 2010). Bu özellikleriyle osteositler, osteoblast ve osteoklast aktivitelerinin düzenlenmesi yoluyla kemik homeostazına katkı sağlar (Bonewald, 2007; Dallas vd., 2013). Osteositler osteoblastların farklılaşmasıyla oluşurlar. Osteoblastların osteositlere farklılaşmasında morfolojik ve ultrastrüktürel bazı değişimler görülür. Bu değişimler osteoblast boyutunun azalması, çekirdeğin sitoplazmaya oranının artması, granüllü endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtı sayılarında azalma olarak sıralanabilir. Bu durum protein sentezi ve sekresyonda azalma anlamı taşır. Mineralize kemik matriksi içerisine gömülü olarak bulunan osteosit farklılaşması tamamlandığında osteoblasta özgü genlerin (OCN, BSP1, kollajen tip I ve ALP) ekspresyonunda azalma varken, osteosit belirteçlerinin (dentin matriks protein 1-DMP1 ve sklerostin) ekspresyonunda oldukça artma gözlenir (Franz-Odenaal, 2006; Ubaidus, 2009; Bonewald, 2011; Schaffler, Cheung, Majeska ve Kennedy, 2014).



Şekil 1.6. Osteosit ve osteoblastlara ait histolojik fotoğraf.

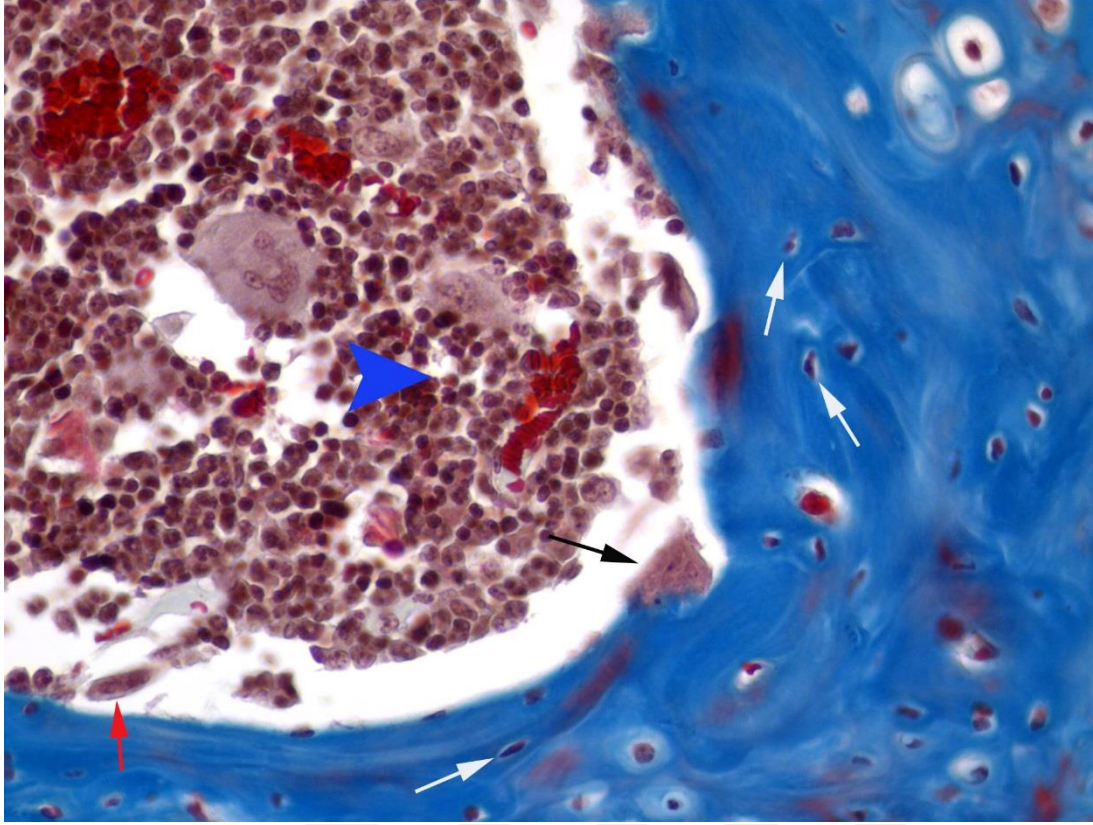
Lamellar kemik yüzeyinde görülen osteoblastlar (siyah oklar), mineralize kemik matriksine gömülü olarak bulunan osteositler (beyaz oklar) ve kemik iliği (mavi yıldız). Masson'un üçlü boyaması, x40 büyütme.

1.5.1.4.Osteoklastlar

Osteoklastlar kemiğin rezorbsiyonundan sorumlu olan, terminal farklılaşmasını tamamlamış ve hematopoietik kök hücrelerin mononükleer hücrelerinden köken alan çok çekirdekli büyük hücrelerdir. Osteoklastlar çeşitli faktörlerin etkisi altında mononükleer hücrelerden farklılaşır. Osteoklastogenezis için ilk olarak osteoblastlardan makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) sentezlenir (Yoshida vd., 1990; Yavropoulou ve Yovos, 2008). M-CSF senteziyle birlikte osteoklast prekürsörlerinden reseptör aktivatör nükleer faktör κ -B'nin (RANK) ekspresyonu uyarılır (Sodek ve Mckee, 2000). Osteoklastogeneziste osteoblastlardan sentezlenen RANK ligand (RANKL) anahtar rol oynar. Osteoklast prekürsörlerindeki RANK reseptörlerine RANKL bağlanmasıyla osteoklast formasyonu indüklenir, bu ise osteoklast prekürsörlerinin füzyonunun uyarılması anlamına gelmektedir. Osteoklastogeneziste rol alan bir diğer faktör de osteoprotegerin (OPG)'dir. OPG

osteoblastlar, stromal hücreler, gingival ve periodontal fibroblastlarla birlikte çok çeşitli hücrelerden salgılanır ve etkisini RANKL'ye bağlanarak gösterir. OPG'nin RANKL'ye bağlanmasıyla birlikte osteoklastogenez inhibe edilir. Bu nedenle RANK, RANKL ve OPG osteoklastogenez için anahtar rolleri olan faktörler olarak bilinir (Sodek ve Mckee, 2000; Phan ve Zheng, 2004; Boyce ve Xing, 2008; Longhini, Aparecida de Oliveira, Sasso-Cerri ve Cerri, 2014).

Osteoklastlar, Howship lakunaları denilen bölgelerde mineralize kemiği rezorbe ederler (Şekil 1.7.). Osteoklastların aktive olmaları için polarize olmayan olgun osteoklastların kemik matriksine bağlanması gerekir. Osteoklastlar kemik matriksine bağlandığında polarize olur ve osteoklastlarda podozomlar ve farklı membran alanları oluşur. Podozomlar bir aktin halkası ve onun etrafına bağlı olarak bulunan integrinler ve hücre iskeleti proteinlerinden oluşur. Membran alanları ise sızdırmazlık bölgesi (sealing zone), kıvrımlı sınır (ruffled border) ve fonksiyonel salgı alanlarından oluşur (Luxenburg vd., 2007; Mulari, Vääräniemi ve Väänänen, 2003). Osteoklastlar kemik matriksi ile temas ettiğinde, osteoklastın fibriller aktin hücre iskeleti aktin halkası şeklinde organize olarak rezorbsiyon bölgesini kemik yüzeyinden izole eden sızdırmazlık bölgesini oluşturur. Kemik rezorbsiyonunun devamlılığı için kıvrımlı sınırın ve sızdırmazlık bölgesinin bozulmaması gerekir (Teitelbaum, Abu-Amer ve Ross, 1995), eğer bozulursa kemik rezorbsiyonu bloke olur (Vaananen, Zhao, Mulari ve Halleen, 2000). Kıvrımlı kenarda bulunan H^+ - ATPaz pompası aracılığıyla pompalanan H^+ iyonu Cl^- ile birleşerek kemiği demineralize eden hidroklorik asiti (HCl) oluşturur. Kemik matriksini degrade eden katepsinler, matriks metalloproteinazlar ve tartarat dirençli asit fosfataz (TRAP) gibi enzimler de Howship lakunaları denilen bölgeye taşınır ve kemik rezorpsiyonu gerçekleştirilir (Nesbitt ve Horton, 1997; Yamaza vd., 1998). Kemik rezorbsiyonundan sonra degrade olan kollajen ve açığa çıkan kalsiyum ve fosfat endositozla osteoklastlar tarafından hücre içine alınır, daha sonra da fonksiyonel salgı alanından transsitoza tabi tutulur (Arana-Chavez ve Bradaschia-Correa, 2009).



Şekil 1.7. Osteoklast, osteoblast ve osteositlere ait histolojik fotoğraf.

Lamellar kemik yüzeyinde görülen osteoklast (siyah ok), mineralize kemik matriksine gömülü olarak bulunan osteositler (beyaz ok), lamellar kemik yüzeyindeki osteoblast (kırmızı ok) ve kemik iliği (mavi ok başı). Masson'un üçlü boyaması, x40 büyütme.

1.6. Kemik Dokunun Hücrelerarası Maddesi

Kemik matriksi toplam kemik hacminin yaklaşık %90'ını oluşturur. Bunun %65'lik kısmını inorganik madde (mineraller), %25'lik kısmını organik maddeler ve geriye kalan yaklaşık %10'luk kısmını ise su oluşturur (Burr, 2019). Osteoblastlar tarafından sentezlenen organik matriks ağırlıklı olarak Tip-1 kollajenden oluşur. Kemikteki kollajenin yaklaşık olarak %95'ini tip-1 kollajen oluşturur (Garnero, 2015). Diğer kollajen türleri ise (tip-3 ve tip-4 gibi) tip-1 kollajenin fibril çapının modülasyonunda rol oynar (Niyibizi ve Eyre, 1989). Kemikteki kollajen molekülleri 2 $\alpha 1$ ve 1 $\alpha 2$ zincirinden oluşan üçlü sarmal yapısındadır (Burr, 2019). Her zincir yaklaşık 1000 aminoasit içerir ve kollajen moleküllerinin sarmal merkezinde Glisin-X-Y üçlüsünün tekrar eden birimleri bulunur (Burr, 2019). Gli-X-Y tekrar üniteleri üçlü sarmal yapının oluşumu için oldukça önemlidir (Burr, 2019). Kollajende birçok

amino asit bulunurken Gli-X-Y tekrar ünitelerindeki X ve Y grupları prolin ve hidroksiprolin tarafından işgal edilir. Bu amino asitler kollajen zincirinin ana omurgası ile halka oluşturarak sarmal sertliğinin oluşumuna katkı sağlar (Burr, 2019). Organik matriks ayrıca osteokalsin, osteonektin, osteopontin, kemik sialoprotein, fibronektin gibi kollajen olmayan proteinleri, dekorin, biglikan, lümikan gibi lösinden zengin proteoglikanları ve kemik morfogenetik proteinler (BMP) ile büyüme faktörlerini içerir (Aszódi, Bateman, Gustafsson, Boot-Handford ve Fässler, 2000). Kemiğin organik matriksi kemiğe özgü bir form vererek çekme kuvvetlerine karşı direnç sağlar. Ayrıca kemik matriksinde bulunan BMP'ler, TGF-B ailesine ait büyüme faktörleri, interlökin-1, interlökin-6, osteokalsin, osteonektin ve kemik sialoprotein gibi maddeler osteogeneziste, mineralizasyonda ve kemiğin yeniden şekillenmesinde önemli rol oynarlar (Dickson, Millar ve Veis, 1975; Gundberg, 2003).

Kemiğin inorganik matriksi ağırlıklı olarak kalsiyum ve fosfattan oluşur. Kalsiyum ve fosfatın yanısıra bikarbonat, sodyum, potasyum, magnezyum, karbonat, florit gibi maddeleri de içerir. Kemiğin inorganik matriksinin büyük bölümünü oluşturan kalsiyum ve fosfat iyonları hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) formunda bulunurlar. Ayrıca kemik matriksindeki mineraller vücut için depo görevi de görürler. Kalsiyum ve fosfat için rezerv oranları sırasıyla %99 ve %85 düzeylerindeyken, magnezyum ve sodyumun yaklaşık %40-60'ı kemiklerde bulunur (Buckwalter, 1995). Kemikteki kollajen ve non-kollajen proteinler hidroksiapatit birikimi için bir yapı iskelesi görevi görür. Bu ilişki sayesinde kemiğe özgü sertlik, mukavemet ve basınç kuvvetlerine karşı dayanma gücü kazandırılır (Datta, Ng, Walker, Tuck ve Varanasi, 2008). Kemik matriksi organik ve inorganik kısımları açısından ayrı ayrı veya aralarındaki ilişki açısından değerlendirildiğinde, kemiğe mekanik destek sağlamasının yanında kemik homeostazında da önemli bir role sahiptir. Yapısal olarak da karmaşık fakat iyi organize olmuş bir mikroçevre oluşturur (Green, Schotland, Stauber, Kleeman ve Clemens, 1995).

1.7. Kemik Fizyolojisi

1.7.1. Mineralizasyon

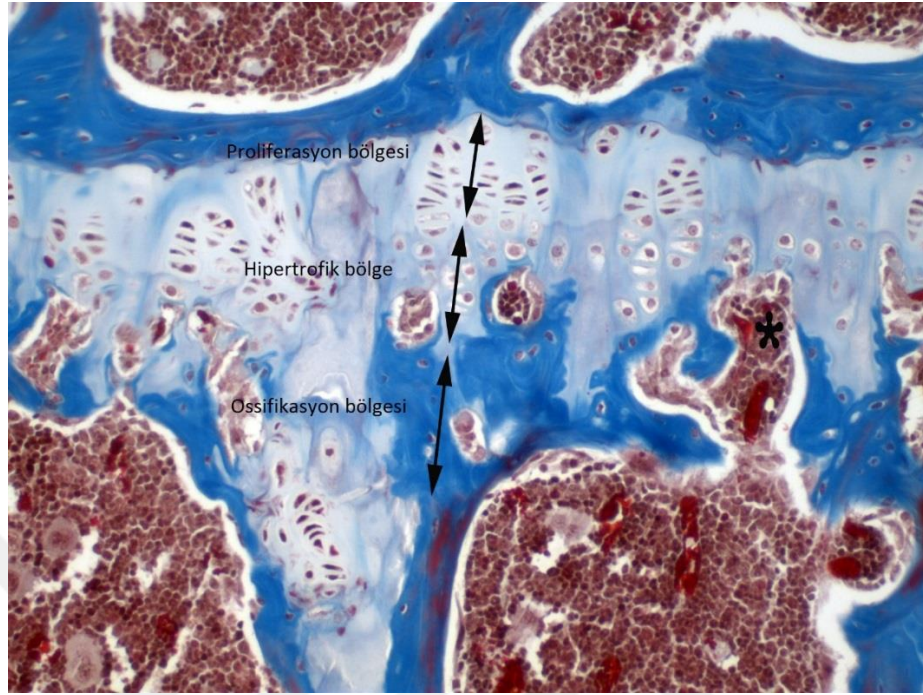
Kemik doku sertliğini mineralize yapısından alır. Mineralizasyon ise organik matriks içerisine çözünebilir haldeki kalsiyum ve fosfatın hidroksiapatit haline gelmesiyle karakterize bir durumdur. Mineralizasyon süreci osteoblastlar tarafından düzenlenir ve organik matriksin sentezlenmesinden yaklaşık 10-15 gün sonra başlar (Sommerfeldt ve Rubin, 2001; Clarke, 2008).

1.7.2. Kemik Oluşumu (Osteogenez, Ossifikasyon)

Kemik doku büyük ölçüde mezodermal kökenlidir, fakat iç kulak kemiklerine ve kraniyofasiyal kemiklerin bir kısmına crista nöralis'in de katkısı vardır (Minoux ve Rijli, 2010). Gerek fötusta gerekse yetişkin iskeletinde ossifikasyon süreci endokondral ve intramembranöz olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir.

Endokondral ossifikasyon hiyalin kıkırdak aracılı gerçekleşen kemikleşmedir. Embriyonal hayatta uzun kemiklerin oluşumunda, epifizyal büyümede ve kırık iyileşmesinde rol alır. Endokondral ossifikasyon kondrositlerin proliferasyonu sonucu hiyalin kıkırdak çatısı oluşumu ve bu hiyalin kıkırdak taslağındaki dört farklı bölge oluşumuyla karakterizedir (Olsen, Reginato ve Wang, 2000; Ortega, Behonick ve Werb, 2004; Shapiro, 2008). Bu bölgeler dinlenme bölgesi (resting zone), proliferatif bölge, hipertrofik bölge ve kalsifikasyon bölgesidir (Şekil 1.8.). Kalsifikasyon bölgesinin devamında ise ossifikasyon yani kemikleşme bölgesi görülür. Dinlenme bölgesi ossifikasyon bölgesinden en uzakta bulunur ve normal kondrositlerin bulunduğu bölgedir. Normal kondrositler çoğalarak üst üste dizilir ve kemiğin uzun eksenine paralel klonlar meydana getirir. Bu bölge proliferasyon bölgesidir. Prolifere olan kondrositler sitoplazmalarında glikojen birikimiyle karakterize hipertrofik hücrelere dönüşürler ve hipertrofik bölgeyi oluştururlar (Ortega vd., 2004; Shapiro, 2008). Kondrositlerin hipertrofisi ve ALP salgılanması kondrositlerin apoptozuna ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) dahil olmak üzere anjiyojenik faktörlerin salınmasına yol açar. Apoptoza uğrayan hipertrofik kondrositlerin lakunları damar invazyonu ve osteoprogenitör hücrelerin migrasyonuna maruz kalır. Bu bölgelere hidroksiapatit kristallerinin çökmesiyle

mineralizasyon başlar. Osteoprogenitör hücreler ise osteoblastlara farklılaşarak kemik üretimini gerçekleştirirler (Ortega vd., 2004; Shapiro, 2008).



Şekil 1.8. Epifiz plağında endokondral ossifikasyon bölgeleri.

Kemiğin uzun eksenine paralel klonlar meydana getiren kondrositlerin oluşturduğu proliferasyon bölgesi, proliferen kondrositlerin hipertrofiye uğradığı hipertrofik bölge ve ossifikasyon bölgesi görülmektedir. Hipertrofik bölgede apoptoza uğrayan kondrositlerin lakunlarına invaze olan damar ve kemik iliği (asteriks). Masson'un üçlü boyaması, x40 büyütme.

İntramembranöz kemikleşme, hiyalin kıkırdak taslağı oluşmaksızın spontan kemik oluşumu sürecidir. Bu tür kemikleşmeye yassı kemiklerin oluşumunda, primer kemik iyileşmesinde ve distraksiyon osteogenezisi sürecinde rastlanır. İntramembranöz ossifikasyon, mezenkimal kök hücrelerin osteoprogenitör hücrelere farklılaşmasıyla ekstraselüler matriks içerisinde bir ossifikasyon merkezi oluşumu ve daha sonra osteoprogenitör hücrelerin proliferen olup farklılaşmasıyla osteoblastlara dönüştüğü bir süreci ifade eder (Olsen vd., 2000; Dimitriou, Tsiridis ve Giannoudis, 2005; Shapiro, 2008). Farklılaşan osteoblastlar kemik matriksi yapmaya başlar böylece kemik spikülleri ve trabekülleri oluşur. Oluşan kemik spikülleri ve trabeküller anastomozlaşarak trabeküler kemiği oluşturur ve kalsifikasyon süreci başlar. Kalsifiye kemik matriksinde hapsolan osteoblastlar osteositlere dönüşürler. Mineralize olmayan bölgelerde ise mezenşim içte endosteumu dışta da periosteumu şekillendirir. Ayrıca trabeküller bazı alanlarda sınırlı kalırlar, bu alanlarda ise mezenşimden

farklılaşarak kemik iliği oluşur (Sağlam vd., 2008; Erdost, 2011; Topaloğlu, Ketani ve Saruhan, 2017).

1.7.3. Kemik Büyümesi, Modelleme ve Remodeling

Dinamik bir doku olan kemik dokuda büyüme, modelleme ve remodeling faaliyetleri gerçekleşmektedir. Uzun kemiklerde epifiz plaklarında endokondral ossifikasyon yoluyla boyuna büyüme görülürken enine (raidyal) büyüme ise apozisyonel büyümeyle gerçekleşir. Apozisyonel kemik büyümesi periosteum seviyesinde kemik oluşumunu takiben endosteum seviyesinde eski kemiğin rezorbe edilmesi sürecidir (Hunziker, 1994). Yassı kemiklerde ise kemik büyümesi bölgeye göre değişmekle birlikte genellikle apozisyonel büyüme şeklinde görülür. Ancak kranio-fasiyal iskeletin gelişimi sırasında, değişen boyut ve şekline bağlı olarak, kemik büyümesine hem intramembranöz hem de endokondral ossifikasyon süreçleri katkı sağlar (Khan vd., 2005; Buck ve Dumanian, 2012).

Kemik doku, üzerine yüklenen kuvvetlere (gerilme, basınç gibi) bağlı olarak şekil değiştiren bir dokudur. Bu özelliği kemiğin modellemesinde önem taşır. Kemik kuvvete maruz kaldığı bölgelerde güçlenirken kuvvet uygulanmayan bölgelerde rezorpsiyona uğrar (Buck ve Dumanian, 2012). Bu nedenle modelleme kavramı kemiğin yapısal gücünü temsil etmesi bakımından önem taşır (Khan vd., 2005; Buck ve Dumanian, 2012).

Remodeling kemiğin yeniden şekillendirilmesi sürecidir ve yaşam boyu devam eder. Kemik sağlığı, kalsiyum homeostazı ve mikro hasarlı kemiğin onarımı için yapılan günlük temizlik sürecidir. Onarım gerektiren alanları hedef alan remodeling işleminde rezorpsiyon ve replasman olayları bir arada görülürken, kemik dokunun üç boyutlu yapısında görülen değişiklik çok az miktardadır. Osteoblastik ve osteoklastik işlemlerin bir arada görüldüğü bu işlemde her bir döngünün sonucunda yeni bir osteon (Havers Sistemi) veya trabekül üretilir (Hadjidakis ve Androulakis, 2006; Clarke, 2008).

1.8. Kırık İyileşmesi

Kemik doku kendine has özellikleri olan eşsiz bir dokudur ve kendini onarabilme kabiliyeti vardır. Kırık iyileşmesi ise doku hasarına bir yanıt olarak başlatılan iyi

organize edilmiş adımları izleyen bir onarım sürecidir. Bu biyolojik süreç, kemiğin lamellar yapısını orijinal haline geri getirmeyi ve mekanik gücünü geri kazandırmayı amaçladığından büyük bir öneme sahiptir (Brandi, 2010; Marsell ve Einhorn, 2010).

Kemik doku, fibröz skar doku oluşmaksızın iyileşebilen birkaç dokudan biridir (Marsell ve Einhorn, 2011). Bu nedenle kırık iyileşme süreci kemik gelişimini özetleyen bir doku rejenerasyon biçimi olarak kabul edilebilir. Kırık oluşumunu takip eden kemik onarım sürecinde 3 aşama vardır. Bu aşamalar erken inflamatuvar evre, proliferasyon evresi ve remodeling evresi olarak sıralanmaktadır (Pilitsis, Lucas ve Rengachary, 2002). Klasik histoloji terminolojisinde kırık iyileşmesi primer (direkt) ve sekonder (indirekt) kırık iyileşmesi olarak ikiye ayrılmıştır (Einhorn, 1998).

1.8.1. Primer Kırık İyileşmesi

Primer kırık iyileşmesi, doğal kırık iyileşme sürecinde yaygın görülen bir durum değildir. Sekonder iyileşmeden daha hızlı bir iyileşme sürecidir ve sekonder iyileşmede görülen kallus oluşumu primer iyileşmede görülmez. Primer iyileşmenin gerçekleşmesi için kırığın tam anatomik redüksiyonuna ve stabil olarak fiksasyonuna ihtiyaç vardır. Bu gereksinimler ancak açık redüksiyon ve internal fiksasyon ile karşılanabilir. Lamellar kemiğin, havers kanallarının ve kan damarlarının doğrudan yeniden şekillenmesiyle karakterize olan primer kırık iyileşmesinde tam iyileşme birkaç aydan birkaç yıla kadar sürebilir (Rahn, 1982; Fackelman, 2002; Marsell ve Einhorn, 2011).

Primer kırık iyileşmesi kontakt iyileşmesi veya boşluk iyileşmesi yoluyla olur. Kırık fragmentlerinin tam anatomik redüksiyonu ve fragmentler arasındaki gerilmeyi en aza indirecek stabil bir fiksasyon sağlandığında, fragmentler arası mesafe 10 nm'den az ve gerilme kuvvetinin de %2'den az olduğu durumlarda kontakt iyileşmesi gerçekleşir (Shapiro, 1988). Kontakt iyileşme için gerekli koşullar sağlandığında, kırık uçlarının en yakınındaki osteonlarda "kesme konileri" oluşur (Hulse ve Hyman, 1993). Kesme konilerinin uç kısımlarında osteoklastlar vardır ve bu osteoklastlar günde 50 µm hızında uzunlamasına boşluklar oluştururlar. Bu boşluklar ise kesme konisinin arkasında bulunan osteoblastlar tarafından üretilen yeni kemik ile doldurulur. Eş zamanlı olarak kemik bütünlüğü sağlanır ve aksiyel yönde Havers sistemlerinin restorasyonu gerçekleşir (Rahn, 1982; Kaderly, 1991). Yeni şekillenen Havers sistemleri osteoblast prekürsörlerini taşıyan kan damarlarının penetrasyonuna

izin verir. Yeni oluşan osteon köprüleri periosteal kallus oluşumu olmaksızın olgunlaşarak doğrudan lamellar kemiği şekillendirir (Greenbaum ve Kanat, 1993; Einhorn, 1998).

Boşluk iyileşmesi süreci kırık fragmentlerinin birleşmesi ve osteonların yeniden şekillenmesinin farklı zamanlarda gerçekleşmesiyle karakterizedir. Bu özelliği boşluk iyileşmesini kontakt iyileşmeden farklı kılar. Kırık fragmentleri arasındaki mesafe 800-1000 µm'den az olsa bile fiksasyon stabilitesinde ve anatomik redüksiyonda azalma varsa boşluk iyileşmesi gerçekleşir (Kaderly, 1991). Bu iyileşme sürecinde kırık bölgesi uzun eksenine dik kemik lamelleri tarafından doldurulur ve ikincil osteonal rekonstrüksiyon gereklidir (Schenk, 1994). İlk oluşturulan kemik lamellerinin yerini kademeli olarak revaskülarize osteonlar alır. Bu işlemler yaklaşık 3-8 hafta zaman alır. Yeni şekillenen osteonlar kemiğin uzun eksenine dik olarak uzandığından mekanik olarak zayıftır. Bu nedenle kontakt iyileşme kaskadında görülen kesme konileri ile ikincil bir yeniden şekillenme gerçekleştirilir (Shapiro, 1988; Andersen, 1989).

1.8.2. Sekonder Kırık İyileşmesi

Sekonder kırık iyileşmesi endokondral iyileşme, sekonder iyileşme veya kallus iyileşmesi isimleriyle de bilinir. Kemik iyileşmesinin en yaygın şekli olan sekonder kırık iyileşmesinde endokondral ve intramembranöz kırık iyileşmeleri birlikte görülebilir (Gerstenfeld, 2006). Tam anatomik redüksiyon ve stabil fiksasyon gerçekleşmediği durumlarda sekonder kırık iyileşmesi görülür. Kırık uçları arasında mikro hareket ve bir miktar ağırlık taşıma durumunda görülen iyileşme türüdür (Green, Lubahn ve Evans, 2005). Sekonder kemik iyileşmesi tipik olarak kırığın non-operatif sağaltımı veya operatif olarak intramedullar pin uygulaması, eksternal fiksasyon ve parçalı kırıkların internal fiksasyonu gibi kırık bölgesinde bir miktar hareketin olduğu bazı operatif tedavilerden sonra meydana gelir (Pape, Giannoudis, Grimme, Van Griensven ve Krettek, 2002; Perren, 2002). Sekonder kırık iyileşmesinde kırık hematoma, inflamasyon, yumuşak kallus oluşumu, kallus mineralizasyonu ve kallus yeniden şekillendirilmesi (remodeling) olmak üzere birbirini takip eden aşamalar vardır (Greenbaum ve Kanat, 1993). Bu olayları içeren sekonder kırık iyileşmesi inflamasyon fazı, proliferasyon fazı ve yeniden şekillendirme (remodeling) fazı olmak üzere 3'e ayrılır.

1.8.2.1.İnflamasyon Fazı

Kırık meydana geldikten hemen sonra bir hematom oluşur. Bu hematom kemik doku bütünlüğü bozulması sonucu medullar kanal içindeki damarların ve periostal damarların yırtılması sonucu oluşur. Yaralanmayla birlikte iyileşmenin devamlılığı için gerekli olan inflamatuvar yanıt başlatılır. Hematomun medullada, kırık uçları arasında ve çevresinde organize olarak kallus oluşumu için bir taslak oluşturması inflamatuvar yanıt sayesinde olur. Çünkü akut yaralanmalarda proinflamatuvar moleküllerin kısa ve yüksek düzeyde salgılanması doku rejenerasyonu için oldukça önemlidir (Gerstenfeld, Cullinane, Barnes, Graves ve Einhorn, 2003). Kırık hematomunda bulunan plateletler degranüle olarak vücuttaki birçok vazoaktif mediyatörün salınmasına neden olur. Yaralanmadan birkaç gün sonra interlökinler ve TNF- α gibi çeşitli yangı mediyatörlerinin seviyeleri önemli ölçüde yükselir. Bu faktörler yangı hücrelerini harekete geçirir ve kemotaksisine neden olur. Aynı zamanda anjiyogenezi destekler (Gerstenfeld vd., 2003; Sfeir, Ho, Doll, Azari ve Hollinger, 2005).

1.8.2.2.Proliferasyon Fazı

Proliferasyon fazı kırık hematomunun organize olmasıyla başlayan bir dizi olayları takip eden aşamaları tanımlar ve fibroplazi süreci olarak da bilinir (Cho vd., 2006). Travma sonrası vasküler hasara bağlı olarak kırık bölgesinde hipoksi şekillenir ve kırık fragmentlerinin uçlarındaki osteositler beslenemedikleri için nekroza uğrarlar. Nekroze alanlar yangı bölgesine göç eden makrofajlar (osteoklastlar ve kemik iliği kaynaklı mononükleer hücreler) tarafından fagosite edilir (Gerstenfeld vd., 2003; Oryan, Monazzah ve Bigham-Sadegh, 2015). Makrofajlar aynı zamanda rejenerasyon fazını destekleyen BMP-2, BMP-5, BMP-7 gibi kemik morfojenik proteinleri ile TGF- β , PDGF ve IGF gibi büyüme faktörlerini salgılar. Salgılanan büyüme faktörlerinin etkisiyle mezenkimal kök hücrelerin kırık bölgesine göç etmesi, toplanması, proliferasyonu ve kondroblastlara, fibroblastlara, angioblastlara ve osteoblastlara farklılaşması uyarılır (Sfeir vd., 2005; Kim vd., 2017). Farklılaşan endotel hücreleri, fibroblastlar ve osteoblastlar kırık fragmentleri arasındaki boşluğu doldurarak granülasyon dokusu oluştururlar. İnflamasyon aşamasında oluşan bu ilkel kallus fibrin açısından zengindir ve kırık hattındaki kontrolsüz hareketliliği azaltır.

İlkel kallus dokusu içinde, kırık fragmentleri arasında ve periosteal bölgelerin dışında endokondral bir oluşum meydana gelir ve kademeli olarak yumuşak kallus kıkırdak görünümüne dönüşür (Cho vd., 2006; Lee ve Lorenzo, 2006). Travmadan 7-9 gün sonra meydana gelen bu yumuşak kallusta kırık fragmentlerinin distal ve proksimal uçlarında subperiosteal olarak intramembranöz ossifikasyon yanıtı da şekillenir. Böylece sert kallus şekillenir ve oluşan sert kallus kırılmaya direnç gösteren aynı zamanda ağırlık taşımaya izin veren yarı sert bir yapı oluşturur (Rahn, 1982; Kitaori vd., 2009). Büyüme faktörlerinin etkisiyle endokondral ossifikasyon bölgesindeki kondrositler hipoksiye uğrar ve yine kademeli olarak kıkırdak dokunun yerini ossifiye doku olarak sert kallusun şekillenmesine neden olur (Keramaris, Calori, Nikolaou, Schemitsch ve Giannoudis, 2008). Kırık iyileşmesindeki başarı için revaskülarizasyon şarttır. Çünkü endokondral ossifikasyonun devamlılığı için hipoksik kondrositlerin ve dejenere kıkırdak matriksin yerini kan damarlarının doldurması gerekir (Albrektsson ve Johansson, 2001). Böylece avasküler kıkırdak matriksinin yerini vaskülarize bir kemik dokusu alır. Bu değişimi sağlayan ise hem osteoblastlardan hem de hipoksik kondrositlerden salgılanan vasküler endotelial büyüme faktörüdür (VEGF). VEGF hem vaskülogenezi hem de anjiyogenezi uyarır. Bu nedenle VEGF kırık bölgesinin neoanjiyogenezi ve revaskülarizasyonu için oldukça önemlidir (Kremaris vd., 2008; Goldhahn vd., 2012).

1.8.2.3.Remodeling Fazı

Remodeling fazı kallus oluşumu ve mineralizasyonu, mineralize kallusun mineralize kemik ile yer değiştirmesi, yeni sentezlenen kemiğin remodeling ile orijinal şekline, boyutuna ve biyomekanik kabiliyetine geri döndürülmesi aşamalarını içerir (Kumar ve Narayan, 2014). Düzensiz şekillenen kemik kallusun lamellar kemiğe dönüşümünü içerdiğinden sekonder kemik oluşumu olarak da tanımlanır (Yang vd., 2007; Schindeler, McDonald, Bokko, Little, 2008).

Remodeling süreci sert kallusun osteoklastlar tarafından rezorpsiyonu ve osteoblastlar tarafından lamellar kemik üretiminin dengesiyle gerçekleşir. Bu yeniden şekillenme süreci 3-4 hafta gibi erken bir dönemde başlasa bile tamamlanması yıllar sürebilir. Remodeling süreci birtakım proinflamatuvar maddelerin, bazı büyüme faktörlerinin, büyüme hormonu ve parathormonun kontrolü altındadır (Goldhahn vd., 2012). Ancak başarılı bir yeniden şekillenme için yeterli

vaskülarizasyon ve mekanik stabilitede kademeli artış oldukça önemlidir (Lauzon, Bergeron, Marcos ve Faucheux, 2012; Kumar ve Narayan, 2014).

1.9. Kemik Defektleri

Kemik doku rejenerasyon kabiliyetinin iyi olması ve iyileşme sürecinde skar dokusu oluşturmaması ile bilinen bir dokudur (Marsell ve Einhorn, 2011). Kırık iyileşmesinde anatomik redüksiyon ve stabil fiksasyon çok gerekli olmakla birlikte osteoblastlar, osteoklastlar, bazı büyüme faktörleri, hormonlar, yaş, beslenme, kronik hastalıklar gibi birçok faktör kırık iyileşme sürecini etkileyebilir (Keating vd., 2005). Söz konusu faktörlere bağlı olarak travma sonrası gecikmiş kaynama, kaynamama, yanlış kaynama ve bazı kemik kaybı sorunları ortaya çıkabilir. Kırık iyileşmesinin çok iyi organize edilmiş fizyolojik süreci normal olarak devam etse bile bazı klinik durumlar kırık iyileşmesi üzerine oldukça etkilidir (Raisz, 1999). Örneğin iskelet kusurları, avasküler nekroz ve osteoporoz gibi durumlar kırık iyileşmesi üzerine büyük ölçüde etkilidir. Ayrıca yüksek enerjili travma sonucu yumuşak doku kaybı ve periosteal sıyrılma ile seyreden açık kırıklar (özellikle açık tibia kırıkları), patlama yaralanmaları, geniş bir debridman gerektiren enfeksiyon veya tümör rezeksiyonları da kritik kemik kayıplarına yol açabilir (Keating, Simpson ve Robinson, 2005). Yukarıdaki bilgilerden de anlaşılacağı gibi kemik defektlerinin etiyolojisi çeşitlilik göstermektedir.

Kritik boyutlu kemik defekti cerrahi stabilizasyona rağmen kendiliğinden iyileşmeyen kusuru tanımlar (Keating vd., 2005). Literatürdeki tanımlamaya göre uzunluğu 2cm'den fazla ve çevresinin %50'si kayba uğramış defektler kritik boyutlu olarak tanımlanır (Keating vd., 2005; Sanders vd., 2014). Bununla birlikte defektin anatomik lokasyonu ve onu çevreleyen yumuşak dokunun durumu da bu tanımlamayı etkiler (Keating vd., 2005; Sanders vd., 2014).

Kemik defektlerinin spontan olarak iyileşmesini etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar kritik boyutu, mutlak ve nispi boyutu, çevresel kemik kaybı olup olmadığı, çevresel yumuşak doku kaybı olup olmadığı, anatomik lokasyonu (diyafizer, metafizer veya artiküler), yumuşak doku ortamı, hastanın yaşı ve kronik hastalıkları gibi faktörlerdir. Kemik replasmanı gerektiren defektlerin tedavisinde kemik rejenerasyonunu uyarmak veya arttırmak için çeşitli yöntemler vardır. Altın standart

otolog kemik grefti olsa da distraksiyon osteogenezi, artrodez, allojenik grefler, kemik iliği grefti, demineralize kemik matriksi ve kalsiyum fosfat bazlı kemik greft ikameleri tedavi amacıyla kullanılmaktadır (Green, Jackson, Wall, Marinow ve Ishkanian, 1992; Giannoudis, Dinopoulos ve Tsiridis, 2005). Ayrıca büyüme faktörleri ve kemik morfogenetik proteinleri de içeren tedavi yaklaşımları mevcuttur (Aronson, 1997; Giannoudis ve Einhorn, 2009). Distraksiyon osteogenezi, otogreft ve artrodez gibi bilinen tekniklerin dışında, biyoteknolojileri kullanan doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları kemik defektlerinin tedavisinde çok fayda sağlayabilir (Calori vd., 2018). Bu nedenle takip eden bölümde doku mühendisliği yaklaşımından ve sert doku mühendisliği uygulamalarından bahsedilecektir.

1.10. Doku Mühendisliği Yaklaşımı

“Doku mühendisliği” terimi ilk olarak Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD) 1987 yılında Ulusal Bilim Vakfı (US National Sciences Foundation) tarafından düzenlenen biyomühendislik panelinde ortaya çıkmıştır (Nerem, 1992). Langer ve Vacanti (1993) tarafından tanımlanan doku mühendisliği; hasarlı veya yıpranmış biyolojik bir dokunun fonksiyonunu taklit edebilecek veya bütünüyle bir organın ikamesi olabilecek nitelikte yeni bir doku elde etme amacı güden, mühendislik ve yaşam bilimleri ilkelerini birlikte barındıran multidisipliner bir alandır (Langer ve Vacanti, 1993; Neubaer, Döbl ve Scheibel, 2021). Doku mühendisliği yaklaşımı tanımlanırken “rejeneratif tıp” terimi ve yaklaşımı gözardı edilmemelidir. İlk olarak 1998 yılında ortaya çıkan rejeneratif tıp terimi (Mahla, 2016) “normal işlevlerini yerine getirmek veya onarmak amacıyla insan hücrelerini, dokularını veya organlarını değiştirme veya yenileme süreci” olarak tanımlanmıştır (Mason ve Dunnill, 2008). Bu anlamda rejeneratif tıp alanı doku mühendisliği, kök hücreler ve klonlama gibi teknoloji alanlarını kapsar (Atala, 2006) ve hücre bazlı tedaviler, immunomodülasyon, gen tedavisi, nanotıp ve doku mühendisliği uygulamaları da dahil olmak üzere hücre, doku veya organ yenilenmesini indüklemek üzere farklı stratejiler kullanır (Salgado vd., 2013). Aslında ortak amaçlara hizmet ettiği açıkça görülen bu iki alan birbirinden bağımsız olmayıp çok sıkı ilişki içerisinde. Bu nedenle son yıllarda bu iki alan birleşerek “doku mühendisliği ve rejeneratif tıp” adıyla daha geniş bir alan haline gelmiştir (Salgado vd., 2013).

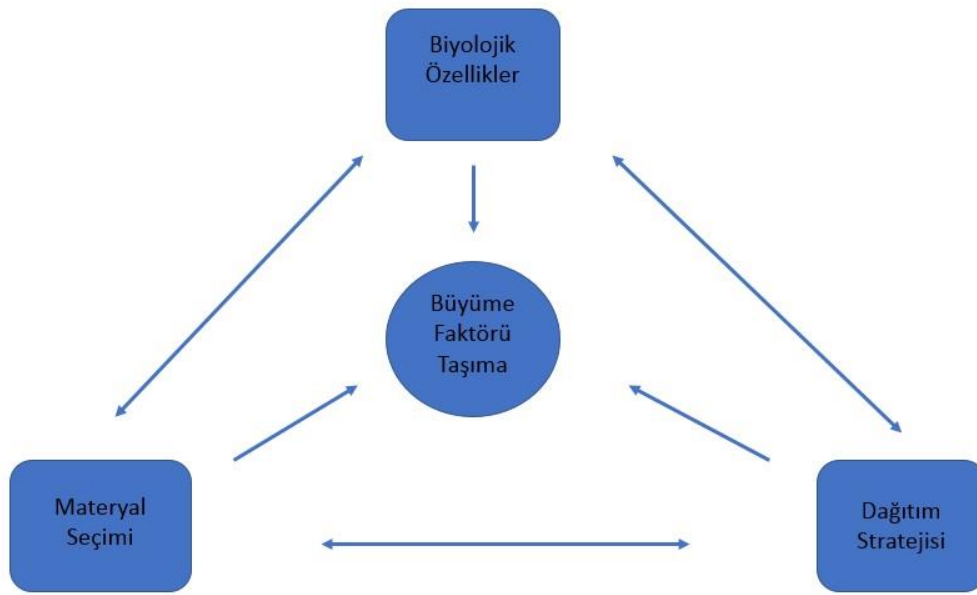
Yaralanma ve hastalıklardan kaynaklanan doku veya organ yetmezliği önemli bir sağlık sorunudur. Doku mühendisliği, mühendislik ve fizik bilimini yaşam bilimleriyle birleştirerek hasarlı doku ve organların rejenerasyonunu, reperasyonunu veya değiştirilmesini amaç edinir (Shafiee ve Atala, 2013). Bu amaçları gerçekleştirmek için ise çeşitli hücre hatları, büyüme veya farklılaştırma faktörleri ve biyomateriyaller olmak üzere üç temel enstrüman kullanılmaktadır (Salgado, Coutinho ve Reis, 2004). Bu enstrümanların kullanımında ise hücre kaynağı, doku iskelelerinin hazırlanması, hücre ekimi ve kültür ortamı, matriks hazırlanması, hücrenin mekanik özellikleri ve hayvan modelleri gibi birçok faktör doku mühendisliği için kritik öneme sahiptir (Olson, Atala ve Yoo, 2011).

1.10.1. Doku Mühendisliğinde Büyüme Faktörlerinin Kullanımı

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan önemli enstrümanlardan biri büyüme ve farklılaştırma faktörleridir. Büyüme faktörleri doğal olarak hücrelerden salgılanan, ekstrasellüler matriks ile doğrudan etkileşime giren, gelişme ve yara iyileşmesi sırasında hücreler arası sinyal iletim yollarını aktive eden spesifik reseptörlere bağlanarak hücre büyümesine, çoğalmasına, farklılaşmasına ve göçüne katılabilen çözünür proteinlerdir (King ve Krebsbach, 2012; Wang vd., 2017; Qian vd., 2017; Ren, Zhao, Lash, Martino ve Julier, 2020). Büyüme faktörlerinin yara iyileşmesi, deri, kırık ve kemik doku mühendisliğinde önemli uygulamaları vardır. Örneğin vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) aileleri, hücre migrasyonunu ve endotel hücre proliferasyonunu indükleyebilir; Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF-BB) kök hücre toplanmasını, perisit adezyonunu ve damar olgunlaşmasını uyarır (Hellberg, Östman ve Heldin, 2010). Hepatosit büyüme faktörü (HGF) mezankimal kök hücrelerin çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını düzenleyebilir. Görüldüğü üzere büyüme faktörlerinin çeşitli spesifik biyolojik özellikleri vardır, bu nedenle kullanım alanları ve uygulamaları farklılık gösterebilir (Catizone, Ricci, Del Bravo ve Galdieri, 2006). Klinik çalışmalarda büyüme faktörlerinin etkinliği ve güvenilirliği hakkında kapsamlı çalışmalar olmasına rağmen, kullanımlarıyla ilgili bazı sınırlayıcı durumlar vardır. Çünkü klinik kullanımda tercih edilen çözünür büyüme faktörlerinin miligram seviyesindeki miktarları fizyolojik rejenerasyon için gereken miktardan çok daha fazladır. Yüksek miktardaki çözünmüş büyüme faktörü hedef bölgenin yakınındaki dokulara veya kan dolaşımına karışarak istenmeyen etkilere yol açabilir. Canlı

organizmadaki uzun vadeli rejenerasyon süreci göz önüne alındığında “etkinlik/yan etki” ilişkisi iyi değerlendirilmelidir (Aguilar, Silva ve Moulton, 2019).

Doku mühendisliğinde kullanılacak büyüme faktörünün hedef bölgeye hassas miktarda ve güvenli salınımı oldukça önemlidir. Yarı ömrünün az olması büyüme faktörlerinin aktif olduğu süreyi önemli ölçüde etkiler. Bu durum büyüme faktörlerini uzun süre tutabilen dağıtım sistemlerinin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Bu dağıtım sistemlerinin amacı doku oluşum sürecini ve terapötik etkiyi kontrol altında tutarak büyüme faktörlerinin güvenli ve hassas salınımını sağlamaktır (Aguilar vd., 2019). Doku mühendisliğinde kullanılan büyüme ve farklılaşma faktörlerini taşıyacak dağıtım sistemlerinde biyolojik özellikler, malzeme seçimi ve dağıtım stratejileri olmak üzere üç önemli bileşen vardır (Şekil 1.9.) (Aguilar vd., 2019).



Şekil 1.9. Büyüme faktörleri dağıtımının bileşenleri

Şekil 1.9. Aguilar vd., (2019)’dan uyarlanmıştır.

Yukarıda bahsedilen üç bileşen ışığında büyüme faktörleri için çeşitli taşıma sistemleri tasarlanmıştır. Bunlar polisakkaritlerden ve diğer biyomakromoleküllerden çeşitli formlarda nanofiberler, nanolifler, scaffoldlar, hidrojeller, süngerler, mikroküreler, nanopartiküller ve kompozitler şeklinde geliştirilen taşıma sistemleridir. Sentetik veya doğal malzemelerden üretilen taşıma sistemleri mevcut

olduğu gibi, doğal biyomalzemelerden üretilen taşıma sistemleri avantaj sağlayabilirler. Bu biyomalzemeler ekstrasellüler matriks bileşimine benzer özellikler gösterdiklerinden vücut tarafından tanınır ve tolere edilir. Ayrıca doğal biyomalzemelerin değişen teknolojik gelişmelere ayak uydurabilmesi, doğal olarak bol bulunması ve kimyasal modifikasyonlar için yeterli kapasiteye sahip olması da önemli avantajlarındandır (Miao, Wang, Zeng, Liu ve Chen, 2018; Tiwari, Patil ve Bahadur, 2019).

1.10.2. Doku Mühendisliğinde Hücre Temelli Tedavi Yaklaşımları

Doku mühendisliği uygulamalarının temel enstrümanlarından biri olan hücre temelli tedavi yaklaşımlarına baktığımızda, kaynağına göre üç tip hücre kullanımı görülmektedir. Bunlar hastanın kendinden olan otolog hücreler, aynı türe ait fakat farklı bir bireyden alınan allojenik hücreler ve farklı bir türden elde edilen ksenojenik hücrelerdir (Olson vd., 2011). Gerek implant reddi gerekse kontaminasyon açısından değerlendirildiğinde en güvenilir hücre kaynağı otolog hücrelerdir. Ancak, yaşlılık ve ileri derecede organ yetmezliği olan hastalarda yeterli hücre hasadının yapılamayışı otolog hücre kullanımını sınırlayan durumlardandır. Otolog hücrelerin yetersiz hasat edildiği durumlarda ise uzun süreli kültivasyonu gerekir ve bu işlem hem uzun zaman gerektiren hem de kontaminasyon riskinin arttığı bir süreçtir (Dzobo vd., 2018). Ksenojenik hücreler kullanılan hücre kaynakları arasında en az güvenilir olanlarıdır. Çünkü domuzlarda rapor edilen endojen retrovirusların varlığı ksenojenik hücreleri en az güvenli hale getirmektedir (Kimsa vd., 2014). Allojenik hücreler ise özellikle deri dokusu mühendisliği için uygun hücrelerdir. Bunun sebebi ise yüksek büyüme faktörü salgılama kabiliyetleridir. Ancak bu yüksek aktivite viral enfeksiyonlar için büyük bir risk taşımaktadır (Bi ve Jin, 2013).

Hücre temelli tedavilerde en kritik konu yeterli sayıda ve canlı hücre sağlamaktır (Berthiaume, Maguire ve Yarmush, 2011). Hücreler tipik olarak sınırlı miktarda bulunan donör dokusundan veya kök hücrelerden elde edilirler (Berthiaume vd., 2011). Dokuya özgü farklılaşmış otolog hücreler bir bireyden elde edilir, in vitro olarak çoğaltılır ve tekrar aynı bireye tedavi amacıyla yeniden verilir ve immünolojik olarak ideal hücrelerdir. Kıkırdak hasarlarında kondrositlerin (Grande, Pitman, Peterson, Menche ve Klein, 1989; Brittberg, 1994) yanık ve yara tedavilerinde dermal fibroblastların veya keratinositlerin (Navsaria, Myers, Leigh ve McKay,

1995; Carsin vd., 2000) kullanımı otolog hücre kullanımına örnek olarak gösterilebilir. Otolog hücrelerin kullanılmasında “kendi kendini” onarma fenomeni her ne kadar çekici olsa ve immunsupresif bir ilaçla kullanmayı gerektirmese de bazı sınırlayıcı durumlar vardır. Bu durumları; hücre donör alanlarındaki sınırlı miktarda bulunan sağlıklı doku varlığı, hücre elde edilmesinde biyopsinin yanı sıra çoğu zaman invaziv cerrahi prosedürlerin kullanılarak ikincil defekt alanlarının ortaya çıkması ve ağrı semptomları, izole edilen primer hücrelerin *in vitro* kültürü esnasında yeterince çoğalmaması, yaşlanması veya farklılaşmaması şeklinde sıralayabiliriz (Fodor, 2003). Bu dezavantajları gidermek için ise periferik kandan ve kemik iliğinden izole edilen otolog progenitör hücreler kullanılmaktadır. Otolog progenitör hücreler hastanın kendisinden elde edildiği için immünolojik açıdan idealdir ve çeşitli hücre hatlarına farklılaşma kabiliyetlerinden ötürü avantaj sağlar (Fodor, 2003). Otolog hücre kaynaklarının yanında allojenik ve ksenojenik hücre kaynakları değerlendirildiğinde her iki hücre kaynağının da avantajlı ve dezavantajlı durumları görülebilmektedir. Örneğin, yetişkin dokusundan elde edilen allojenik kök hücreler farklı hücre hatlarına farklılaşabilme kabiliyetindedirler. Ancak, istenilen farklılaşmayı yönlendirebilme ve fenotipi seçebilme zorluğu nedeniyle kullanırken immunsüpresyon gerektirmeleri bir dezavantajdır. Allojenik hücre kaynaklarından biri de embriyonik kök hücrelerdir. Blastosistten izole edilen embriyonik kök hücreler sınırsız olarak çoğalabilmeleri ve birçok hücre hattına farklılaşabilmelerine rağmen insan embriyonik kök hücrelerin kullanımına dair etik kaygılar bu hücrelerin kullanımını kısıtlamaktadır (Evans ve Kaufman,1981; Nagy vd., 1990). Ancak yetişkin kök hücrelerin, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin, plasental ve umbilikal kord kaynaklı kök hücrelerin kullanımındaki gelişmeler uygun kaynak olarak bu hücrelerin embriyonal kök hücrelerin yerini almasına olanak sağlamaktadır (Berthiaume vd., 2011). İnsan kök hücrelerinin elde edilmesinde karşılaşılan sağlıklı donör eksikliği, invaziv cerrahi prosedürler, kontaminasyon riskleri ve bazı etik problemler ksenojenik hücre hatlarının alternatif kaynak olma potansiyelini güçlendirmektedir (Denker, 1999; Romano, 2004). Ksenojenik hücre hatları düşük maliyeti, tekrarlanabilirliği, genetik olarak tek hücre modifikasyonu ve kriyoprezervasyon gibi avantajlar sağlasa da donör hayvanların biyogüvenli ortamlarda yetiştirilmesi, viral etkenlerin elimine edilmesi ve trasplantasyon sonrası sürekli takip gibi durumların gözardı edilmemesi gerekir (Wynyard, Nathu, Garkavenko, Denner ve Elliott, 2014; Cooper vd., 2017).

1.10.3. Doku Mühendisliğinde Doku İskelelerinin Kullanımı

Etkili doku mühendisliği uygulamaları için temel ihtiyaçlardan biri de doku iskeleleridir. Bilindiği üzere doku iskeleleri, hücreler ve büyüme faktörleriyle birlikte doku mühendisliği uygulamalarının üç bileşeninden biridir. Doku iskeleleri hücre ve doku büyümesi veya farklılaşması için geçici matriksler olarak işlev gören biyolojik olarak parçalanabilir şablonlardır (Salgado vd., 2004). Doku iskeleleri doğal dokunun fiziksel ve kimyasal yapısını taklit ederek hücrelerin doğal dokudaki gibi işlev görmelerini sağlayan hücresel ortamı oluşturur. Hücre temelli uygulamalarda kullanılan iskelelerin hücre bağlanması ve migrasyonu, biyokimyasal faktörlerin tutulumu veya salınımı, besinlerin, eksprese edilen ürünlerin ve atık maddelerin difüzyonuna olanak sağlayacak şekilde gözenekli ortam ve mekanik sertlik veya esneklik gibi bazı amaçlara hizmet etmesi gerekir (Berthiaume vd., 2011). Ayrıca biyoyumlu olması, kontrollü biyobozunurluğa sahip olması, doğal dokuya benzer mekanik özellikler taşıması, 3 boyutlu şekillere kolay işlenebilen gözenekli yapıda olması ve yerine geçeceği dokudaki hücrelerin büyümesine ve farklılaşmasına olanak sağlaması gibi özellikleri taşıması beklenir (Salgado vd., 2004; Salgado vd., 2013).

Doku fonksiyonlarının devamlılığı ve daha iyi anlaşılması için hücre-ekstrasellüler matriks (ECM) ilişkisi oldukça önemlidir. Çünkü, ekstrasellüler matriks sadece fiziksel destek ve üç boyutlu ortam sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücresel işlevleri destekleyen biyoaktif bir mikroçevre sağlar (Keane ve Badylak, 2014). Bu nedenle doku mühendisliğinde kullanılan biyomateriyallerin doğal dokunun ekstrasellüler matriksini biyolojik ve mekanik olarak taklit edecek şekilde tasarlanması gerekir. Uygun biyomateriyallerin kullanımıyla hem hücrelerin tutunmasına, proliferasyonuna ve gelişmesine olanak sağlayan 3 boyutlu ortam sağlanır hem de in vivo koşullardaki mekanik kuvvetlere karşı destek sağlanmış olur. Bunlara ilaveten biyomateriyaller hücrelerin veya büyüme faktörlerinin vücutta istenilen bölgelere taşınmalarına olanak sağlayan taşıyıcı sistemler olarak da tasarlanırlar (Kim ve Mooney, 1998; Olson vd., 2011).

Doğal ECM'nin bileşiminin ve ince yapısının karmaşıklığı nedeniyle ECM'yi birebir taklit eden biyomateriyal sentezi henüz mümkün değildir. Bu nedenle biyomateriyal tasarımları yapılırken dokuya ve hücreye özgü olarak üretim stratejisi belirlenir. Kimi zaman şekil, gözeneklilik, sertlik, dayanıklılık ön plandayken kimi zaman bozunma hızının kontrolü, hücre taşıma kabiliyeti ve mikro yapı gibi özellikler ön

plandadır. Üretim stratejini belirleyen ise hedef doku veya organın karakteristiğidir (Keane ve Badylak, 2014). Tüm bu amaçlara hizmet etmek amacıyla çeşitli maddelerden üretilen biyomateriyaller vardır. Genel olarak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan biyomateriyalleri doğal olarak üretilmiş malzemeler, sentetik malzemeler ve deselülerize doku matriksi olmak üzere üç sınıf altında toplayabiliriz (Olson vd., 2011).

Doku mühendisliği uygulamalarında gözenekli, mikro küre, hidrojel, lifli, polimer-biyoseramik kompozit ve hücreli yapı iskeleleri içinde barındıran farklı tipte iskeleler kullanılmaktadır (Dhandayuthapani, Yoshida, Maekawa ve Sakthi, 2012). Her bir doku için farklı mekanik ve fiziksel özellik taşıması gereken doku iskelelerinin sentezlenme aşamasında da farklı yöntemler kullanılmaktadır. Örneğin; termal olarak indüklenen faz ayrımı, solvent dökümü, partikül uzaklaştırma, dondurarak kurutma, gaz köpükleştirme ve elektroegirme gibi yöntemler doku iskelelerini sentezlemek için kullanılan yöntemlerden bazılarıdır (Ravichandran, Sundarajan, Venugopal, Mukherjee ve Ramakrishna, 2012).

1.10.3.1. Doğal İskeleler

Doğal malzemelerin örnekleri arasında hyaluronik asit, kitosan, kollajen, aljinat, agar-agaroz, selüloz, nişasta ve dekstran gibi malzemeler bulunur. Düşük toksisiteye ve düşük kronik inflamatuvar yanıtı sahip olmaları, diğer doğal malzemelerle veya sentetik malzemelerle kompozit oluşturabilmeleri ve doğal enzimler tarafından bozunabilir olması gibi özellikleri doğal malzemelerin avantajlarıyken, mekanik mukavemetinin zayıf olması, karmaşık yapısından ötürü manüplasyonundaki zorluklar, kolay denatüre olması ve çoğunlukla toksisiteye yol açabilecek kimyasal modifikasyon gerektirmesi gibi özellikleri dezavantajları olarak sıralanabilir (Eybl vd., 1992; Van Luyn vd., 1992; Damink vd., 1996; Gough, Scotchford ve Downes, 2002).

Hyaluronik asit ilk olarak 1934 yılında sığır gözünün corpus vitreum'undan izole edilen bir glikozamino glikandır (Meyer ve Palmer, 1934). Yapısında uronik asit ve amino şeker grubu bulunur. Biyobozunurluğu nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında mesh, sünger ve hidrojel formlarında kullanılmaktadır (Park, Lee ve Kim, 2011; Perng, Wang, Tsi ve Ma, 2011; Place vd., 2012). Sulu ortamlardaki bozunma süresinin kısa olması ve mekanik özelliklerinin düşük olması nedeniyle bu

özelliklerini iyileştirmek için çeşitli kimyasal modifikasyonlar ve çapraz bağlanma reaksiyonları ile kullanılmaktadır. Hyaluronik asitten üretilen doku iskeleleri, yara iyileşmesinde, hücre taşıma sistemlerinde, kıkırdak ve kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır (Lei, Rahim, Ng ve Segura, 2011; Freymann vd., 2012; Erickson vd., 2012; D'Agostino vd., 2015; Cui, Qian, Liu, Zhao ve Wang, 2015).

Kitosan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen β -1,4-glukozamin ve N-asetil-D glukozamin kopolimeridir. Kitosan bazlı yapı iskeleleri biyouyumlu, biyobozunur, non-antijenik ve non-toksik özellikler taşırlar (Huang, Onyeri, Siewe, Moshfeghian ve Madihally, 2005). Deri (Prasad, Shabeena, Vinod, Kumary ve Anil Kumar, 2015), kıkırdak (Song vd., 2015), kemik (Peng vd., 2012) ve kalp doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan kitosan bazlı doku iskeleleri dokuya özgü olarak glutaraldehit (Wilson, Pratt ve Kozinski, 2013), genipin (Frohbergh, 2012) ve glioksal (Monier, Ayad ve Abdel-Latif, 2012) gibi çeşitli çapraz bağlayıcılarla işleme tabii tutularak özellikleri değiştirilebilir.

Üç iplikli sarmal yapıya sahip olan kollajen ekstrasellüler matriksin önemli bir bileşenidir (Berisio, Vitagliano, Mazzarella ve Zagari, 2002; Yang vd., 2004). Genellikle hayvan dokularından izole edilir ve bu durum viral ve prion kaynaklı kontaminasyonları akla getirir. Kontaminasyonların önüne geçmek için sentetik kollajen yapı iskelelerinin üretimi tercih edilebilir (Friess, 1998; Kew vd., 2012). Yüksek mekanik stabilite, biyouyumluluk, biyobozunurluk ve düşük antijenik etki kollajen bazlı doku iskelelerinin avantajlarından. Fakat kullanmadan önce mukavemet veya gözeneklilik gibi kullanılacak dokuya özgü olarak bazı özelliklerinin modifiye edilmesi gerekir. Modifikasyon işlemleri ise çeşitli çapraz bağlayıcılarla veya fiziksel olarak yapılabilir. Kollajen bazlı doku iskeleleri deri, kemik, kıkırdak, sinir ve kalp doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır (Gough vd., 2002; Mu, Zhang, Lin ve Li, 2013; Lee, 2013).

Aljinat hücre duvarında bol miktarda bulunan anyonik bir polisakkarittir (Narayanan, Melman, Letourneau, Mendelson ve Melman, 2012). Aljinat hidrojelers fiziksel jelleşme, termal jelleşme veya çapraz bağlayıcılar ile muamele edilerek modifiye edilirler ve kıkırdak, kemik ve kalp doku mühendisliği uygulamalarında kullanılırlar (Li, Ramay, Hauch, Xiao ve Zhang, 2005; Li ve Zhang, 2005; Sapir, Kryukov ve

Cohen, 2011; Lee ve Mooney, 2012). Hyaluronik asit, kollajen, kitosan ve aljinatın yanısıra ksantan, agar-agaroz, selüloz, nişasta ve dekstran gibi doğal materyallerden üretilen doku iskelelerinin de doku mühendisliği alanında çeşitli uygulamaları bulunmaktadır.

1.10.3.2. Sentetik İskeleler

Sentetik malzemelere polimerler, seramik ve camlar ile biyoaktif camlar örnek gösterilebilir.

1.10.3.3. Polimerler

Emilebilir polimerlerin başlıcaları poliglikolik asit (PGA), polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA), polidioksanon ve polilaktik-ko-glikolik asittir (PLGA). Emilebilen polimerler cerrahi iplik üretimi ve mesh üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Emilemeyen polimerlere ise politetrafloroetilen (PTFE), naylon ve polietilen tereftalat örnek gösterilebilir (Vats, Tolley, Polak ve Gough, 2003).

PLA, laktik asitten oluşur ve laktik asitin vakum altında direkt kondenzasyonu ile polimerize olmasıyla elde edilir (Garlotta, 2001). Biyouyumlu ve biyobozunur özelliklere sahip olan PLA, çeşitli metotlarla modifiye edilir (Chen, Mak, Wang, Li ve Wong, 2008). Yavaş bozunması, hidrofobik oluşu ve düşük dayanıklılığı bazı dezavantajlarındandır (Bergsma, De Bruijn, Rozema, Bos ve Boering, 1995; Burg vd., 1999; Rasal ve Hirt, 2009). Kemik, kırık, sinir ve idrar kesesi rejenerasyonunda kullanımı mevcuttur (Soleimani vd., 2012; Izal vd., 2013; Abdalhay, Sheikh ve Lim, 2013; Pertici vd., 2014).

Doku mühendisliği uygulamalarında yaygın kullanımı olan PCL bir laktonun halka açma polimerizasyonu veya hidroksikarboksilik asitin polikondenzasyonu yoluyla sentezlenen biyouyumlu, biyobozunur ve uygun mekanik güce sahip bir biyomateryaldir (Srinivasa Reddy, Reddy Venugopal, Ramakrishna ve Zussman, 2014; Kim vd., 2015). Çeşitli modifikasyonlarla sertliği iyileştirilerek kullanılmaktadır. Böylece osteoblastlar, kardiyomyositler ve nöronlar gibi hücrelere yapısal destek ve hücre tutunması açısından uygun ortam sağlar (Bakhshandeh, Soleimani, Ghaemi ve Shabani, 2011; Srinivasa Reddy vd., 2014).

PGA, halka açma polimerizasyonu veya polikondenzasyon ile sentezlenen alifatik polyesterdir. Düşük toksisitesi ve biyouyumluluğu nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmektedir (Xue vd., 2012; Bernardini, Chellini, Frediani, Spreafico ve Santucci, 2015). %45-55 kristalize yapıda olan PGA, suda çözünmez ancak ester bağlarından ötürü biyobozunur bir özellik gösterir (Wang, 2013).

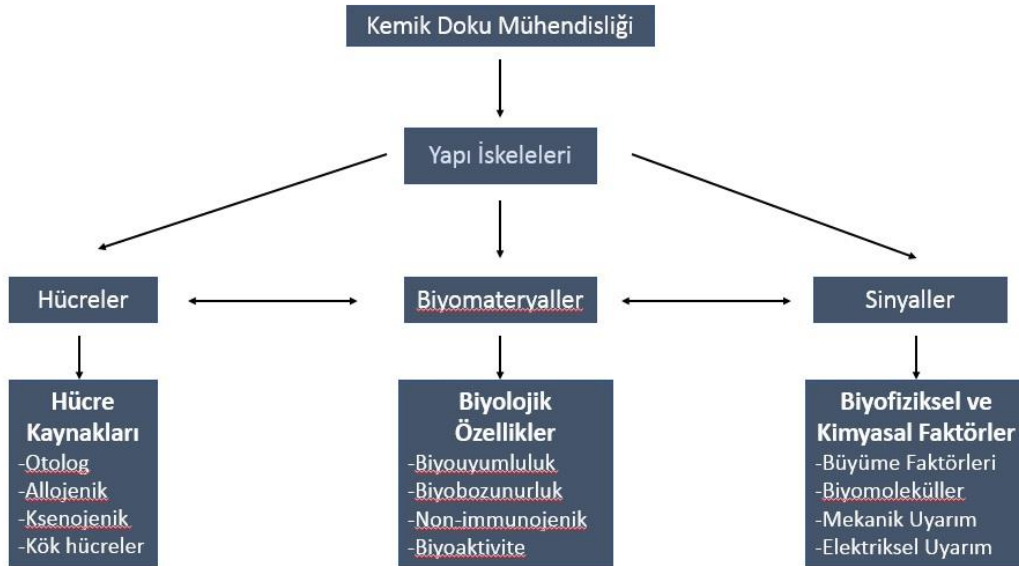
Glikolik asit ve laktik asit monomerlerinin halka açma polimerizasyonu ve kopolimerizasyonu ile sentezlenen PLGA, biyobozunur ve biyouyumlu özelliklerinden ötürü doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Qian, Wohl, Crow, Macosko ve Hoyer, 2011; Yu vd., 2014; Yin vd., 2015). FDA onaylı bir kopolimer olan PLGA boşluklu organlar için iyi bir yapı iskelesidir. Ayrıca kırıkta, kemik ve kardiyak doku rejenerasyonlarında kullanım alanı vardır (Horst vd., 2013; Yu vd., 2014; Yin vd., 2015).

Sentetik iskeleler içerisinde polimerler ile biyoseramikler, biyoaktif camlar ve kompozit malzemeler de bulunmaktadır. Polimerler dışındaki malzemelerle ilgili bilgilere kemik greftleri bölümünde yer verilmiştir.

1.10.4. Kemik Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp yaklaşımı doku veya organ hasarlarında form ve fonksiyonun restorasyonuna odaklanarak yeni doku oluşumunu amaçlayan uygulamaları kapsar. Tıbbi gelişmelerdeki ilerlemelere bağlı olarak yaşam kalitesinde beklentilerin artması ve uzayan insan ömrü beraberinde bazı zorlukları gündeme getirmiştir. İlerleyen yaşa bağlı olarak bazı hastalıkların ortaya çıkmasıyla yaşam kalitesinde önemli azalmalar görülmektedir (Shrivats, McDermott ve Hollinger, 2014; Black vd., 2015). Travma, yaralanma, malformasyonlar, tümörler, çeşitli hastalıklar ve ilerleyen yaşa bağlı olarak iskelet dokusundaki kayıplar ve fonksiyon bozuklukları sosyo-ekonomik sorunların yanısıra önemli derecede morbiditeye neden olur. Hasta portföyünün değişmesi, hasta beklentilerinin artması ve klinik senaryolardaki artan karmaşıklık, yeni ve daha güvenilir rejenerasyon stratejilerinin geliştirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur (Shrivats vd., 2014; Black vd., 2015). Bu anlamda kemik doku mühendisliği uygulamaları son yıllarda öne çıkmaktadır. Kemik doku mühendisliği uygulamaları, kemik dokunun iyileşme sürecindeki biyolojik performans standartlarını sağlamak için hücreleri, sinyal moleküllerini (büyüme faktörleri) ve yapı iskelelerini bir araya getirerek (Şekil 1.10.)

daha güvenilir yeni kemik oluşumunu sağlar (Shrivats vd., 2014; Black vd., 2015) ve böylece yaşam kalitesini artırır. Ancak burada kemik doku mühendisliğinin temel enstrümanlarından olan hücre, sinyal molekülü ve yapı iskelesi üçlüsüyle ilgili cevaplanması gereken önemli sorular vardır. Bu soruları şöyle sıralayabiliriz: 1) Uygun tedavi için hangi hücre, büyüme faktörü ve matriks gereklidir, 2) kullanılan hücrelerin veya büyüme faktörlerinin terapötik ve fizyolojik dozları ne olmalı, 3) doku rejenerasyonu için gerekli üç bileşenin birbiri içerisindeki dağılımı zamansal veya uzaysal olarak nasıl olmalı, 4) her klinik uygulamanın hastaya özgü benzersiz bir tasarım kriteri var mı? Tüm bu sorulara ancak multidisipliner bir yaklaşımla cevap bulunabilir ve bu sayede kırık onarımının fizyolojik sürecine katkı sağlayacak gereksinimlerin doğru koordinasyonu sağlanabilir (Shrivats vd., 2014).



Şekil 1.10. Kemik doku mühendisliğinin enstrümanları.

Şekil 1.10. Nayak, Manivasagam ve Sen'den (2018) uyarlanmıştır.

Kemik doku mühendisliği stratejisinde rejenerasyon ve reperasyon amacıyla hücreler ve büyüme faktörleri gibi biyolojik bileşenler ile yapı iskelelerinin kullanımına yer verilmektedir. Ancak biyolojik bileşenleri içeren biyomateriyal sistemleri potansiyel olarak değerli olsa da klinik uygulamadaki zorluklar ve yüksek maliyet bu bileşenlerin kullanımını sınırlayıcı faktörlerdendir. Bu nedenle kemik doku mühendisliği uygulamaları daha çok materyal yaklaşımını tercih eder (Atala, Kasper ve Mikos, 2012; Hunter ve Sherman, 2017). Bu amaçla polimerler, seramikler,

kompozit malzemeler, membranlar ve 3 boyutlu iskeleler gibi çeşitli formlarda biyomateryaller kullanılır. Genel olarak biyomateryallerden beklenti mekanik destek sağlamak ve hücre tutunmasına, çoğalmasına ve farklılaşmasına uygun ortam sağlayarak doğal ekstrasellüler matriksi benzeri bir ortam oluşturmaktır. Bu nedenle kemik doku mühendisliği ekstrasellüler matriksi taklit eden ve mekanik destek sağlayan bir biyomateryal kullanılarak vücudun kendi hücrelerinin rejenerasyon ve reperasyon sürecine dahil olduğu materyal yaklaşımından istifade eder (Burdick, Mauck, Gorman III ve Gorman, 2013; Wang vd., 2017; Wang vd., 2018; Kim, Smoak, Melchiorri ve Mikos, 2019).

1.10.5. Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomateryaller

Kemik doku mühendisliğinde çok çeşitli malzemeler ve bunların kombinasyonları kullanılmaktadır. Malzeme seçiminde uygulama yolu, uygulanan bölge ve üretim şekli gibi kriterler önem taşır. Kullanılan biyomateryallere bakıldığında en yaygın olarak polimerlerin, biyoseramiklerin ve kompozitlerin yer aldığı görülmektedir (Koons, Diba ve Mikos, 2020).

1.10.5.1. Polimerler

Organik veya sentetik olarak elde edilebilen polimerler kovalent bağlı uzun atom zincirlerinden oluşan maddelerdir (Bittner, Guo, Melchiorri ve Mikos, 2018). Doğal polimerler kemik doku mineralizasyonu için uygun ortam sağlayacak kapasitededir. Ancak, mekanik mukavemetinin zayıflığı ve bu özelliğinin iyileştirilmesi için sınırlı seçenek bulunması, canlı kaynaklardan elde edildiğinden işlenmesi gerekliliği ve kompozisyonlarındaki değişkenliğe bağlı olarak ticarileştirilebilme potansiyelinin nispeten sınırlanması gibi dezavantajları vardır (Atala vd., 2012; Feng vd., 2016; Loessner vd., 2016). Doğal polimerlere kollajen, aljinat, kitosan ve hyaluronik asit gibi maddeler örnek gösterilebilir. Kollajen doğal kemiğin ekstrasellüler matriksinin ana bileşenlerinden biridir ve hücre tutunması için arjinin-glisin-aspartik asitten oluşan (RGD) yapışma ligandı içerir (Neffe vd., 2015; Sarker vd., 2017). Biyoyumlu ve biyobozunur olan kollajen kemik doku mühendisliğinde ihtiyaca göre çeşitli modifikasyon işlemlerinden geçirilerek kullanım alanı bulmaktadır (Chang ve Buehler, 2014). Alglerden üretilen doğal bir polimer olan aljinatta hücre bağlanmasını destekleyen RGD ligandı içerir ve çeşitli kimyasallarla ve çapraz

bağlayıcılarla modifiye edilerek kemik rejenerasyonunda tek başına veya kompozit olarak kullanılmaktadır (Luo vd., 2018; Lueckgen vd., 2019).

Doğal polimerlere göre kimyasal ve moleküler modifikasyon açısından daha fazla olanak sağlayan sentetik polimerler, özel gereksinimlere göre üretilebilme potansiyeli taşıdığından kemik doku mühendisliğinde kullanım alanı olan biyomateryallerdendir. Bunlara örnek olarak PGA, PLA, PCL, PLGA, poli-etilen glikol (PEG) gibi sentetik polimerler gösterilebilir. Farklı kimyasal maddeler ve çapraz bağlayıcılarla modifiye edilerek, yapılarına çeşitli ligandlar (RGD gibi) eklenerek biyouyumluluğu, biyobozunurluğu ve mekanik mukavemeti kontrol edilebildiğinden kullanım açısından doğal polimerlere göre avantaj sağlarlar (Li vd., 2019; Koons vd., 2020).

1.10.5.2. Biyoseramikler

Biyoseramikler kemik doku mühendisliğinde önemli bir yere sahip olan inorganik biyomateryallerdir. Bu malzemeler kristal, cam veya kısmen kristal formunda bulunabilirler (Vallet-Regí ve Ruiz-Hernández, 2011). Bir biyoseramik yapı iskelesi *in vivo* uygulandığında çevreleyen kemik dokuyla doğrudan bağ kurabiliyorsa biyoaktif, bağ oluşturmıyorsa inert olarak kabul edilir (Vallet-Regí ve Ruiz-Hernández, 2011). Biyoseramiklerin rezorpsiyonuna bağlı olarak ortaya çıkan Ca, Mg, Si gibi biyolojik olarak aktif iyonların osteogenez ve agjiyogenez gibi kemik rejenerasyonu için önemli olan biyolojik süreçlere sağladığı katkı biyoseramiklere olan ilgiyi arttırmaktadır (Chen vd., 2019). Kalsiyum fosfat, kalsiyum sülfat ve biyoaktif camlar biyoseramiklerin önemlilerindendir.

1.10.6. Kemik Greftleri

Kemik homeostazı ve kırık iyileşmesi için canlı kemik hücreleri (osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositler), stabilite, yeterli vaskülarizasyon, büyüme faktörleri ve matriks gereklidir. Bu faktörlerin biri veya birkaçının yetersiz olması durumunda kemik onarım sürecinin desteklenmesi gerekir. Kemik iyileşmesini ve onarımını desteklemek için kemik greftleri sıklıkla kullanılmaktadır (Fillingham ve Jacobs, 2016). Travmatik yaralanmaların sebep olduğu kırıklarda, kırık hattında iyileşmenin gecikmesi, iyileşmenin olmaması veya yanlış kaynama gibi komplikasyonlarda veya

travma dışı şekillenen tümör rezeksiyonu veya osteolize bağlı olarak gelişen kemik defektlerini doldurmak için kemik greftleri kullanılır (Fillingham ve Jacobs, 2016).

İdeal kemik greftinin biyolojik ve mekanik bazı özelliklere sahip olması gerekir. Kemik greftlerinin bu özellikleri osteoindüktivite, osteokondüktivite, osteogenez ve yapısal destek olması bakımından büyük öneme sahiptir. Kemik greftlerinde öncelikle yeni ve sağlıklı doku oluşumunu destekleyen gözenekli bir yapı esastır. Yeterli gözenek boyutu gerek hücre tutunması ve değişimi için gerekse besin maddeleri ve atık maddelerin kemik grefti boyunca difüzyonuna izin vermesi bakımından önem taşır (Huiskes, Ruimerman, Van Lenthe ve Janssen, 2000). Minimum gözenek boyutu yaklaşık 100 µm olmalı (Karageorgiou ve Kaplan, 2005) ancak vaskülarizasyona ve yeni kemik oluşumuna izin vermesi bakımından por boyutunun 300 µm'den büyük olması önerilmektedir (Murphy, Haugh ve O'brien, 2010; Saito vd., 2012). İdeal bir kemik greftinin taşıması gereken özelliklerden biri de damar büyümesine, kemik hücrelerinin tutunmasına, proliferasyonuna ve migrasyonuna izin veren bir yüzey özelliği taşımasıdır. Bunlarla birlikte kemik greftlerinin kullanımı esnasında çevredeki yumuşak ve sert dokulardan gelecek basınç kuvvetlerini absorbe edecek mekanik dayanıklılığa ve elastikiyete sahip olması beklenir. Ayrıca kontrollü biyobozunurluk ve hastaya adaptasyonu sağlamak için yeterli boyutsal stabiliteye sahip olması ideal kemik greftlerinin taşıması gereken özelliklerdendir (Haugen, Lyngstadaas, Rossi ve Perale, 2019).

Kemik greftlerinin ve kemik grefti ikamelerinin biyolojik özellikleri çoğu zaman osteoindüktivite, osteokondüktivite ve osteojenisite terimleri kullanılarak tanımlanır (Calori, Mazza, Colombo ve Ripamonti, 2011). Osteokondüktivite bir yapı iskelesinin üç boyutlu yapısı nedeniyle yeni filizlenen damarların ve yeni kemik hücrelerinin kolonizasyonuna ve büyümesine izin verdiği pasif bir süreçtir. Bir yapı iskelesinin osteokondüktif kabiliyetini gözeneklilik özelliği, hücre tutunmasını ve büyümesini destekleyen fiziksel ve kimyasal özellikleri belirler (Khan vd., 2005; McKee, 2006; Roberts ve Rosenbaum, 2012).

Osteoindüktivite terimi ilk olarak BMP'nin keşfedilmesiyle tanımlanmıştır (Urist, 1965). Bir greftin kemik oluşumunu aktif olarak uyarma veya teşvik etme yeteneği olan osteoindüktivite, konak mezenkimal kök hücrelerinin kondroblastlara ve

osteoblastlara toplanması, çoğalması ve farklılaşması süreci olarak tanımlanır (Khan vd., 2005; Roberts ve Rosenbaum, 2012).

Osteojenisite kemik grefti içerisinde kemik oluşumundan sorumlu hücrelerin varlığı ile ilgili bir terimdir (Giannoudis vd., 2005). Bir kemik greftinin osteojenisite özelliğine sahip olması için canlı mezenkimal kök hücreler, osteoblastlar ve osteositleri taşıması gerekir. Ayrıca tek başına hücre varlığı yeterli olmayıp çeşitli büyüme ve farklılaşma faktörleri ile ideal matriks özelliklerinin de osteojenik greftlerde bulunması beklenir (Khan vd., 2005; Kwong ve Harris, 2008).

Kemik greflerinin birçok formu bulunur ancak genellikle otogreft, allogreft ve kemik grefti ikameleri olmak üzere 3 grup altında sınıflandırılmaktadır.

1.10.6.1. Otogreftler

Otojen kemik grefti immünolojik olarak tam doku uyumuna sahip, osteoindüktivite, osteokondüktivite ve osteojenite özelliklerinin tümünü taşıdığından kemik iyileşmesinin desteklenmesinde referans olarak kabul edilmektedir (Fillingham, Lenart ve Gitelis, 2012). Mevcut otolog kemik greftleri arasında trabeküler, vaskülarize kortikal, non-vaskülarize kortikal ve otolog kemik iliği gibi çeşitleri vardır (Finkemeier, 2002). Başarı oranının yüksek olması, düşük kontaminasyon riski ve doku uyumluluğu önemli avantajları olmakla birlikte, sınırlı miktarı, hasat sürecindeki perioperatif ve postoperatif komplikasyonlar ve morbidite, uzun süreli cerrahi işlem ve buna bağlı enfeksiyon riski ve hasat maliyeti gibi dezavantajları vardır (Goulet, Senunas, DeSilva ve Greenfield, 1997; Gupta, 2001).

1.10.6.2. Allogreftler

Allojenik kemik greftleri bir bireyden alınan ve aynı türün genetik olarak farklı bir bireyine nakledilen kemik dokusunu ifade eder (Goldberg ve Akhavan, 2005; Roberts ve Rosenbaum, 2012). Demineralize kemik matriksleri, süngerimsi, kompakt-süngerimsi kemik ve kompakt kemik greftleri ile osteo-kondral ve tam segmental kemik grefti dahil olmak üzere farklı formları mevcuttur (Finkemeier, 2002). Allojenik kemik greftleri fazla miktarda elde edilebilmeleri, donör alan morbiditesi ve artan operasyon süresi ile ilişkili olmamaları ve nispeten ucuz olmaları gibi avantajlara sahiptir (Finkemeier, 2002; Roberts ve Rosenbaum, 2012). Ancak immunreaksiyona neden olmaları ve kontaminasyon riski ise

dezavantajlarındandır (Wheeler ve Enneking, 2005). Allojenik greftler osteokondüktif özellik taşırlar. Ancak elde edilirken uygulanan çeşitli işlemler sonucunda hücrelerini kaybederler ve genellikle sterilize edilerek kullanılırlar. Bu durum ise osteoindüktif özelliğinin azalmasına yol açar (Wheeler ve Enneking, 2005; Delloye, Cornu, Druez ve Barbier, 2007).

1.10.6.3. Sentetik Kemik Grefti İkameleri

Sentetik kemik grefti ikame malzemeleri doğal kemiğin mineral içeriğine benzer bir içeriğe sahip mineral yapılardır. Kalsiyum sülfat ve kalsiyum fosfat seramikler (hidroksiapatit, koralin hidroksapatit, trikalsiyum fosfat, bifazik kalsiyum fosfat gibi), biyoaktif camlar ve bu malzemelerin kombinasyonlarıyla hazırlanan biyoseramik kompozitler en yaygın sentetik kemik grefti ikameleridir. Bu yapılar doğal kemiğin inorganik bileşimine benzerlik gösterdiğinden özel ilgi görmektedirler (LeGeros, 2002; Yang, Lin, Zhang ve Gou, 2013). Genellikle yüksek sıcaklıkta sinterleme denilen işlemle kristal yapılu metal olmayan inorganik maddelerden üretilirler. Sentetik kemik ikamelerinin çoğu sert ve gözenekli bir yapıya sahiptir, ancak kırılgan özellik gösterirler. Bu nedenle genellikle osteokondüktif özellikli olarak tanımlanırlar (LeGeros, 2002).

Kalsiyum fosfat greftleri klinik kullanıma 1980'lerden itibaren girmiştir (Patka, 1984). Günümüzde ise trikalsiyum fosfat (TCP), hidroksiapatit ve bifazik kalsiyum fosfat gibi çeşitli kalsiyum fosfat greftleri mevcuttur (Calori vd., 2011). Yapısal özelliklerine göre çimento veya seramik formları bulunan kalsiyum fosfatların osteokondüktif olduğu kabul edilir. Seramik veya çimento formlarını üretim tekniği belirler. Eğer kalsiyum fosfattan ısıtma işlemin ardından soğutma ile inorganik katı fazda bir madde elde ediliyorsa buna seramik denir. Seramik üretimindeki ısıtma işlemine sinterleme denir. Sinterleme işlemiyle uçucu kimyasal bileşenler ortadan kaldırılarak kristalleşme boyutu arttırılır ve böylece gözenekli yapıda katı bir malzeme üretilir. Çimentolar ise uygulama yerinde çökeltme veya ekzotermik reaksiyonlar sonucu sertleşen, macun kıvamındaki kalsiyum fosfat karışımıdır. Sınırlı gözeneklilik ve gözenek boyutuyla karakterize sert bir yapısı olan kalsiyum fosfat çimentolar katı bir yapıya sahiptir (Bohner, 2001). Bu malzemelerin osteokondüktivitesini gözenekliliği, por boyutu ve degradasyon potansiyelleri belirler. Yeni kemik oluşumu için gerekli ideal gözenek boyutu 150-500µm arasında

olmalıdır (Daculsi ve Passuti, 1990; Blokhuis vd., 2000). HA ve TCP seramikleri yeni kemik oluşumunu kolaylaştıracak makro gözenekliliğe sahiptir (Calori vd., 2011). Kalsiyum fosfatlar kırılabilirler ve zayıf gerilme dirençlerinden ötürü genellikle sınırlı biyomekanik destek sağlarlar. Klinik kullanımda greftin yapısal, biyolojik ve biyomekanik özellikleri ön plana çıkmaktadır. Örneğin, HA'ya göre daha az kırılabilir olan TCP seramikleri, humerus, tibia, radius ve vertebral cerrahide küçük kemik defektlerini doldurmak için kullanılırken; HA daha büyük kemik defektlerinde kullanılmaktadır. Bahsedilen bu faydalarıyla birlikte implantasyon zorluğu, düzensiz boşlukları doldurmadaki yetersizlikleri, yeni oluşan kemiğin bu maddelerin yerine geçmesi için gereken sürenin uzun olması gibi kullanımı açısından bazı sınırlayıcı durumlar da vardır (Blom vd., 2009; McNamara, Deshpande ve Porteous, 2010).

Kalsiyum sülfatın 3 yaygın formu bulunur. Bunlar dihidrat veya alçıtaşı, hemihidrat veya bazanit ve anhidrit formlarıdır. Biyobozunur ve biyouyumlu bir malzeme olan kalsiyum sülfat vücuda implante edildiğinde degradasyon sürecinin yan ürünleri vücut için zararlı değildir (Thomas ve Puleo, 2009; Shen vd., 2014). Hemihidrat formu 3 boyutlu yapıların üretiminde sıklıkla kullanılan formudur. Üç boyutlu yapısı sayesinde osteokondüktif bir özellik sergileyen kalsiyum sülfatın 6-12 hafta içinde tamamen absorbe olduğu bilinmektedir (Peters, Hines, Bachus, Craig ve Bloebaum, 2006). Genellikle tümör rezeksiyon cerrahisinden sonra, kemik defektlerinin doldurulmasında kullanılır. Fakat geniş doku kayıplı defektlerin tedavisi için kullanıldığında degradasyon hızının yüksek olması nedeniyle yeterli biyomekanik destek ve osteokondüktivite sağlamaz (Urban vd., 2004; Yu vd., 2009; Beuerlein ve McKee, 2010). Bu nedenle bir kemik grefti ikamesi olarak kalsiyum sülfatın çeşitli fiziksel veya kimyasal modifikasyonlarla degradasyon hızının geciktirilerek kullanılması sağlayacağı fayda açısından önem taşımaktadır (Huan ve Chang, 2007; Hing, Wilson ve Buckland, 2007).

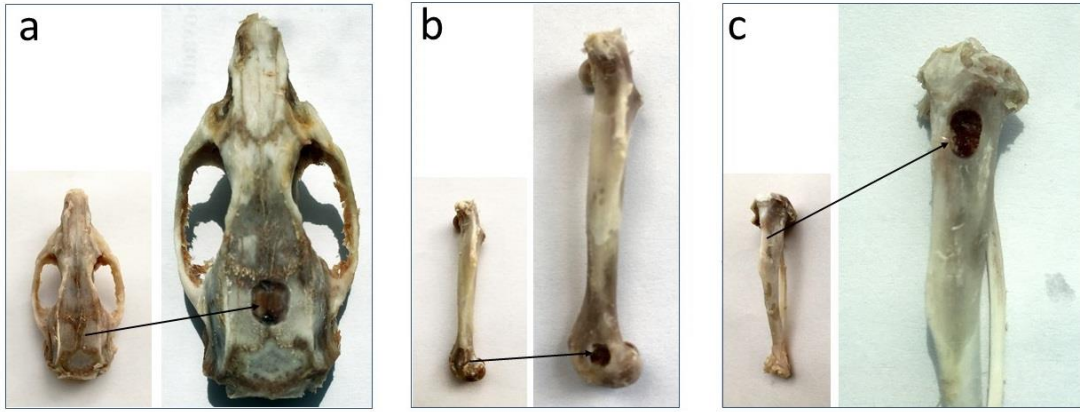
Biyoaktif camlar çeşitli oranlarda sodyum oksit, kalsiyum oksit, silikon dioksit ve fosfordan oluşan sert ve katı bir malzemedir. İlk olarak 1969 yılında Larry Hench tarafından geliştirilmiştir (Hench, Splinter, Allen ve Greenlee, 1971). Farklı tekniklerle (eriyik söndürme, sol-jel metodu gibi) üretilen bioglass (Balamurugan vd., 2007; Kashif, Soliman, Sakr ve Ratep, 2012) canlı dokulara güçlü bir şekilde bağlanır ve degradasyon sürecinde doku rejenerasyonu ve anjiyogenez gibi biyolojik fonksiyonları uyarır (Hench, 2006; Jones, 2013). Biyoaktif camlar fizyolojik ortamda

konak dokusuyla temas ettiği yerde biyolojik olarak aktif bir hidroksiapatit tabakası oluşur (Cao ve Hench, 1996). Degredasyon sürecinde açığa çıkan silisyum, sodyum, kalsiyum ve fosfat gibi maddeler de hücreleri yeni doku üretimi için uyarır (Cao ve Hench, 1996). Biyoaktif camlar osteokondüktif özellik gösterirler, ancak düşük osteoindüktiviteye sahiptirler. Güçlü bağlanma özelliklerinden ötürü mekanik mukavemeti iyidir (Giannoudis vd., 2005).

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan yapı iskelelerinin başarısı için iskelelerin mekanik ve fiziksel özelliklerinin *in vivo* uygulanacağı ortama uygun kabiliyette olması gerekir. Biyoseramiklerin kırılabilirlik ve sertlik gibi özellikleri sert dokularda kullanımı esnasında zayıf mekanik destek sağlamasına, yumuşak dokularda kullanıldığında ise implant alanında yeterli uyumun sağlanamamasına yol açmaktadır (Miguez-Pacheco, Hench ve Boccaccini, 2015). Bu problemleri çözmek için biyoseramikler ile polimerlerin birlikte kullanılmasıyla üretilen kompozit yapı iskeleleri geliştirilmiştir. Böylece hem biyouyumluğun artırılması hem de mekanik özelliklerin güçlendirilmesi amaçlanmıştır (Mohamad Yunos, Bretcanu ve Boccaccini, 2008).

1.10.7. Kemik Doku Mühendisliğinde Hayvan Modelleri

Kemik defektleri travma, bazı malformasyonlar veya cerrahi girişimler nedeniyle (büyük boyutlu tümör rezeksiyonu) kemiğin bir kısmının hasar gördüğü, kayba uğradığı ve kendiliğinden iyileşmediğı için kemik grefti gibi ileri tekniklerle onarılması gereken durumlardır (McGovern, Griffin ve Hutmacher, 2018). Kemik doku mühendisliği yaklaşımında kemik grefti ikamesi olarak çok çeşitli materyal vardır. Yeni üretilen ve kemik defektlerinin tedavisinde umut vadeden bir materyalin klinik başarısını değerlendirmek için birçok hayvan modeli kullanılmaktadır. Ancak genel olarak kalvaryal defekt, uzun kemik defekti veya segmental defekt, kısmi kortikal defekt ve süngerimsi kemik defekti olmak üzere 4 tip defekt vardır (Bigham-Sadegh ve Oryan, 2015). Bunların içerisinde en yaygın kullanılanları segmental ve kalvaryal kemik defektleridir (Bigham-Sadegh ve Oryan, 2015) (Şekil 1.11.). Kemik defektleri bölgeye ve modele göre değişen boyutlarda kritik boyutlu kemik defektleri (KBD) olarak tasarlanmaktadır.



Şekil 1.11. Yaygın kullanılan kemik defekt modelleri.

‘a’ sıçanda kalvaryal defekt modeli; ‘b’ sıçanda femoral distal kondiler defekt modeli; ‘c’ sıçanda tibial unikortikal defekt modeli.

1.10.7.1. Kalvaryal Kemik Defekti

Kalvaryal kemik defekti modeli oldukça basit bir yöntem olup genellikle rodentlerde oluşturulur. Çünkü rodentlerde büyüme plakları yetişkinlik boyunca açık kaldığından iskelet remodeling süreci yaşam boyu devam eder (Gomes ve Fernandes, 2011). Kalvaryal defekt oluşturmak için kafa derisinde sagittal ensizyonu takiben deri ve derialtı dokular kaldırılarak kemik açığa çıkartılır (genellikle pariyetal kemik kullanılır). Salin irrigasyonu eşliğinde frez kullanılarak kemiğin tüm derinliği boyunca dairesel bir defekt oluşturulur. Kesilen kemik diski çıkarıldıktan sonra periost ve deri yeniden konumlandırılarak dikişlerle kapatılır (Nakamura vd., 2017). Herhangi bir kemik defekti oluşturulurken KBD olması açısından defektin boyutu oldukça önemlidir. Ratlarda en yaygın olarak KBD için 5mm’lik defektler tercih edilirken (Bosch, Melsen ve Vargervik, 1998), farelerde ise 4mm’lik (Ducheyne, Healy, Hutmacher, Grainger ve Kirkpatrick, 2011) defektler KBD olarak kabul edilmektedir. Ancak yapılan farklı çalışmalarda hem fare hem rat için hayvanın yaşının ve ırkının KBD’yi etkilediği görülmektedir (Gomes ve Fernandes, 2011).

Kalvaryal defet modeli radyolojik ve histolojik olarak standardize edilebildiği için araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir. Kalvaryal defekt modelinde biyomateryaller eksternal fiksatöre gerek kalmaksızın cerrahi prodesürle yerleştirilebilirler. Ayrıca hayvanların ucuz olması ve barındırmadaki kolaylık avantajları olarak sayılabilir. Avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajları vardır. Örneğin, yük taşıyan kemiklerin rejenerasyonunda kullanılacak bir biyomateryalin

performansının değerlendirilmesinde yetersiz kalırlar. Ayrıca birden fazla biyopsi veya kan örneğinin alınacağı uzun vadeli çalışmalarda doku ve kan hacminin küçük olması ve kısa ömürlü olmaları dezavantajlarındandır (Gomes ve Fernandes, 2011; McGovern vd., 2018).

1.10.7.2. Segmental Kemik Defekti

Kalvaryal defekt bazı durumlarda klinik senaryoyu çok iyi taklit edemeyebilir. Özellikle yük taşıyan kemiklerin değerlendirilmesinde yetersiz kalabilir. Bu nedenle klinik senaryoyu daha iyi temsil etmesi bakımından segmental defekt daha kullanışlıdır. Segmental defekt uzun kemiklerin diyafiz bölgesinde testere veya matkap kullanılarak KBD oluşturacak büyüklükteki bir segmentin belirlenen bölgeden osteotomi yaklaşımıyla uzaklaştırılması esasına dayanır (Reichert vd., 2010; Berner vd., 2013; Cipitria vd., 2013). Travmatik bir defekt modelleniyorsa kemik uçları düzensiz bırakılabilir (McGovern vd., 2018). Çeşitli hayvan türlerinde kritik boyutlu kemik defekti oluşturulabilir. KBD'nin boyutu hayvan türüne, defekt oluşturulacak bölgeye ve kemiğe göre değişiklik göstermektedir. Örneğin, uzunluğu 2cm'den fazla ve çevresinin %50'si kayba uğramış segmental defektler kritik boyutlu olarak tanımlanırken, başka bir tanımlada ise etkilenen kemik çapının 2-2.5 katını aşan uzunluktaki segmental defektlerin kritik boyutlu olduğu ifade edilmektedir (Lindsey vd., 2006; Gugala, Lindsey ve Gogolewski, 2007). Ayrıca yine çalışmalar göstermiştir ki KBD'nin oluşturulmasında defektin anatomik olarak yerleşimi ve hayvanın türü de oldukça etkilidir (Keating vd., 2005; Sanders vd., 2014).

1.11. Bioglass

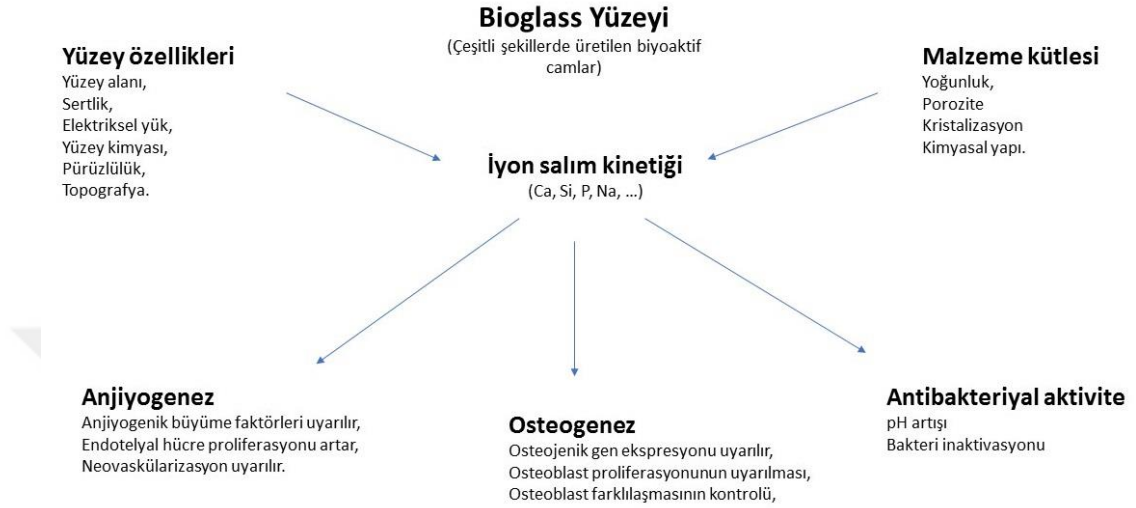
Önemli icatlar tarihsel olarak incelendiğinde çoğunlukla bir tesadüf üzerine keşfedildiği görülmektedir. Bioglass için durum tam olarak böyle olmasa da keşfedilmesi ilginç bir olaya dayanmaktadır. İlk biyoaktif cam Prof. Larry Hench tarafından 1969 yılında icat edildi. Prof. Hench, ABD'de malzeme araştırmaları ile ilgili konuşma yapacağı konferans için yolculuk yaptığı esnada ona Vietnam savaşıdan yeni dönmüş bir ABD ordusunda görevli sağlık sınıfından bir albay eşlik eder. Prof. Hench heyecanla albaya yaptıkları son çalışmaları anlatır. Konuşmanın konusu ise polimerik ve metal implantların fizyolojik ortamla temas ettiğinde

yabancı cisim reaksiyonu gösterdiğinden etrafının fibröz skar dokusuyla çevrilmesiydi. Prof. Hench'i sabırla dinledikten sonra albay şu soruyu sorar: "Yüksek enerjili radyasyona maruz kalmaya dayanabilen bir malzeme yapabiliyorsanız eğer, insan vücuduna maruz kalmaya dayanabilecek bir malzeme yapabilir misiniz?". Albayın bu büyüleyici sorusu üzerine Prof. Hench kemiğe bağlanabilecek bir malzeme bulma çalışmalarına başladı. Prof. Hench biyoaktif cam hipotezini şu iki temele dayandırdı: "İnsan vücudu metalik ve sentetik polimerik materyalleri skar dokusu oluşturarak reddeder; çünkü, canlı dokular bu gibi maddeleri içermeyiz. Kemik dokunun doğal yapısında hidroksiapatit olarak adlandırılan hidratlı bir kalsiyum bileşeni vardır. Eğer bir malzeme *in vivo* olarak hidroksiapatit oluşturabiliyorsa vücut tarafından reddedilmez" (Hench, 2006) hipotezine dayanarak yaptıkları çalışmalar sonucunda bioglass olarak bilinen biyomateryal keşfedildi.

Bioglass'ın yapısal olarak bileşimi %45 oranında SiO_2 , %24,5 oranında CaO , %24,5 oranında Na_2O ve %6 oranında P_2O_5 içermektedir. 45S5 olarak adlandırılan bu cam materyal daha sonra Bioglass adıyla ticari marka haline getirildi (Hench, 2006). Bioglass'ın ilk klinik kullanımı 1985'li yıllara dayanmasına rağmen üzerinden geçen bunca zamanda bioglass'ın daha biyoaktif bir formu bulunamamıştır (Jones, 2013). Tipik fiziksel ve mekanik özellikleri; mekanik mukavemeti 100-200 MPa, kırılma tokluğu $1.2-2.6 \text{ MPa m}^{1/2}$, sertliği 458 HV, yaklaşık yoğunluğu 2.45 g/cm^3 olarak bildirilmiştir (Goller, Demirkıran, Oktar ve Demirkıran, 2003).

Biyoaktivite denildiğinde bir malzemenin implante edildiği dokuda bazı biyolojik aktiviteleri indükleyebilme kabiliyeti akla gelmektedir (Tay, 2014). Kemik doku mühendisliği için özelleştirilecek olursa, vücut ortamında yüzeyinde kemik benzeri hidroksiapatit üretme yeteneği olduğu anlaşılır (Kokubo ve Takadama, 2006). Bioglass A sınıfı bir biyoaktif materyaldir ve bazı B sınıfı biyoaktif seramiklere göre önemli avantajları vardır. B sınıfı biyoaktif malzemeler hali hazırda farklılaşmış olan kemik hücrelerini kullanarak kemik büyümesine izin verirken (osteokondüksiyon), A sınıfı özelliği taşıyan bioglass ise osteokondüktif olmakla beraber farklılaşmamış hücreleri de uyardığından bu özellik osteoindüktivitesine atfedilir (Hench, 1998; Albrektsson ve Johansson, 2001). Bioglass'ın sayılan bu etkileri implantasyonu takiben hızlı bir hidroksiapatit yanıtı oluşturması ve degradasyonu sonucu açığa çıkan iyonların bazı genlerin ekspresyonunu yukarı regüle etmesi ve osteoblast

metabolizmasını uyarması yoluyla gerçekleşir. Genlerin yukarı regülasyonu ile VEGF, IGF ve FGF gibi büyüme faktörlerinin salgılanması uyarılarla osteogenez sürecine katkı sağlanır (Hench, 2009; Hoppe, Güldal ve Boccaccini, 2011) (Şekil 1.12.).



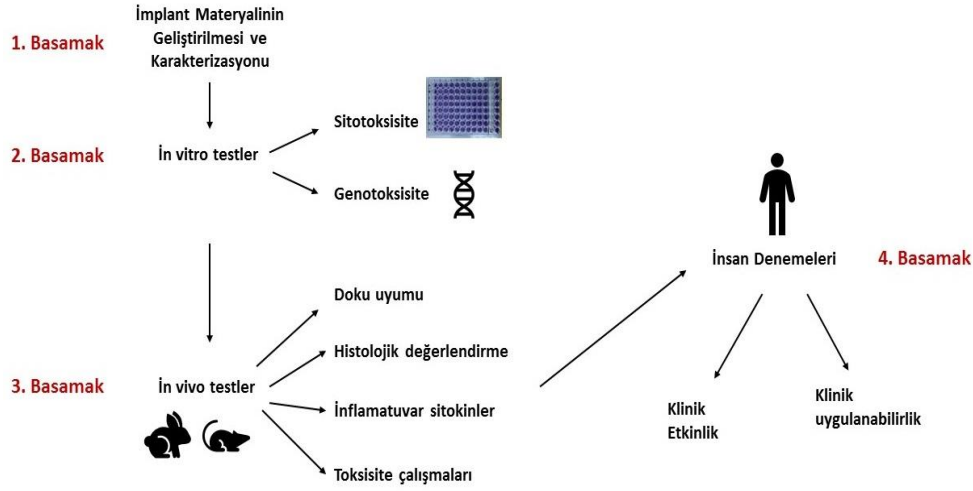
Şekil 1.12. Bioglass'ın iyonik çözünme ürünlerinin biyolojik etkileri.

Şekil 1.12., Hoppe vd., (2011)'den uyarlanmıştır.

Bioglass'ın keşfinden bu yana çok çeşitli uygulamalarla gerek biyoyumumluluğu gerekse çok yönlü olarak kullanılabilirliği farklı çalışmalarla gösterilerek hasta sağlığına ve refahına hizmet eden birçok klinik ürünün geliştirilmesi sağlanmıştır. Eldeki bu büyük bilgi birikiminin araştırmacıları bioglass ile ilgili yeni uygulamalar keşfetmeye teşvik etmesi kaçınılmazdır. Fakat bioglass ile ilgili yapılacak yeni çalışmalarda bilim insanlarının karşılaşması muhtemel bazı güncel sorunlar vardır. Bunlar; mekanik özelliklerin geliştirilmesi, güvenilir kaplama yöntemleri, yumuşak doku ve arayüzey doku mühendisliğinde uygulamalar, güvenilir *in vivo* ve *in vitro* test metodolojileri, terapotik iyonların kontrollü salınımı ve biyomoleküllerin kontrollü salınımı gibi özellikler olup karşılaşılması muhtemel zorluklar olarak çözüm bekleyecek konulardır (Baino, Hamzehlou ve Kargozar, 2018).

Yeni tasarlanan bir biyomateryalin değerlendirilmesi için *in vitro* ve *in vivo* bazı adımları takip etmek gerekir (Şekil 1.13.). Çünkü herhangi bir materyalin tasarımı, üretimi ve karakterizasyonunu takiben memeli hücreleri ve dokularıyla uyumluluğunun değerlendirilmesi gerekir (Baino vd., 2018). Bu değerlendirmeleri

yaparken de çeşitli kurum ve ajanslarca (FDA, ISO, ASTM, EMA gibi) geliştirilen test standartlarından faydalanılmaktadır (Coleman, Dai, Deng, Lakehal ve Tang, 2012). Bu geçerli prosedürler, protokoller ve standartlar kullanılarak yeni tasarlanan bir biyomateriyalin insan kullanımına başlanmadan önce değerlendirilmesi mümkün olmaktadır.



Şekil 1.13. Yeni geliştirilen biyomateriyallerin değerlendirilme aşamaları.

Şekil 1.13., Thrivikraman, Madras ve Basu, (2014)'den uyarlanmıştır.

1.12. Biyomalzeme Yüzey Modifikasyonu

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan biyomateriyaller ekstrasellüler matriksi taklit ederek 3 boyutlu bir yapı iskelesi oluştururlar. Bu özellikleriyle hücresel aktiviteleri destekledikleri gibi aynı zamanda çeşitli terapötik ajanların (ilaçlar, proteinler, büyüme faktörleri gibi) taşıma sistemi olarak da kullanılmaları biyomateriyallerin doku mühendisliği uygulamalarındaki önemli rolünü ortaya koymaktadır. Bir biyomateriyalin yığın (hacim) özellikleri herhangi bir organ veya doku için kullanıldığında malzeme uygunluğunu belirleyen bazı kriterleri göstermesi açısından oldukça önemlidir (Ratner, Hoffman, Schoen ve Lemons, 2004). Örneğin, bir biyomateriyalin mekanik kuvvetlere karşı mukavemet, gerilme direnci, elastikiyet gibi özellikleri genel olarak dokuya veya organa uyum açısından kritik öneme sahiptir. Ancak biyomateriyalin esas işlevini biyomateriyal yüzeyinin fiziksel ve kimyasal özellikleri belirler. Başka bir ifadeyle canlı dokunun biyomateriyale vereceği biyolojik tepkiyi belirleyen esas unsur biyomateriyalin yüzey özelliklerine

bağlıdır. Hücre adezyonu, proteinlerin tutunması veya aktivasyonu, biyomateriyale konak tarafından verilen immun yanıt gibi olaylar biyomateriyal-doku arayüzünde meydana gelir ve bu biyolojik olaylar biyomateriyal yüzeyinin fiziksel ve kimyasal özellikleri tarafından belirlenir. Bu nedenle biyomateriyallerin yığın (hacim) özellikleri değiştirilmeksizin yüzeylerinin modifikasyonu, biyoyumluluğunun artırılması için umut verici sonuçları olan bir yaklaşımdır (Anderson, 2001; Anderson, Rodriguez ve Chang, 2008). Bir biyomateriyalin yüzeyini değiştirmenin genel amacı sert doku veya yumuşak doku kullanımlarında istenilen biyolojik etkiyi gösterebilecek uygun fiziksel ve kimyasal ortamı sağlamaktır (Bose, Robertson ve Bandyopadhyay, 2018).

Biyomateriyallerin biyoyumluluğunun iyileştirilmesi ve performansının artırılması amacıyla çok sayıda yüzey modifikasyon tekniği geliştirilmiştir. Yüzey modifikasyonları genel olarak hücre tutunması, hücre çoğalması, hücre farklılaşması, osseointegrasyon, fibröz kapsülleme modülasyonu, aşınma veya korozyon direncinin geliştirilmesi ve elektriksel iletkenliğin artırılması gibi biyomateriyal yüzeyi ile konak dokusu arayüzünde gerçekleşecek biyolojik olayların regülasyonunu ve desteklenmesini amaçlayan uygulamaları içerir (Ratner vd., 2004). Genel olarak yüzey modifikasyonları fiziko-kimyasal modifikasyonlar ve yüzey kaplama olmak üzere iki başlık altında toplanır. Fiziko-kimyasal uygulamalara bakıldığında dağlama, cilalama, kum püskürtme, işleme, mekanik pürüzlendirme gibi biyomateriyalin kimyasal yapısında çok az veya hiçbir değişikliğe yol açmayan malzeme yüzeyinin topoğrafyasını ve morfolojisini değiştirmeyi amaçlayan fiziksel uygulamaları ve oksidasyon, indirgeme, silanizasyon, asetilasyon gibi malzeme yüzeyinin kimyasal karakterini (atomları, bileşikleri veya molekülleri) değiştirmeye yönelik kimyasal uygulamaları içermektedir (Roy, Bandyopadhyay ve Bose, 2011; Roy, Fielding, Beyenal, Bandyopadhyay ve Bose, 2012; Stallard, Solar, Biederman ve Dowling, 2016; Woodruff, 2016; Bandyopadhyay vd., 2017). Yüzey kaplama stratejisi ise biyomateriyali oluşturan temel malzemeden farklı bir malzemeyle kovalent ve non-kovalent kaplamalar, çeşitli biyolojik moleküllerin bağlanması ve ince film biriktirme teknikleriyle biyomateriyal yüzeyinin modifiye edilmesini amaç edinir.

Yüzey modifikasyonu uygulamalarında genellikle amaca uygun bir yöntem tercih edilir. Herhangi bir özel gereksinimi karşılamak üzere yapılan yüzey modifikasyonu

uygulamalarında genellikle ince katman yüzey modifikasyonları uygulanır. Çünkü, daha kalın kaplamalar biyomateriyalin mekanik ve fonksiyonel özelliklerini etkileyebilir. İdeal olarak yüzey modifikasyonunun kalınlığı 10-15 Angström (Å) ile sınırlı olması gerektiği belirtilse de uygulamalar daha çok 10-100 nm'lik bir skalada değişmektedir (Agarwal ve García, 2019). Bu durumun sebebi ise birörnek, dayanıklı ve işlevsel yüzey kaplamalarının ideal ölçülerde yeterince elde edilememesidir. Modifiye edilmiş bir yüzeyin stabilitesi biyolojik performans için oldukça önemlidir. Çünkü modifiye yüzeyin stabilitesi hem mekanik mukavemetin hem de biyolojik ortamlar gibi agresif kimyasal ortamlara dayanıklılığın göstergesidir (Agarwal ve García, 2019).

Kimyasal modifikasyonun temelinde biyomateriyalin yüzey enerjisinin, yükünün ve bileşiminin değiştirilmesi vardır. Bu amaçla sol-jel metodu, iyon bombardımanı, asit-alkali ile işlem ve organik grupların kovalent bağlarla immobilizasyonu gibi teknikler kullanılmaktadır (Ye, Zhou ve Liu, 2011; Treccani, Klein, Meder, Pardun ve Rezwan, 2013). Örneğin, kovalent immobilizasyon yoluyla çeşitli çapraz bağlayıcılar kullanılarak biyomateriyal yüzeyine proteinlerin güçlü bir şekilde bağlanması sağlanır. Bu güçlü bağlanma ise protein yan zincirlerinde bulunan aminler, karboksilatlar ve hidroksiller gibi fonksiyonel kısımlar aracılığıyla olur. Ancak yüzey modifikasyonu için kullanılan çeşitli çapraz bağlayıcıların (sılanlar, merkaptanlar, kateşol gibi) modifikasyon sonrası toksisitesi biyoyumluluğun değerlendirilmesi açısından oldukça önemlidir (Yewle, Wei, Puleo, Daunert ve Bachas, 2012; Lee, Loo ve Rohanizadeh, 2014).

Fiziksel modifikasyon uygulamaları genellikle yüzey topoğrafyasını değiştirmeye yönelik uygulamaları içerir (Agarwal ve García, 2019). Bir biyomateriyalin yüzey topoğrafyasının boyut ve şekil açısından özellikleri, konak hücrelerin biyomateriyale olan davranışını etkiler. Örneğin; yüzey makro ve mikro yapısı hücre adezyonunu, dağılımını ve farklılaşmasını etkileyerek konak hücrelerinin fenotipik aktivitelerini düzenleyebilir (Curtis ve Wilkinson, 1998; Flemming, Murphy, Abrams, Goodman ve Nealey, 1999). Ayrıca biyomateriyallerin in vivo uygulamaları esnasında konağın vereceği çeşitli yanıtların (gözenekliliğin kemik oluşumuna katkısı, fibröz kapsülasyon yanıtı, yumuşak doku büyümesi gibi) düzenlenmesine de katkı sağlar (Brauker vd., 1995; Chehroudi ve Brunette, 2002). Yüzey topoğrafyasını değiştirmek

amacıyla kumlama, plazma püskürtme, kimyasal aşındırma, mekanik cilalama ve iyon aşındırma gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır (Agarwal ve García, 2019).

1.13. Yüzeylerin Biyolojik Modifikasyonu

Hücre reseptör ligandları, enzimler, büyüme faktörleri, antikorlar, farmakolojik ajanlar, lipidler ve nükleik asitler gibi çok çeşitli biyomoleküller biyomateryallerin yüzey modifikasyonlarında kullanılarak gerek terapötik gerek diyagnostik açıdan doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır. Sentetik ve biyolojik bileşenlerin birlikte kullanımı esasına dayanan bu sistemin amacı biyofonksiyonelliği arttırarak istenen biyolojik tepkileri ortaya çıkarmaktır (Agarwal ve García, 2019). Bu uygulamaya yaygın kullanımı olduğundan fibronektin ve laminin gibi proteinlerin veya RGD gibi sentetik hücre adezyon ligandının sentetik veya doğal bir biyomateryalin yüzeyine immobilizasyonu örnek olarak gösterilebilir (Lutolf ve Hubbell, 2005; Agarwal ve García, 2019).

Biyomolekülleri biyomateryal yüzeyine tutundurmak amacıyla fiziksel adsorpsiyon, fiziksel tutuklama (entrapment) ve kovalent immobilizasyon gibi teknikler kullanılmaktadır. Proteinlerin, nükleik asitlerin ve polisakkaritlerin pasif olarak fiziksel adsorpsiyonu basit ancak etkili bir yöntemdir. Fiziksel adsorpsiyon hidrofobik ve elektrostatik etkileşimleri, Van Der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağlarını içeren karmaşık bir süreçtir (Ratner vd., 2004). Örneğin, ekstrasellüler matriks proteinleri ile biyomateryallerin kaplanması fiziksel adsorpsiyonun yaygın kullanımlarındandır (Agarwal ve García, 2019).

Fiziksel tutuklama sistemleri biyomoleküllerin bir iskele sistemi içerisinde taşınmasını ve kullanılabilirliğini düzenlemek üzere tasarlanan sistemleri tanımlar. Enkapsülasyon ve dispersiyon gibi tekniklerle biyomoleküllerin dağılım kinetikleri, bozunma hızları ve stabiliteleri düzenlenir (Agarwal ve García, 2019).

Biyomoleküller ile biyomateryaller arasındaki fonksiyonel grupların etkileşimleri ile gerçekleşen kovalent immobilizasyon çok çeşitli uygulamaları içerir. Kovalent immobilizasyon biyomolekülleri biyomateryaller üzerine immobilize etmek veya çapraz bağlamak için katı veya sıvı çeşitli çapraz bağlayıcıların kullanıldığı bir tekniktir (Ratner vd., 2004; McKay ve Finn, 2014).

1.13.1. Amino Asitlerle Yüzey Modifikasyonu

Amino asitler amfoterik yapıya sahip önemli biyolojik bileşiklerdir. Her amino asitte kendine özgü fonksiyonel gruplar ve yan zincirler vardır. Bu gruplar karboksil ve amino grupları olarak bilinir. Amino asitler nötral sulu çözeltilere koyulduğunda karboksil grubu bir protonunu kaybederek negatif yüklenir, amino grubu ise bir elektron kaybederek pozitif yüklenir. Amino asitlerin bu fonksiyonel grupları ve yan zincirlerinden ötürü her bir amino asit farklı izoelektrik nokta'ya (pI) sahiptir. Farklı pI değerleri ise amino asitlerin yüzey yüklerindeki değişkenliğin sorumlusudur. Asidik veya bazik aminoasitlerin biyomateryal yüzeyine immobilizasyonunu sağlamak amacıyla ortamın pH'sı ayarlanarak amino asit-biyomateryal yüzeyi arasındaki elektrostatik çekim modüle edilebilir (Uddin vd., 2010; Lee, Loo, Van, Zavgorodniy ve Rohanizadeh, 2012; Lee, Loo, Zavgorodniy ve Rohanizadeh, 2013).

Amino asitler biyobozunur, biyouyumlu, düşük maliyetli ve non-toksik biyolojik bileşiklerdir. Amino asitler için çözücü olarak non-toksik ve ucuz bir çözücü olan su kullanılmaktadır. Bu özellikleriyle amino asitler doku mühendisliği uygulamalarında yüzey modifikasyonu için elverişli hale gelirler (Mallakpour ve Dinari, 2011; Mallakpour, Dinari ve Behranvand, 2013; Mallakpour ve Aalizadeh, 2013). Biyomateryal-konak arayüzü etkileşimi biyofonksiyonelliğin kilit noktalarından biri olarak görülmektedir. Bu nedenle yüzey modifikasyonu uygulamaları özellikle biyouyumluluğun artırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Amino asitler ise kolay temin edilebilirliği, düşük maliyeti ve toksisite göstermemelerinden ötürü biyomateryallerin biyolojik fonksiyonlarını iyileştirmek için yüzey modifikasyonu yaklaşımında kullanılmaktadırlar (Lee vd., 2014).

1.14. Çalışmanın Amacı

Kemik defektleri gerek travmaya bağlı gerekse cerrahi işlem sonrası oluşan yaygın klinik durumlardır. Her ne kadar kemik doku kendi kendini onarabilme kabiliyeti olan ve bu onarım sürecinde skar doku şekillenmeden iyileşebilme özelliği olan vücuttaki ender dokulardan biri olsa da kritik boyuttaki kemik defektlerinin bir müdahale olmaksızın kendi kendine iyileşmesi çok zordur. Bu nedenle travma, tümör rezeksiyonu, malformasyonlar ve metabolik bazı hastalıklar sonucu şekillenen ve kendiliğinden iyileşmesi mümkün olmayan kemik defektlerinin tedavisinde kemik

greftleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Kemik grefti yaklaşımında otogreftler altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak yeterli donör alanının olmayışı, pre-operatif ve post-operatif komplikasyonlar, morbidite gibi dezavantajlar otogreft kullanımını kısıtlandıran durumlardır. Bu kısıtlayıcı durumların önüne geçmek için ise doku mühendisliği uygulamalarının biyomateriyal temelli yaklaşımından faydalanılmaktadır. Kemik grefti ikameleri bu amaçla kullanılan doğal veya sentetik olarak üretilen polimerik veya seramik bazlı materyalleri içermektedir. Biyomateriyal yaklaşımında temel amaç, doğal dokunun hücreler arası matriksini taklit eden bir doku iskelesi üreterek mekanik destek sağlamak, rejenerasyon ve reperasyon olaylarında konağın kendi hücrelerinin kullanıldığı hücre adezyonu, hücre farklılaşması gibi çeşitli biyolojik olaylara destek olmaktır. Kemik doku mühendisliği alanında kullanılan bioglass osteokondüktivitesi, biyouyumluluğu ve biyobozunurluluğu bilinen bir biyomateriyaldir. Bioglass'ın düşük mukavemet, kırılabilirlik gibi olumsuz yanları olmakla birlikte karşılaşılan bir diğer sorun özellikle üretim tekniğine bağlı olarak biyoaktivitesinde azalmalar görülmesidir. Bir biyomateriyalin hacimsel ve kitlesel özellikleri uygulanacağı dokunun mekaniğine ve fiziksel özelliklerine uyum göstermelidir. Ancak biyomateriyal kullanımında unutulmaması gereken bir husus ise hedeflenen biyolojik etkinin biyomalzeme-konak arayüzünde gerçekleştiğidir. Bu nedenle istenen etkiyi sağlamak amacıyla biyoilevseliliğin artırılması için biyomateriyallerin yüzeyinde fiziko-kimyasal metotlarla veya yüzey kaplama teknikleriyle çeşitli modifikasyon işlemleri gerçekleştirilmektedir. Ayrıca enzimler, proteinler, hücre yüzey ligandları ve amino asitler gibi çeşitli biyomoleküllerle yüzeylerin aktifleştirilmesi de kullanılan yöntemler arasındadır. Bu adı geçen biyolojik moleküller içerisinde amino asitler, doğal bulunabilme, ucuz maliyet ve ucuz çözündürme gibi özellikleriyle kullanım avantajı sağlamaktadırlar. Farklı amino asitlerin kendine özgü fonksiyonel gruplara ve yan zincirlere sahip olması her bir amino asitin eşsiz izoelektrik noktaya sahip olmasına yol açmıştır. Bu özelliklerinden faydalanılarak biyomateriyal yüzeylerine amino asitlerin immobilizasyonu sağlanmaktadır. Bu tez çalışmasında ise bioglass'ın biyouyumluluğun iyileştirilmesi için arjinin, aspartik asit, fenilalanin, sistein, histidin ve lizin'den oluşan amino asit karışımıyla bioglass'ın yüzeyi modifiye edilerek biyoaktivitesinin ve biyouyumluluğunun *in vitro* ve *in vivo* deneyler ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL METOT

Bu tez kapsamında yapılan testler:

- Sentez
- Fiziksel karakterizasyon
 - o FT-IR (Fourier transform infrared spektroskopi)
 - o Taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleme
- *In vitro* etkinlik ve biyouyumluluk testleri
 - o SEM ile hücre tutunma testi
 - o *In vitro* Alizarin Red S ile boyama (konvansiyonel ve kolorimetrik metot ile)
 - o *In vitro* ALP aktivite testi (kolorimetrik)
 - o *In vitro* sitotoksisite testi
 - o *In vitro* apoptoz-nekroz testi
 - o *In vitro* genotoksisite testi
 - o Calcein AM ile hücre canlılığının tespiti
- Osteoindüktif potansiyel testi (OECD F2529-13 standardına göre)
- Kemik defektinde etkinlik testi
- İmplantasyon testi

2.1. Hayvan Deneyleri İçin Etik Kurul Onayı

Tez çalışması kapsamında yapılan *in vivo* deneyler için Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2021/09-34 sayı ile yerel etik kurul izin belgesi alındı (EK.1). Hayvan deneylerinin tamamı Kırıkkale Üniversitesi Hüseyin Aytemiz Deneysel Uygulama ve Araştırma Laboratuvarı bünyesinde gerçekleştirildi.

2.2. *In vitro* Hücre Kültürü

In vitro deneyler için kullanılan hücre hatları Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne ait hücre stoklarından temin edildi. Hücre hatlarına ait bilgiler aşağıda verilmektedir:

- 1) MC3T3-E1 Subclone 4 CRL-2593, fare preosteoblast hücre hattı, ATCC.
- 2) L-929 CCL-1, fare fibroblast hücre hattı, ATCC.
- 3) CHO-K1/An1, 95122902, Çin hamster ovaryum hücre hattı, Şap Enstitüsü.

Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler:

- Minimum Essential Medium Alpha, GIBCO, A104900.
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Biological industries, Lot no:2121432.
- Fötal sığır serumu, Biological Industries, Lot no: 1720444.
- Penisillin-streptomisin, Biological Industries, Lot no: 1709239.
- Trypsin-EDTA, Biological industries, Lot no:03-050-1B.
- L-glutamin, Biological industries, Lot no:03-020-1C.
- Askorbik asit, Sigma Aldrich, A4403.
- DMSO, Amresco, Lot no: 0054C427.
- Tripkan blue solution % 0,4, GIBCO, 15250061.

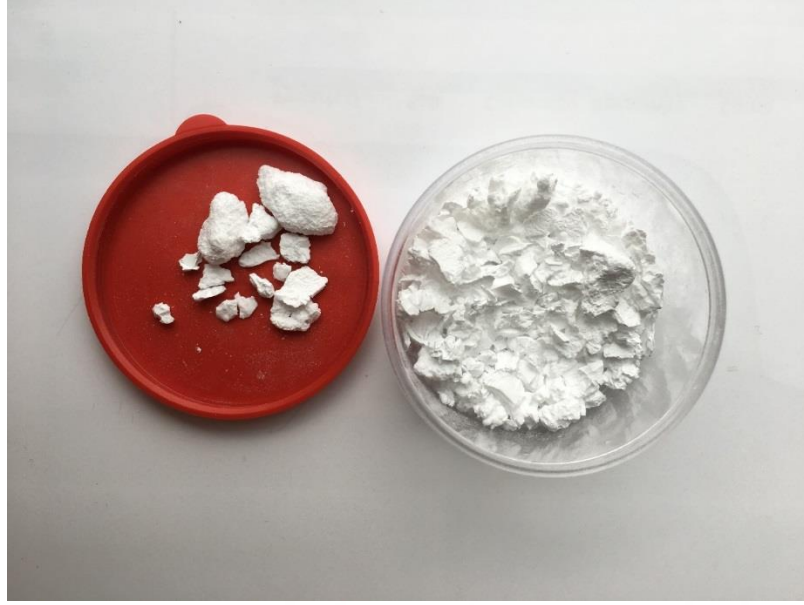
2.2.1. Hücre Kültür Metodu

Hücreler sıvı azot tankındaki -196 C°'lik saklama ortamından çıkarılarak 37 C°'deki CO₂ inkubatör içine koyuldu. Kriyo tüpler içerisindeki dondurma medyumunda bulunan hücreler çözünür çözünmez hızlıca içerisinde %10'luk FBS ve %1'lik antibiyotik içeren besi yerine aktarıldı (karışım oranı; hacimce en az içinde hücre bulunan dondurma medyumunun iki katı olacak miktarda taze besi yeri içerecek şekilde). Kullanılan besi yerlerinin seçimi farklı hücre hatlarının ideal kültür şartlarına göre belirlendi. Daha sonra 2500 RPM'de 2 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Hücre peletinin miktarına bakılarak 25'lik veya 75'lik hücre kültür flasklarına ekim yapılarak kültür işlemi başlatıldı. %70-80 konfluens sağlanıncaya kadar kültür işlemi devam ettirildi. Konfluens sağlandıktan sonra tripsin EDTA ile hücreler kaldırıldı. Hücre kaldırma işlemi için ilk olarak hücre kültür kaplarındaki besi yerleri çekilerek boşaltıldı. Daha sonra PBS ile ikişer defa yıkanarak hücrelerin

üzerini kaplayacak şekilde tripsin-EDTA koyuldu. 4 dk inkubatörde bekletildikten sonra hücre kültür kapları hafifçe çalkalanarak hücrelerin iyice ayrılması sağlandı. Daha sonra tripsinizasyonda kullanılan tripsin-EDTA miktarının iki katı olacak şekilde serum ve antibiyotik içeren besi yeri eklenerek tripsinizasyon durduruldu. Hücre kültür kaplarındaki besi yeri-tripsin karışımı santrifüj tüplerine aktararak santrifüj edildi. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra üstte kalan sıvı kısım atılarak kalan hücre pelleti hücre sayım cihazıyla sayıldı. Hücre sayımı için ilk olarak hücre pelleti içerisine 1 ml serum ve antibiyotik içeren besi yeri koyuldu, dikkatlice pipetaj yapılarak hücrelerin homojen bir şekilde besi yeri içerisinde karışması sağlandı. Daha sonra 10 µl hücre süspansiyonundan alınarak boş bir ependorfa aktarıldı. Bu hücre süspansiyonunun üzerine ise 10 µl tripan blue katıldı, dikkatlice pipetaj yapılarak karışması sağlandı. Tripan blue-hücre karışımından 10 µl alınarak hücre sayım lamına koyuldu ve hücre sayım cihazında canlı hücre sayıları belirlendi. Daha sonra canlı hücre sayılarına göre kullanılacak hücre sayıları farklı deneyler için hesaplanarak *in vitro* deneylere geçildi.

2.3. Bioglass Sentezi

Bioglass üretimi Sol-jel metoduna göre yapıldı (Cacciotti vd., 2012; Brinker ve Scherer, 2013). İçerisinde %45 oranında SiO₂, %24,5 oranında Na₂O, %24,5 oranında CaO ve %6 oranında P₂O₅ olacak şekilde düşük viskoziteli homojen karışım hazırlandı. Sol aşamasında polikondenzasyon ile oligomerler oluşturuldu. Daha sonra jel haline gelen karışım ilk olarak 70 C°'de yaşlandırma işlemine, devamında ise 120 C°'de kurutma ve 800 C°'de stabilizasyon işlemine tabi tutularak bioglass üretimi yapıldı (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Sol-jel yöntemiyle sentezlenen bioglass.

2.4. Bioglass'ın Modifikasyonu

Üretimi yapılan bioglass'ın modifikasyonu yapay vücut sıvısına (YVS) amino asit karışımı katılarak yapıldı. Modifikasyon işlemi çalkalamalı etüvde (KUHNER SHAKERX, Climo-Shaker ISF1-XC, Switzerland) 37 C°'de 80 RPM'de 25 gün boyunca yapıldı (Şekil 2.2.). Süre sonunda sıvı kısım uzaklaştırılarak modifiye hale gelen bioglass 37 C°'de kurutuldu.



Şekil 2.2. Bioglass'ın modifikasyon işlemine ait fotoğraf.

YVS'nin hazırlanması:

Kullanılan kimyasallar:

- NaCl, 7.996 gr/1000ml distile suda çözündürüldü,
- NaHCO₃, 0.350 gr/1000 ml distile suda çözündürüldü,
- KCl, 0.224 gr/1000 ml distile suda çözündürüldü,
- K₂HPO₄, 0.174 gr/1000 ml distile suda çözündürüldü,
- MgCl₂·6H₂O, 0.305 gr/1000 ml distile suda çözündürüldü,
- CaCl₂·2H₂O, 0.3681 gr/1000 ml distile suda çözündürüldü,
- Na₂SO₄, 0.071 gr/1000 ml distile suda çözündürüldü,
- 1M HCl,
- Tris hidroksi metil amino metan (NH₂C(CH₂OH)₃, 6.057 gr/100 ml distile suda çözündürüldü.

250 ml'lik beher içerisine NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄, MgCl₂·6H₂O, CaCl₂·2H₂O, Na₂SO₄'ün hazır çözeltilerinden 20'şer ml, 1M HCl'den 10 ml ve Tris hidroksi metil amino metan'ın hazır çözeltisinden 10 ml koyularak YVS hazırlandı.

Amino asit karışımının hazırlanması:

Kullanılan amino asitler ve oranları:

- L-lizin, 5 mg/10 ml distile suda çözündürüldü,
- L-histidin, 5 mg/10 ml distile suda çözündürüldü,
- Arjinin, 10 mg/10 ml distile suda çözündürüldü,
- Aspartik asit, 10 mg/10 ml distile suda çözündürüldü,
- Fenilalanin, 10 mg/10 ml distile suda çözündürüldü,
- Sistein, 10 mg/10 ml distile suda çözündürüldü.

Yukarıda verilen oranlarda ayrı olarak hazırlanan amino asit çözeltileri eşit hacimde karıştırılarak 60 ml'lik amino asit karışımı elde edildi. Daha sonra amino asit karışımından 10 ml YVS içerisine eklenerek modifikasyon solüsyonu hazırlandı. Modifikasyon işlemi 37 C°'de 80 RPM'de 25 gün boyunca yapıldı. Süre sonunda sıvı kısım uzaklaştırılarak modifiye hale gelen bioglass 37 C°'de kurutuldu. Daha sonra ise fiziksel karakterizasyon testlerine geçildi.

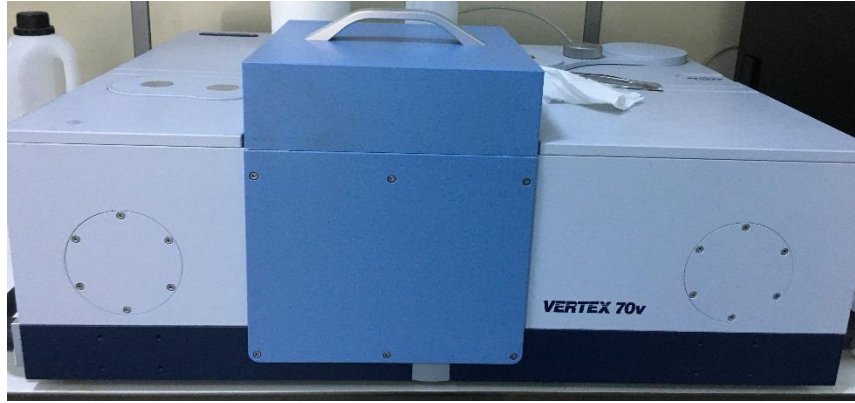
İn vitro ve *in vivo* testlerde karşılaştırmalarda kullanılan test grupları aşağıdaki gibi planlandı:

- İlk sentezlenen ham bioglass,
- Sadece YVS’de tutulan bioglass,
- Modifiye bioglass.

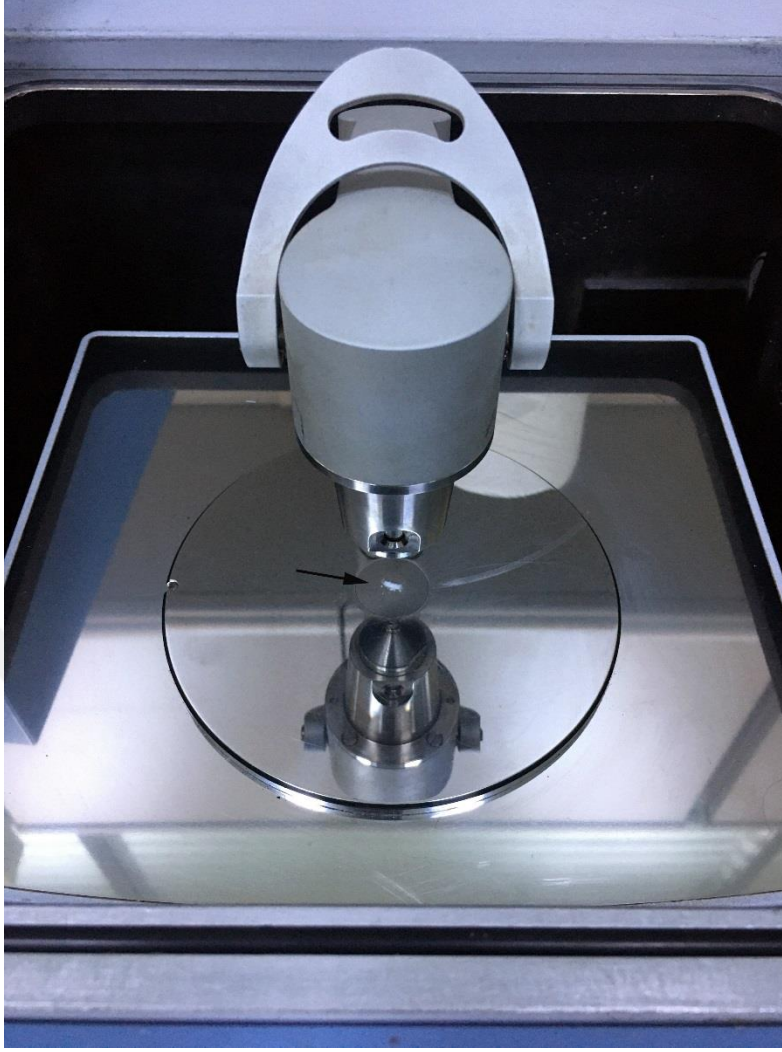
2.5. MB’nin Fiziksel Karakterizasyonu

2.5.1. FTIR Analizi

Biyomateryalin üretiminden sonra FTIR kullanılarak infrared spektrumları alındı. FT-IR spektrumlarının ölçümünde VERTEX 70v FT-IR spektrometer (Bruker) cihazı (Şekil 2.3.) kullanıldı. Kızılötesi spektroskopisi, organik veya inorganik bileşiklerin karakterize edilmesinde kullanılan bir araçtır (Ono, Bamba, Oku, Yonetani ve Fukusaki, 2011). Kızılötesi spektrumu, maddeyi oluşturan atomlar arasındaki bağların titreşimiyle oluşan frekanslarına karşılık gelen absorpsiyon pikleri ile örneğin parmak izini göstermektedir (Lin ve Wang, 2011). Her maddenin kendine has bir spektrumu vardır. Bu özellikle üretilen biyomateryalin FTIR spektrumları alınarak fiziksel karakterizasyonu yapıldı.



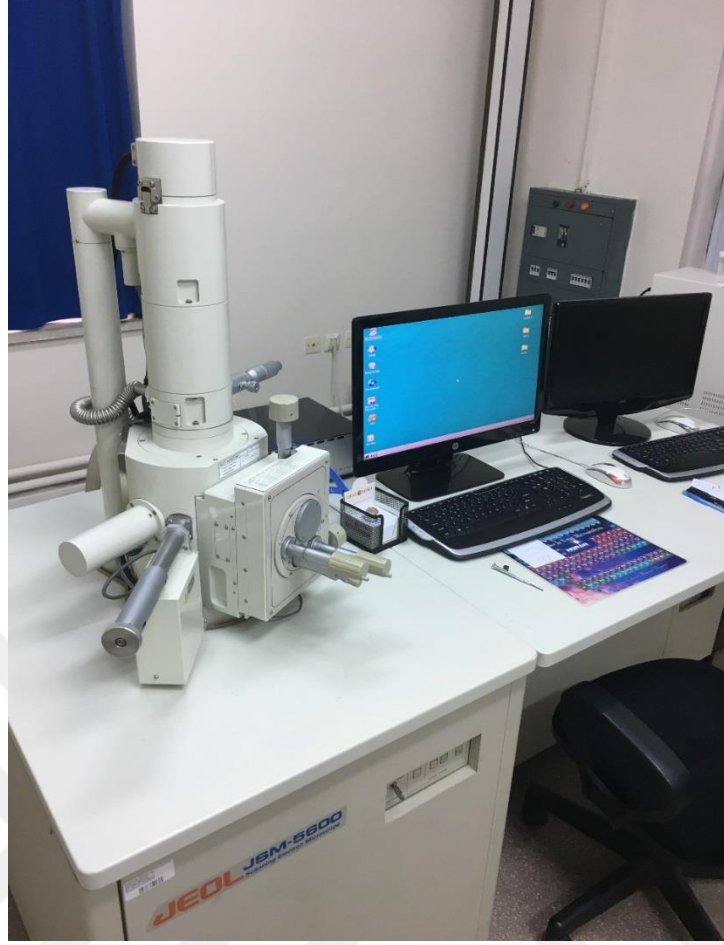
Şekil 2.3. Bruker, VERTEX 70v FT-IR spektrometer cihazı.



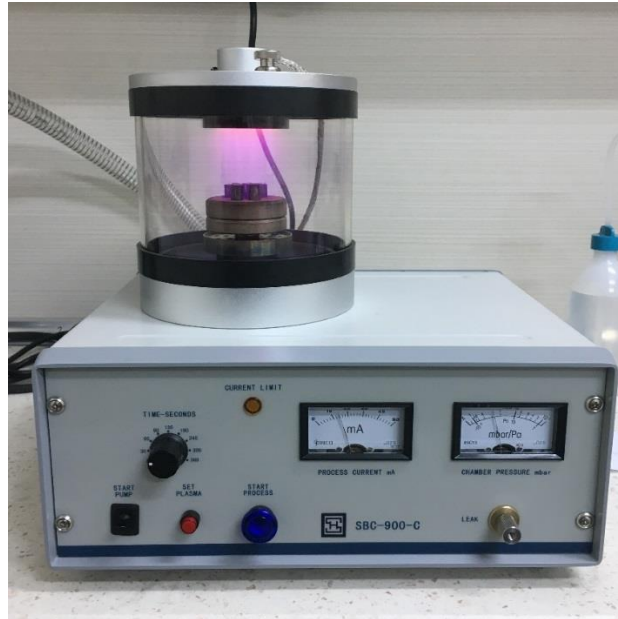
Şekil 2.4. Modifiye bioglass'ın FT-IR spektrumunun ölçülmesi için spektrometer'e yerleştirilmesi.

2.5.2. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Görüntüleme

Hazırlanan modifiye bioglass'ın şekil ve topografyası taramalı elektron mikroskobu (JEOL, JSM-5600) kullanılarak incelendi (Şekil 2.5.). Bu amaçla modifiye bioglass sentezlendikten sonra iki tarafı yapışkan bant ile pirinç levhalar üzerine sabitlendikten sonra üzerine sputter coater cihazı ile (SBC-900-C sputtering coater) (Şekil 2.6.) altın kaplanarak taramalı elektron mikroskopta incelendi ve fotoğrafları çekildi. Modifiye bioglass'a ait yüzey topoğrafyası ve gözenek çapı ölçümleri yapılarak farklı büyütmelerde incelendi.



Şekil 2.5. Taramalı elektron mikroskop ve görüntüleme ünitesi.



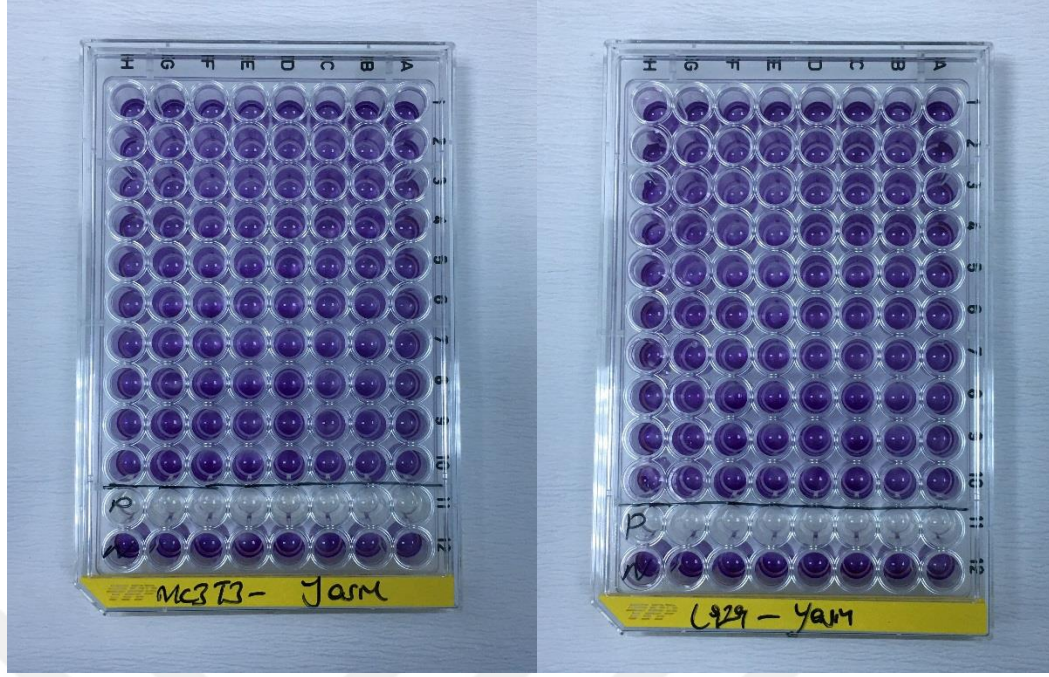
Şekil 2.6. Modifiye bioglass'ın sputter coater cihazı ile altınla kaplanması.

2.6. *In vitro* Etkinlik ve Biyouyumluluk Testleri

2.6.1. MTT Testi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

Sitotoksiteyi göstermek amacıyla 3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide tuzu içeren MTT testi ve ISO 10993-5 standardında belirtilen metotlar kullanıldı. Standartta hücre hattı olarak L-929 hücre hattı tavsiye edilmektedir. Ancak osteojenik potansiyelin değerlendirilmesi biyomateriyaller üzerine MC3T3-E1 hücrelerinin kültivasyonu yapılabacağından iki hücre hattı için de test yapıldı. 96'lık hücre kültür kaplarına 1.0×10^4 hücre olacak şekilde L-929 ve MC3T3-E1 hücrelerinin ekimi yapıldı. 24 saat inkübasyonun ardından modifiye bioglass (MB) özütü hücrelere uygulandı. MB'nin ekstraksiyonu ISO 10993-12 standardına göre yapıldı. MB özütü 0,2 µm filtreden geçirilerek uygulandı. Kullanıma hazır hale getirmek için MB özütüne %10 FBS ile %1 Pen-strep olacak şekilde serum ve antibiyotik ilave edildi. Daha sonra kullanıma hazır MB öztünden en yüksek konsantrasyon %100 numune olacak şekilde (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) 7 farklı konsantrasyon olarak uygulandı ve 24 saat 37 °C %5 CO₂'de inkübe edildi. Örnekler altı tekrarlı çalışıldı. Pozitif kontrol ve negatif kontroller üç tekrarlı çalışıldı. Pozitif kontrol olarak DMSO, negatif kontrol olarak ise besi yeri kullanıldı. Hücreler üzerine uygulanan özütler 24 saat sonunda atılarak, kuyucuklara kullanıma hazır MTT çözeltisi koyuldu. 2 saat inkübasyonun ardından izopropanol eklenerek 570 nm'de SPECTROstar Nano (S/N 601-1841) cihazında absorban değerleri ölçüldü (Şekil 2.7.). Canlılık değerinin %70'in altında olması numune özütünün sitotoksik olduğu anlamına gelmektedir. % canlılık değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı;

$$\% \text{ canlılık} = (\text{MB'nin absorban değeri} / \text{negatif kontrol absorban değeri}) \times 100$$



Şekil 2.7. MC3T3-E1 ve L929 hücre hatlarına ait MTT ölçüm plate'leri.

2.6.2. Apoptoz-Nekroz Testi

MB üzerine ekimi yapılan hücrelerdeki apoptoz-nekroz oranlarını göstermek amacıyla 24'lük hücre kültür kaplarında kuyucuk başına 5×10^4 sayıda hücre olacak şekilde biyomalzemeye ekimi yapılan hücreler 3, 7 ve 14 günlük sürelerde takip edildi. Besi yerleri her üç günde bir taze besi yeriyle değiştirildi. Kültür bitiminde hücre kültür kaplarındaki besi yerleri atıldıktan sonra kuyucuklar PBS ile iki kere yıkandı. Daha sonra kuyucuklara biyomateryalin üzerini kapatacak şekilde Annexin-V (Annexin V-FLUOS Staining Kit, ROCHE) solüsyonundan koyuldu. Oda ısısında ve karanlıkta olacak şekilde 10-15 dakika inkubasyonun ardından invert mikroskopta floresan ışık altında FITC filtrede incelendi.

2.6.3. *In vitro* Mikronükleus Testi

Genotoksisiteyi belirlemek için ISO 10993-3, OECD 487 Mikronükleus testi kullanıldı. ISO 10993-3, OECD 487 tarafından belirtilen CHO hücre hattı kullanıldı. MB'nin genotoksisitesi ekstraksiyon metodu kullanılarak test edildi. Özütleme işlemi ISO 10993-12 standardında belirtilen şekilde hesaplandı. MB'den 0,2g numune/besiyeri olacak şekilde tartım yapıldı ve 72 saat 37 °C'de serumsuz antibiyotiksiz besiyerinde ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak Mitomisin C, negatif kontrol olarak besiyeri kullanıldı.

-Deney protokolü: 48 kuyucuklu platelere 15×10^3 sayıda hücre ekildi. Hücreler 24 saat inkübasyona (37°C , $5\% \text{CO}_2$) bırakıldı. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki vasatlar atılarak ekstraktı hazırlanmış numune özütünden 1:1, 1:2, 1:4 olmak üzere üç farklı konsantrasyon uygulandı. Kısa uygulama (3-6 saat) için Cytochalasin B ($3\mu\text{g/ml}$) varlığında ve yokluğunda, S9(%2) varlığında ve yokluğunda; uzun uygulama için (24 saat) Cytochalasin B ($3\mu\text{g/ml}$) varlığında ve yokluğunda uygulama yapıldı. Pozitif kontrol için Mitomisin C, negatif kontrol için ise besiyeri kullanıldı.

Deney protokolü tabloda belirtildiği şekilde takip edildi (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. OECD 487 mikronükleus testinde yapılan uygulamalar

Kullanılan hücreler	Kısa Uygulama / +S9	Kısa Uygulama / -S9	Uzun Uygulama / -S9
CHO Hücresi			
	-S9 varlığında hücreler 3 saat numune özütü (1:1, 1:2, 1:4 konsantrasyon) ile muamele edildi.	-Hücreler 3 saat numune özütü(1:1, 1:2, 1:4 konsantrasyon) ile muamele edildi.	- Hücreler 1,5-2 normal hücre döngüsü (24 saat) boyunca numune özütü(1:1, 1:2, 1:4 konsantrasyon) ile muamele edilir. Numune özütü içeren besiyeri atılıp taze besiyeri ve cytochalasin B ($3\mu\text{g/mL}$) eklenir. 1,5-2 normal hücre döngüsü sonrası hücreler mikroskopta incelendi.
Cytochalasin B varlığında ;	-Özüt ile muamele edilen besiyeri atılarak taze besiyeri ve cytochalasin B ($3\mu\text{g/mL}$) eklendi. 1,5-2 hücre döngüsü sonrası mikroskopta incelendi.	-Özüt ile muamele edilen besiyeri atılıp, taze besiyeri ve cytochalasin B ($3\mu\text{g/mL}$) eklendi. 1,5-2 hücre döngüsü sonrası mikroskopta incelendi.	
	-S9 varlığında 3 saat numune özütü(1:1, 1:2, 1:4 konsantrasyon) uygulandı. Uygulanan özüt atılıp taze besiyeri eklendi. 1,5-2 hücre döngüsü sonrası hücreler mikroskopta incelendi.	-3 saat numune özütü (1:1, 1:2, 1:4 konsantrasyon) uygulandı. Uygulanan özüt atılıp taze besiyeri eklendi. 1,5-2 hücre döngüsü sonrası hücreler mikroskopta incelendi.	- Hücreler 1,5-2 normal hücre döngüsü (24 saat) boyunca numune özütü(1:1, 1:2, 1:4 konsantrasyon) ile muamele edildi. Numune özütü içeren besiyeri atılıp, taze besiyeri eklendi. 1,5-2 hücre döngüsü sonrası hücreler mikroskopta incelendi.
Cytochalasin B yokluğunda;			

Numune özütünün 3 saatlik ve 24 saatlik uygulamasının ardından 48 kuyucuklu hücre kültürü kabındaki vasatlar atılarak, kuyucuklara 75 mM KCl damlatıldı. Ardından metanol: glacial asetik asit (3:1) eklenerek hücreler fikse edildi. Son olarak hücreler propodium iodide ile boyanarak (Cytochalasin B varlığında) binükleuslu ve

mikronükleuslu hücreler sayıldı. Hücre sayısına bağlı olarak standartta belirtildiği şekilde sitotoksosite hesaplandı.

Sitokinez Blok Proliferasyon İndeksi: $((\text{Tek çekirdekli hücrelerin sayısı}) + (2 \times \text{iki çekirdekli hücrelerin sayısı}) + (3 \times \text{çok çekirdekli hücrelerin sayısı})) / (\text{Toplam hücre sayısı})$

Sitostaz = $100 - (\text{Replikasyon indeksi, RI})$

$$\text{RI} = [((\text{iki çekirdekli hücre sayısı}) + (2 \times \text{çok çekirdekli hücre sayısı})) \div (\text{Toplam hücre sayısı})_T / ((\text{iki çekirdekli hücre sayısı}) + (2 \times \text{çok çekirdekli hücre sayısı})) \div (\text{Toplam hücre sayısı})_C] \times 100$$

T= numune özütünün uygulandığı kültür, C= negatif kontrol

2.6.4. Hücre Tutunma Testi ve Taramalı Elektron Mikroskop İncelemesi

Hücre tutunması için MC3T3-E1 fare preosteoblast hücre hattı kullanıldı. Hücreler %10 fetal sığır serumu (Foetal Bovine Serum, Biological Industries, Lot 2004013) ve %1 penicillin-streptomycin (Pen-Strep Solution, Biological Industries, Lot 1952187) içeren Dulbecco'nun modifiye Eagle besi yerinde (DMEM, Low Glucose, Biological Industries, Lot 2027500) kültüre edildi. Besi yerinin içerisine %1 oranında L-Glutamin ve 50mg/Litre L-Askorbik asit katıldı. Hücreler 75cm²'lik hücre kültür flasklarında 37C°'de %5 CO₂ içeren ortamda kültüre edildi. Besi yerleri üç günde bir değiştirildi. %80 konfluens sağlandıktan sonra Trypsin-EDTA (Trypsin EDTA Solution C, Biological Industries, Lot 2010154) ile hücreler kaldırıldı ve hücre sayımı yapıldı. Daha sonra SEM'de hücre morfolojilerini göstermek amacıyla 24'lük hücre kültür kaplarına steril bioglass materyaller konuldu ve bazal ortamın sağlanması için üzerlerine besi yeri konularak hücre ekimi öncesinde 1 saat inkubatörde bekletildi. Daha sonra besi yerleri çekilerek 5x10⁴ hücre/kuyucuk sayıda olacak şekilde 50 µl besi yeri içerisinde biyomalzeme üzerine hücre ekimi yapıldı. Hücre tutunmasını sağlamak amacıyla 4 saat inkubatörde bekletildikten sonra biyomateryalin üzerini kaplayacak şekilde hazır besi yeri ilave edildi. Hücre morfolojilerini göstermek amacıyla 3,7 ve 14 gün olarak kültivasyon devam ettirildi. Her üç günde bir besi yeri değiştirilerek taze besi yeri koyuldu. Kültivasyonun bitiminde kuyucuklardaki besi yerleri çekilerek PBS ile iki kere yıkandıktan sonra %4 paraformaldehit ile 30 dakika hücreler tespit edildi. Daha sonra kuyucuklardaki

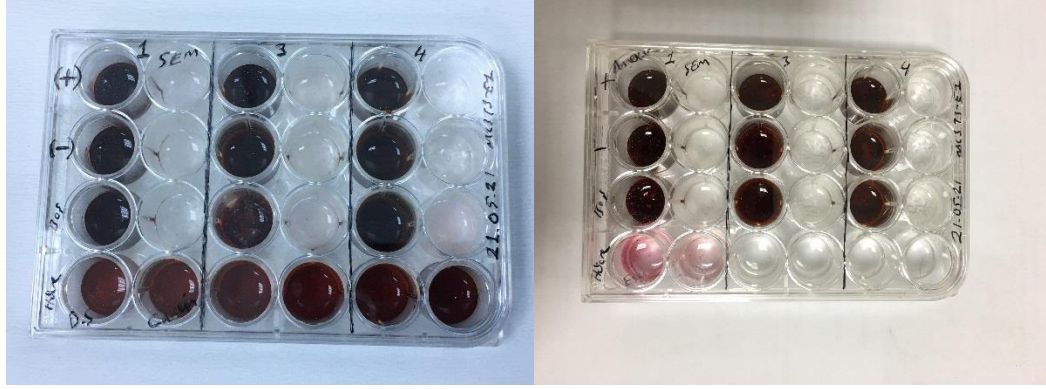
paraformaldehit atılarak PBS ile 5dk/2kere yıkandı. Dehidrasyon amacıyla %30, %50, %70, %80, %96 ve absol alkollerin her birinde 5 dk tutuldu. Kurutma işleminin ardından hücre ekili biyomalzemelerin yüzeyi sputter coater cihazı ile altınla kaplanarak SEM görüntülemeleri yapıldı.

2.6.5. Alkalen Fosfataz Aktivitesi Testi

ALP, osteojenik farklılaşmanın göstergesi olarak bilinen bir enzimdir. Alkali pH'da, fosfat esterlerinin hidrolizini katalizler. ALP aktiviteleri kolorimetrik yöntemle ölçüldü ve Alkalın Fosfataz kiti kullanıldı (Sensolyte pNPP, Katalog no:72146). ALP aktivitesini göstermek amacıyla özütleme yöntemi kullanıldı. İlk olarak 10 mg/10ml serumsuz antibiyotiksiz besi yerinde 37 C°de 24 saat tutularak MB, YVS'de bekletilen bioglass ve ham bioglass'ın özütleri elde edildi. Daha sonra özütlerin içerisine %10 FBS ve %1 antibiyotik katılarak test için kullanıma hazır, içerisinde biyomateryallerin özütü bulunan besi yeri hazırlandı. 3'er tekrarlı olacak şekilde hücre kültür kaplarına 12.5×10^3 sayıda hücre ekimi yapılarak 3,7 ve 14 gün süreyle kültivasyon devam ettirildi. Kontrol amacıyla sadece hazır besi yeri kullanıldı. Kültür işleminin sonunda ise ALP kitinde belirtilen protokole göre ayrı günler için kolorimetrik olarak ALP aktivitesi ölçüldü. Ölçüm sonuçlarının hesaplanması için ilk olarak ALP test kitinde bulunan standart solüsyonu kullanılarak standart eğrisi elde edildi ve regresyon denklemi hesaplandı. Daha sonra ise regresyon denklemi kullanılarak MB, YVS'de bekletilen bioglass ve ham bioglass için ölçülen absorbsiyon değerlerine karşılık ALP aktivitesi ng/mL cinsinden hesaplandı.

2.6.6. Alizarin Red S ile Kalsiyum Gösterilmesi

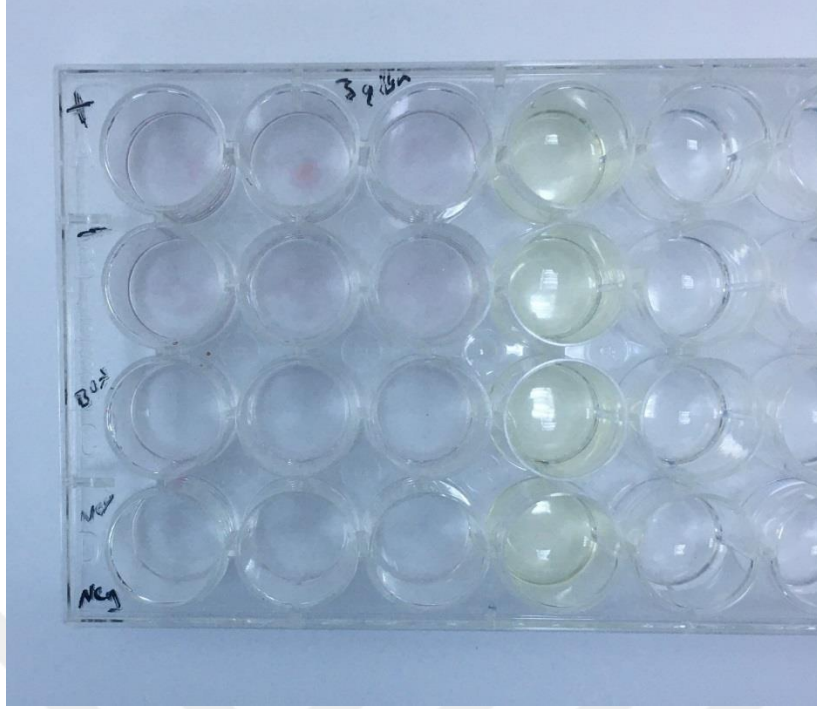
Alizarin Red S ile kalsiyum birikimlerini göstermek amacıyla 24'lük hücre kültür kaplarına 5×10^4 hücre/kuyucuk sayıda biyomalzemeye ekimi yapılan hücreler 3, 7 ve 14 günlük sürelerde takip edildi. Besi yerleri her üç günde bir taze besi yeriyle değiştirildi. Kültür bitiminde hücre kültür kaplarındaki besi yerleri atıldıktan sonra kuyucuklar PBS ile 5'er dakika iki kere yıkandı. Daha sonra %4 paraformaldehit ile fikzasyon işlemi yapıldı. Fikzasyon işemini takiben pH'sı 4,1-4,3'e getirilen %2'lik Alizarin kırmızısı ile 5 dk boyandı (Şekil 2.8.). Daha sonra kuyucuklardaki boya atılarak PBS ile berraklaşınca kadar yıkanarak invert mikroskopta görüntülendi.



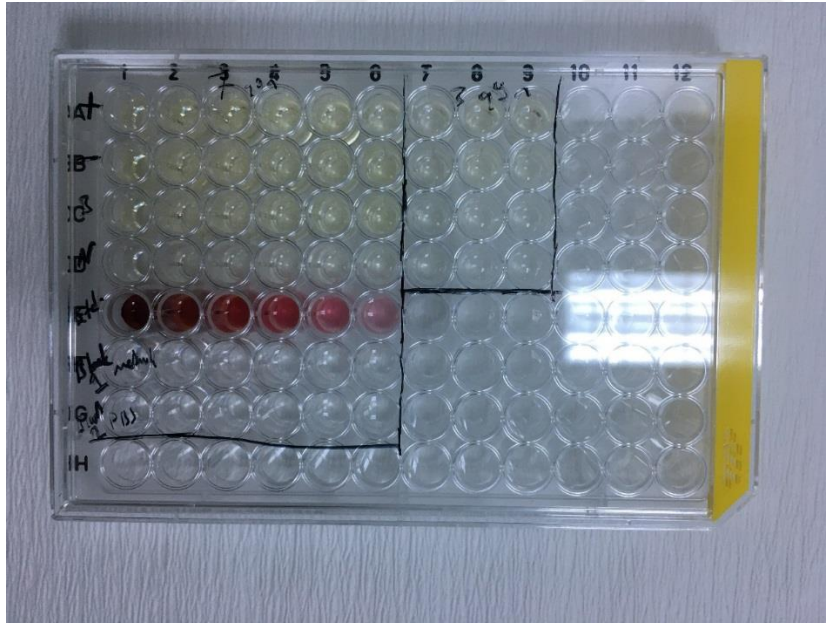
Şekil 2.8. Alizarin Red S ile kalsiyum boyaması.

2.6.7. Alizarin Red S ile Kalsiyum Birikimlerinin Kolorimetrik Yöntemle Gösterilmesi

Alizarin Red S ile kalsiyum birikimlerini kolorimetrik yöntemle göstermek amacıyla 24'lük hücre kültür kaplarına 5×10^4 hücre/kuyucuk sayıda MC3T3-E1 hücrelerinin ekimi yapıldı. İki boyutlu hücre kültür ortamında MB özütü (ALP testinde kullanılan özütleme yöntemi kullanıldı) hücreler üzerine 3, 7 ve 14 gün sürelerde uygulandı. Besi yerleri her üç günde bir taze besi yeriyile değiştirildi. Kültür bitiminde hücre kültür kaplarındaki besi yerleri atıldıktan sonra kuyucuklar PBS ile 5'er dakika iki kere yıkandı. Daha sonra %4 paraformaldehit ile fikzasyon işlemi yapıldı. Fikzasyon işemini takiben pH'sı 4,1-4,3'e getirilen %2'lik Alizarin kırmızısı ile 10 dk boyandı (Şekil 2.9.). Daha sonra %20 metanol %10 asetik asit solüsyonunda 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklar içerisindeki sıvı mikropate'ye aktararak (Şekil 2.10.) 405 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında okutuldu (Quarto, Senarath-Yapa, Renda ve Longaker, 2015). Ölçüm sonuçlarının hesaplanması için ilk olarak standart solüsyonu kullanılarak standart eğrisi elde edildi ve regresyon denklemleri hesaplandı. Daha sonra ise regresyon denklemleri kullanılarak MB, YVS'de bekletilen bioglass ve ham bioglass için ölçülen absorpsiyon değerlerine karşılık Alizarin Red miktarı mM cinsinden hesaplandı.



Şekil 2.9. Kolorimetrik ölçüm için Alizarin Red S boyanması.



Şekil 2.10. Kolorimetrik ölçüm için mikropate'in hazırlanması.

2.6.8. Calcein AM/Propidium İodide ile Hücre Canlılığının Gösterilmesi

MB üzerine ekimi yapılan hücrelerin canlılığını göstermek amacıyla 24'lük hücre kültür kaplarına 5×10^4 hücre/kuyucuk sayıda biyomalzemeye ekimi yapılarak hücreler 3, 7 ve 14 günlük sürelerde takip edildi. Besi yerleri her üç günde bir taze besi yeriyle değiştirildi. Kültür bitiminde hücre kültür kaplarındaki besi yerleri

atıldıktan sonra kuyucuklar PBS ile iki kere yıkandı. Daha sonra kuyucuklara biyomateryalin üzerini kapatacak şekilde Calcein AM/Propidium iodide (Calcein AM, C1430, Molecular Probes) solüsyonundan koyuldu. Oda ısısında ve karanlıkta olacak şekilde 10-15 dakika inkubasyonun ardından invert mikroskopta floresan ışık altında incelendi.

2.7. Osteoindüktif Potansiyel Testi

Bu test demineralize kemik materyalinin *in-vivo* osteoindüktif etkisinin gösterilmesi amacıyla gerçekleştirilir. Test protokolü ASTM F2529-13'e göre (Standard, A., 2013) belirlendi. Bu testte normal kemik ve ekstrasellüler kemik matriksi içermeyen dokulara demineralize kemik materyali implante edilerek meydana getirebileceği yeni osteoid-kemik doku oluşumu analiz edilir. Test edilecek demineralize kemik materyali, normalde herhangi bir kemik aktivitesi göstermeyen heterolog doku içerisine uygulanır ve sonrasında bu heterolog doku içerisinde bulunan çok yöne farklılaşma yeteneğine sahip mezenkimal hücrelerin, çeşitli uyarılarla osteokondroprogenitör hücrelere dönüşme oranı ve potansiyeli değerlendirilir.

Osteoindüktif potansiyel testi sonuçları test edilen materyalin yalnız deney hayvanlarında kemik doku oluşumu hakkında bilgi verir. İnsanlarda klinik olarak meydana gelebilecek olumlu ya da olumsuz etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılamaz.

2.7.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Bakım Besleme Koşulları

Deney hayvanı olarak sağlıklı, erkek, 5-7 haftalık $29 \pm 2,3$ gr ağırlığında atimik çıplak fareler kullanıldı. Deneyde kullanılan hayvanlar tesadüfen seçilerek, tek tek işaretlendi ve uygulamadan 5 gün önce ayrı kafeslere koyuldu. Kontrollü oda ısısında ve nem oranında, 12'şer saatlik karanlık-aydınlık koşullarında tutulan deney hayvanlarına sürekli taze su ve yeme ulaşabilecekleri şekilde bakım-besleme yapıldı.

2.7.2. Hayvanların Hazırlanması

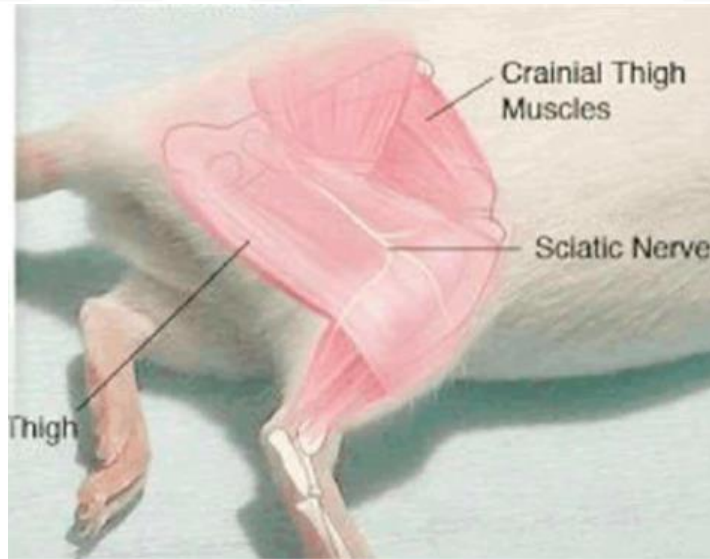
Atimik nüde farelerin sağlık durumları, kondisyon ve fizyolojik parametreleri (solunum sayısı, vücut ısısı) kontrol edildi. Operasyon öncesi xylasin/ketamin karışımı deri altı uygulanarak fareler genel anesteziye alındı. Genel anesteziye giren

hayvanların gluteal boşluğu hizasına denk gelen arka bacak bölgesi asepsi ve antisepsi kurallarına uyularak temizlendi.

2.7.3. Demineralize Kemik Materyalinin Gluteal Kaslar Arası Boşluğa Uygulanması

Daha önceden iyotlu dezenfektan ile temizlenen gluteal bölge boyunca steril serviyet ile kapatılarak ameliyathane ortamında, asepsi ve antisepsi kurallarına uygun tedbirler alındıktan sonra, ısıtmalı operasyon masasında ventro-dorsal sabitlenen atimik nüde farelerin derisine orta femur hizasında 0,5 cm uzunluğunda deri ensizyonu yapıldı. Makasla küt diseksiyon yöntemiyle intermusküler fascia ve kas demetleri arasında kalan boşluk kese şekline getirilerek test standardında atimik çıplak fareler için önerilen miktarda (20 ± 5 mg) test materyali yerleştirildi (Zhang, Powers ve Wolfenbarger, 1997). Her iki kese içerisindeki materyalin birbiriyle temasının önlenmesi amacıyla emilebilir iplikle fascia ve membranlar dikildi. Sonrasında deri bölgesi de 5/0 ipek iplikle kapatılarak iyotlu dezenfektan ile silindi.

Test materyali üç ayrı farede her iki arka bacak gluteal kaslar arasına (Şekil 2.11.) implante edilirken; toplam altı uygulama bölgesi oluşturuldu.



Şekil 2.11. Test materyalinin yerleştiği kas bölgesi.

Fotoğraf test standardından alınmıştır (Standard, A., 2013).

2.7.4. Hayvanların Gözlemlenmesi

Genel Sağlık Takibi

Bu testte üç farede toplam altı farklı bölgeye (herbir fare için 2 gluteal intermusküler boşluk) demineralize kemik materyali uygulandı. Fareler deney son gününe kadar (30. güne kadar) günde iki kez, genel sağlık kontrolü, yem ve su tüketimleri yönünden kontrol edildi. Uygulama sonrası 7 gün boyunca her gün operasyon yarası makroskobik olarak muayene edildi.

2.7.5. Değerlendirme

30 gün süreyle takip edilen hayvanlarda; heterojen doku arasına uygulama sonrası genel sağlık durumları, yem ve su tüketimleri yönünden değerlendirildi. Uygulama yapılan bölgede operasyon yarası ve herhangi bir reaksiyon olup olmadığı takip edildi.

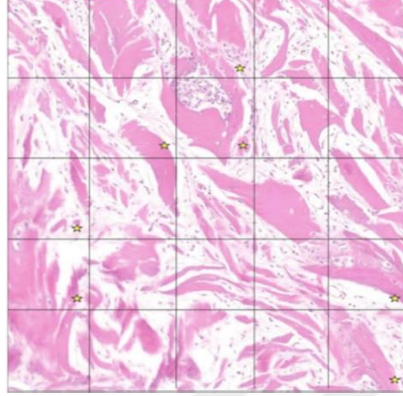
2.7.6. Makroskobik ve Mikroskopik Değerlendirme

Deney hayvanları yüksek dozda pentobarbital intra-peritoneal yolla uygulanarak ötenazi yapıldı ve demineralize materyal yerleştirilen bölge eksize edilerek lokal olarak incelendi. Materyal uygulanan kaslar en az 1 cm² çapında olacak şekilde çevresindeki fascia, bağdoku ve kanama alanlarından temizlenerek histopatolojik incelemeler için %10 tamponlu formaline alındı. 24 saat tespit edilip rutin histolojik doku takibi aşamalarından geçirildikten sonra parafine bloklandı. Daha sonra her bir bloktan 5-7 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak, Masson'un üçlü boyası ve toluidine mavisi ile boyanarak ışık mikroskopta incelendi.

OECD Designation F2529-13 histomorfometrik değerlendirme ölçütlerine göre; 10x objektif büyütmesi (toplam 100x büyütme) altında mikroskoptan alınan görüntü 25 grid içerecek şekilde bölmelere ayrıldı (Şekil 2.12.). Her bir doku örneğinde üç farklı alanda bu işlem yapılarak toplam 75 gridlik bir alan incelendi. Değerlendirme yapılırken; herbir grid içerisinde %75 ten fazla bir alanda osteojenik aktivitenin gözlenebileceği kıkırdak, kemik iliği, yeni kemik oluşumu gibi kıstaslar gözönüne alındı ve daha az oranda bağdoku, boş alan ve damar gibi yapılar varsa o grid değerlendirme dışı bırakıldı. Bir grid içerisinde en az bir alanda kıkırdak dokusu bulunmasına dikkat edildi.

Hesaplama yapılırken aşağıdaki formül kullanıldı;

Osteoindüktif potansiyel= Yeni Kemik Dokusu Oluşan Grid / Toplam Grid Sayısı x 100



Şekil 2.12. Test materyalinin inceleme metodu.

Fotoğraf test standardından alınmıştır (Standard, A., 2013).

İncelenen test materyalinin standartta belirtilen formüle göre osteoindüktif potansiyeli hesaplandı. Elde edilen sonuç standartta belirtilen puanlama sistemine göre skorlandı.

- Değerlendirme;

0 = İncelenen dokuda hiç implant tespit edilmemesi—Olumsuz potansiyel-testten kalır.

1 = < %10 yeni kemik doku oluşumu – Olumsuz potansiyel-Testten kalır.

2 = % 10-20 yeni kemik doku oluşumu – Olumlu potansiyel- Testi geçer

3 = % 21-30 yeni kemik doku oluşumu – Olumlu potansiyel- Testi geçer

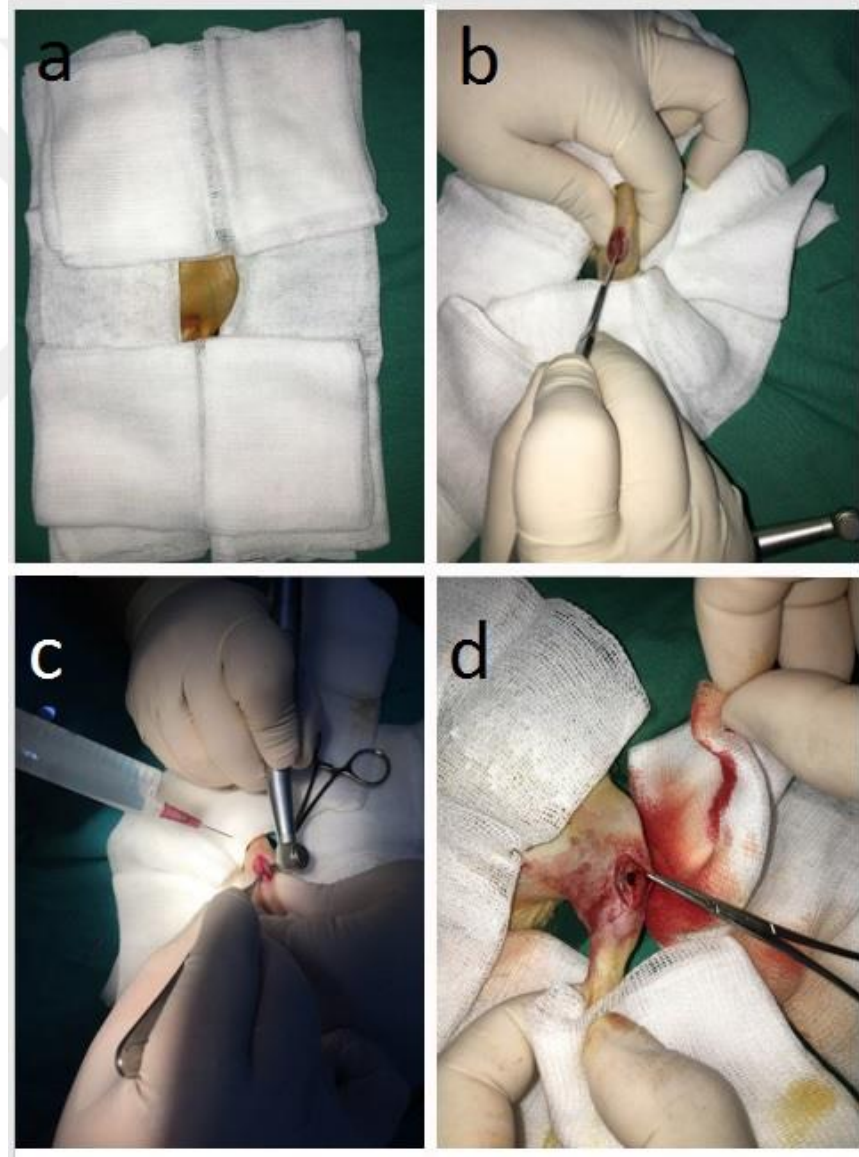
4 = > %30 yeni kemik doku oluşumu – Olumlu potansiyel- Testi geçer

2.8. Ekstremita Performans Testi

Deney hayvanı olarak $222,26 \pm 50,04$ g ağırlığında Wistar Albino erkek sıçanlar kullanıldı. Genel anestezi altında bilateral olarak tibia'nın antero-medial korteksinde diyafiz bölgesinde 4 mm genişliğinde, 4 mm uzunluğunda kritik boyut defektleri oluşturuldu (Şekil 2.13.-2.14.). Modifiye bioglass'ın iyileşme sürecindeki ve osteoid doku oluşumundaki etkileri radyolojik ve histopatolojik olarak incelendi.

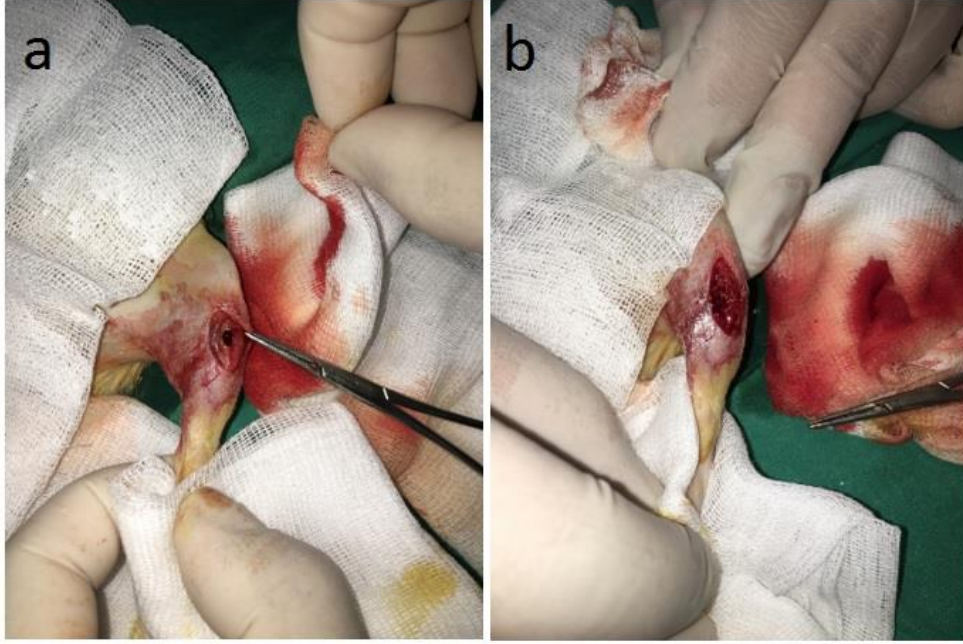
Çizelge 2.2. Ekstremitte performans testi için deney grupları.

Grup	Farklı Zamanlar İçin Kullanılan Hayvan Sayıları		
	4 Hafta	8 hafta	12 hafta
Modifiye Bioglass / Deney Grubu	7	7	7
Hidroksiapatit oluşturulmuş Bioglass	7	7	7
Ham Bioglass	7	7	7
Negatif kontrol	7	7	7



Şekil 2.13. Kemik defektinde etkinlik testinin intra-operatif fotoğrafları.

a) ensizyon hattının belirlenmesi, b) medial yaklaşımla tibial platoya ulaşarak kemik korteksinin açığa çıkarılması, c) frez ile kemik üzerinde defekt oluşturulması, d) kemik üzerinde unikortikal olarak oluşturulan defekt alanı.



Şekil 2.14. Kemik defektinde etkinlik testinin intra-operatif fotoğrafları.

a) defekt alanı, b) modifiye bioglass doldurulan defekt alanı.

2.8.1. Histokimyasal Boyamalar

Deney süreleri tamamlanan gruplar için ötenazi işlemini takiben defekt bulunan tibia'lar %10'luk formaldehit içerisinde koyularak tespit işlemi başlatıldı. 48 saatlik tespitin ardından örnekler dekalsifikasyon amacıyla %10'luk formik asit içerisinde koyuldu. Dekalsifikasyon işlemi radyolojik ve manuel kontrol yapılarak tamamlandı. Dekalsifikasyonu takiben örnekler akar suda 24 saat yıkamaya alındı. Yıkama işleminin ardından %70, %80, %96 ve absol alkolde (3 seri) 1'er saat tutularak dehidrasyon işlemi tamamlandı. Daha sonra saydamlaştırma için metil benzoat ve benzol serilerinden geçirilerek parafin emdirme işlemi için vakumlu etüve koyuldu. Vakum işleminin ardından örnekler parafinde bloklandı. Her bir bloktan 5-7 µm'lik kesitler alınarak, Masson'un üçlü boyama ve toluidine blue boyama metoduyla boyandı. Daha sonra ışık mikroskopta incelendi.

2.8.2. Değerlendirme

Tüm gruplar için histopatolojik değerlendirmeler ışık mikroskop altında yapıldı. İncelemelerde grup içerisinde herhangi bir sıra gözlenmeksizin rastgele inceleme yapıldı. Defekt alanının değerlendirilmesinde Emery skorlama sistemi kullanıldı (Emery, Brazinski, Koka, Bensusan ve Stevenson, 1994). Emery skorlama sistemine göre defekt alanları Çizelge 2.3.'e göre skorlandı.

Çizelge 2.3. Emery skorlama sistemine göre kemik defektinin histopatolojik değerlendirmesi.

Skor	Değerlendirme Kriteri
0	Defekt alanı boş
1	Defekt alanında sadece fibröz bağ doku var
2	Fibröz kıkırdaktan daha fazla fibröz bağ doku var
3	Fibröz bağ dokudan daha fazla fibröz kıkırdak var
4	Sadece fibröz kıkırdak var
5	Kemikten daha fazla fibröz kıkırdak var
6	Fibröz kıkırdaktan daha fazla kemik var
7	Sadece kemikle dolu

2.9. İmplantasyon Testi

2.9.1. Tanım

İmplantasyon sonrası lokal etkiyi değerlendirmek için, ISO 10993-2-6-12 standartlarında belirtilen protokoller kullanıldı. Bu testin amacı hayvan modeline uygulanan biyomateriyallerin deri altı, kas içi veya kemik içi implante edilen materyallerin implantasyon sonrasında uygulandığı bölgelerde (deri altı, kas içi, kemik içi gibi) lokal olarak meydana gelebilecek patolojik değişikliklerin değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır.

2.9.2. Kullanılan Deney Hayvanları

Söz konusu protokolde deney hayvanı olarak fare, rat, hamster veya tavşan gibi küçük laboratuvar hayvanlarının kullanılması önerilmektedir. Bu kapsamda bölüm

2.8.'de belirtilen ekstremite performans testinde kullanılan hayvanlar ve gruplar, deney süresi bitiminde implantasyon testi kapsamında da değerlendirildi. İmplantasyon testi için ayrıca farklı hayvanlar kullanılmadı.

2.9.3 Metot

Test protokolü bölüm 2.8.'deki ekstremite performans testinde belirtildiği gibi yapıldı.

2.9.4. Hayvanların gözlemlenmesi

Genel Sağlık Takibi

Deney hayvanları deney sonuna kadar günde iki kez, genel sağlık kontrolü, yem ve su tüketimleri yönünden kontrol edildi. İmplantasyon sonrası 7 gün boyunca her gün operasyon yarası makroskopik olarak muayene edildi ve 7. günde dikişleri alındı.

2.9.5. Değerlendirme

4, 8 ve 12 hafta süreyle takip edilen hayvanlarda; implantasyon sonrası genel sağlık durumları, yem ve su tüketimleri yönünden değerlendirildi. Uygulama yapılan bölgede makroskopik olarak herhangi bir reaksiyon olup olmadığı gözlemlendi.

2.9.6. Makroskopik Değerlendirme

Deney süreleri bitiminde deney hayvanlarına ötenazi yapıldı ve implantasyon bölgesi lokal olarak incelendi. Makroskopik muayenede, implante edilen materyalin etrafında herhangi bir patolojik değişiklik bulunup bulunmadığı incelendi. İmplant bölgesinden alınan örnekler ilk olarak %10 tamponlu formalinde 24 saat tespit edildi. Dekalsifikasyon işleminin ardından 24 saat boyunca yıkanan dokular alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi. Daha sonra ksilol serilerinden geçirilen dokular parafindee bloklandı. Her bir dokudan 5-7 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak, Masson'un üçlü boyası ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi. Histolojik kesitlerin değerlendirilmesi ISO 10993-6 Tablo 1 (Annex 5)'te belirtilen (Çizelge 2.4.) semikantitatif histopatolojik skorum kriterlerine göre yapıldı.

Çizelge 2.4. ISO 10993-6 Tablo 1 (Annex 5) – Semikantitatif Histopatolojik Skorlama

Rat (n=7)	Test örneği	Kontrol
DeneyHay.No		
Yangı		
	Polimorf lökosit	
	Lenfosit	
	Plazma hc	
	Makrofaj	
	Dev Hücre	
	Nekroz	
Aratoplam		
	Neovaskülarizasyon	
	Fibrozis	
	Yağdej/infilt.	
Aratoplam		
TOPLAM		
ORTALAMA		
TEST (-) KONTROL= Skor*		

*İrritasyon skorları: Yok (0,0-2,9); Hafif (3,0-8,9); Orta (9,0-15,0); Şiddetli (>15,0)
 Toplam skor= Test grubunun toplam skoru- kontrol grubunun toplam skoru.

2.10. İstatistik hesaplamalar

In vitro ve *in vivo* test sonuçlarının değerlendirilmesinde SPSS istatistik programı kullanıldı. Farklı testler için en uygun hesaplama yöntemi test metoduna göre belirlenerek istatistik hesaplamalar yapıldı. *In vitro* sitotoksitenin farklı gruplar arasındaki karşılaştırmalarını yapmak için student t testi kullanıldı. ALP aktivitesi ve Alizarin Red S ile kalsiyum birikimlerinin kolorimetrik olarak farklı gruplar arasındaki karşılaştırmaları ANOVA testi ile yapıldı. *In vitro* mikronükleus testi sonuçları Fisher exact testi ile istatistik olarak değerlendirildi. *In vivo* kemik defektinde etkinlik testinin değerlendirilmesi için ilk olarak Kruskal-Wallis testi kullanıldı, ikili karşılaştırmalar için ise Mann-Whitney testi kullanıldı.

3. BULGULAR

Tez kapsamında yapılan *in vitro* ve *in vivo* testlerin sonuçları aşağıdaki sıralamaya göre verilecektir.

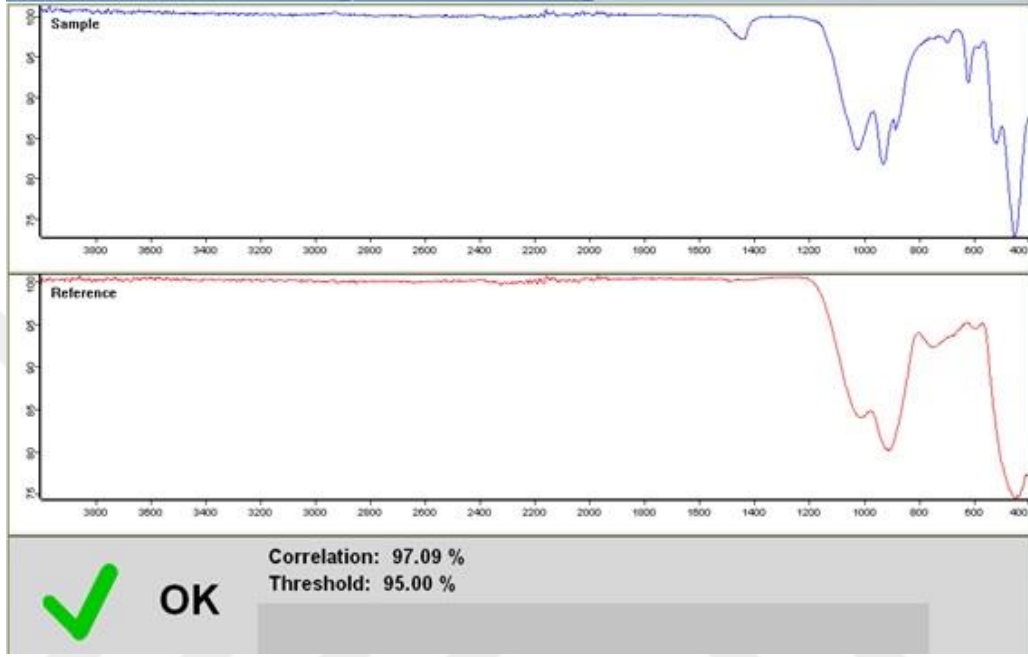
- Sentezlenen Modifiye Bioglass'ın Fiziksel Karakterizasyonu
 - o FT-IR (Fourier transform İnfrared Spektrofotometre) sonuçları
 - o Taramalı elketron mikroskop (SEM)görüntüleme sonuçları
- *In vitro* etkinlik ve biyouyumluluk
 - o MTT ile *in vitro* sitotoksisite testi sonuçları
 - o *İn vitro* apoptoz-nekroz testi sonuçları
 - o *İn vitro* mikronükleus testi sonuçları
 - o SEM ile hücre tutunma testi sonuçları
 - o *İn vitro* Alizarin Red S ile boyama (konvansiyonel ve kolorimetrik metot ile)
 - o *In vitro* ALP aktivite testi (kolorimetrik) sonuçları
 - o Calcein AM/Propidium İodide ile hücre canlılığın gösterilmesi
- Osteoindüktif potansiyel testi (OECD F2529-13 standardına göre)
- Kemik defektinde etkinlik testi (ekstremitte performans testi)
- İmplantasyon Testi (ISO 10993 standartlarına göre)

3.1. Modifiye Bioglass'ın Fiziksel Karakterizasyonu

3.1.1. FT-IR Sonuçları

İlk olarak sol-jel yöntemiyle üretilen bioglass'ın FT-IR spektrumu alınarak referans numune ile karşılaştırıldı (Şekil 3.1.). Daha sonra hem modifiye bioglass'ın hem de sadece YVS'de bekletilen bioglass'ın FT-IR spektrumları alınarak absorbsiyon pikleri değerlendirildi.

Ham bioglass'ın FT-IR spektrumları referans numunenin FT-IR spektrumları ile karşılaştırıldığında absorpsiyon piklerinin çok benzer olduğu görüldüğünden (Şekil 3.1.) referans numune ile %97,09'luk bir korelasyon olduğu saptandı. Böylece sol-jel yöntemiyle üretilen ham bioglass'ın sentez işleminin uygunluğu FT-IR spektrumları ile ispatlandı.

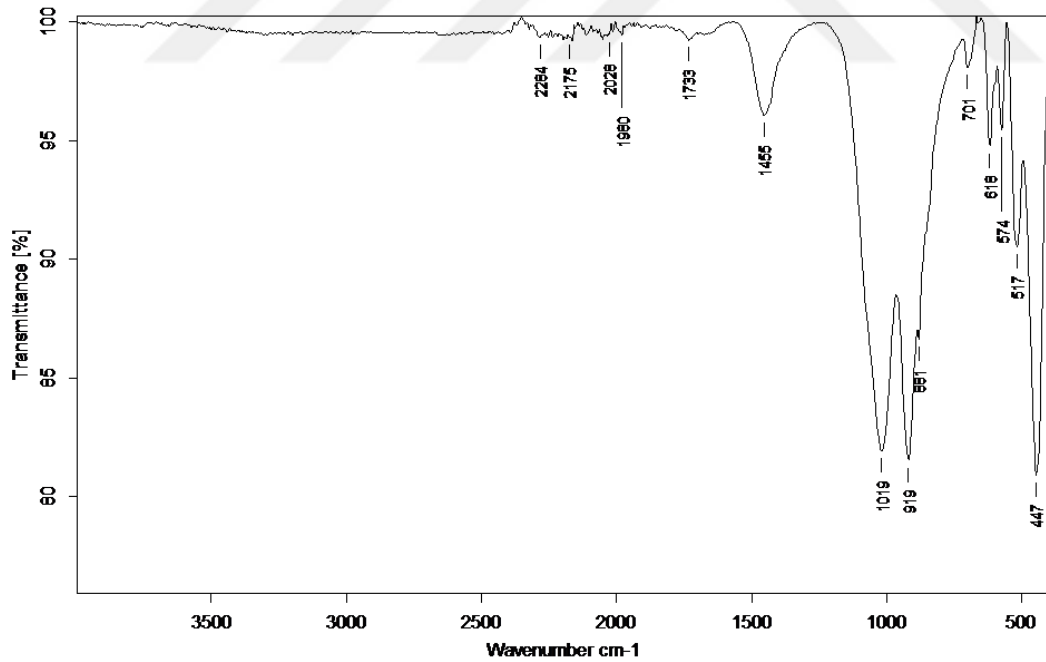


Şekil 3.1. Ham bioglass'ın referans numune ile karşılaştırılması.

Ham bioglass'ın amino asit karışımı kullanılarak yüzey modifikasyonu için, YVS içerisine amino asitlerden oluşan karışım katıldı. Ham bioglass, modifikasyon sıvısı içerisine konularak 25 gün boyunca 80 RPM'deki çalkalamalı inkubatörde bekletildi. Ayrıca ham bioglass, içerisinde amino asit karışımı bulunmayan sadece YVS bulunan sıvı içerisinde de aynı koşullarda bekletildi. Uygulanan işlemlerin sonunda her iki sıvıda bekletilen bioglass'lar kurutulduktan sonra hem hidroksiapatit oluşumu hem de modifikasyon işleminin başarısı açısından FT-IR ile absorpsiyon pikleri değerlendirildi.

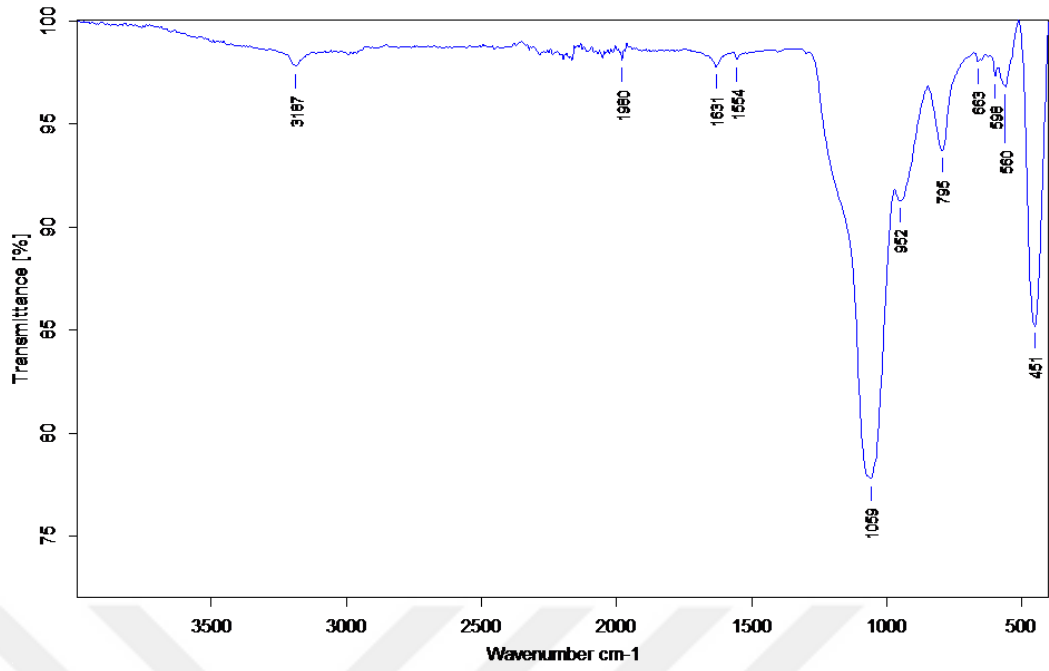
Ham bioglass'ın FT-IR pikleri (Şekil 3.2.) değerlendirildiğinde 1019 piki Si-O-Si eğilme gerilimini ve 919 (cm⁻¹) piki ise Si-O-Si asimetric gerilimini göstermektedir (Vallet-Regí, Romero, Ragel ve LeGeros, 1999; Rámila ve Vallet-Regí, 2001). Si bağlarına ait pikler camsı yapıyı doğrulamaktadır. YVS'de bekletilen bioglass'ta ve Modifiye Bioglas'ta 25 gün sonunda hidroksiapatit varlığını gösteren pikler görüldü. Hidroksiapatit'in PO₄³⁻ iyonlarına ait yaklaşık dalga boyu pikleri 1119, 1098, 1030,

965, 865 ve 550-600 (cm^{-1}) olarak bilinmektedir (Bayraktar ve Taş, 1999; Tas, 2000; Mollazadeh, Javadpour ve Khavandi, 2007; Adawy, Abd El-Fattah, El-Sayed ve Talaat, 2009; Kundu vd., 2010). Modifiye bioglass'a ait absorpsiyon pikleri incelendiğinde (Şekil 3.3.) 1059, 952, 598 ve 451 piklerinin P-O arasındaki güçlü titreşim pikleri olduğu görülmektedir. Bu durum ise modifiye bioglass yüzeyinde oluşan hidroksiapatit tabakasının varlığını doğrulamaktadır. YVS'de bekletilen bioglass'a ait absorpsiyon pikleri incelendiğinde (Şekil 3.4.) 1064, 942, 597 ve 454 (cm^{-1}) piklerinin P-O arasındaki pikler olduğu görülmektedir. Bu durum modifiye bioglass'ta olduğu gibi YVS'de bekletilen bioglass'ta da hidroksiapatit tabakasının oluştuğunu göstermektedir. Ham bioglass ve YVS'de bekletilen bioglass'tan farklı olarak Modifiye bioglass'a ait FT-IR spektrumunda 1554 cm^{-1} 'de absorpsiyon piki görülmüştür (Şekil 3.3.). Bu pik değerinin Silva vd. ile Zhang vd.'nin çalışmalarında bildirilen değerlere benzediği bu nedenle de amino gruplarındaki N-H eğilme titreşimine ait olduğu düşünülmektedir (Silva vd., 2005; Zhang vd., 2007). Bu durum ise modifiye bioglass yüzeyine yapılan amino asit kaplamasının varlığını doğrulamaktadır.



D:\analizler\DOC.DR.MUSTAFA TURK\1BOS.0	Sample name	Sample form	18/03/2021
---	-------------	-------------	------------

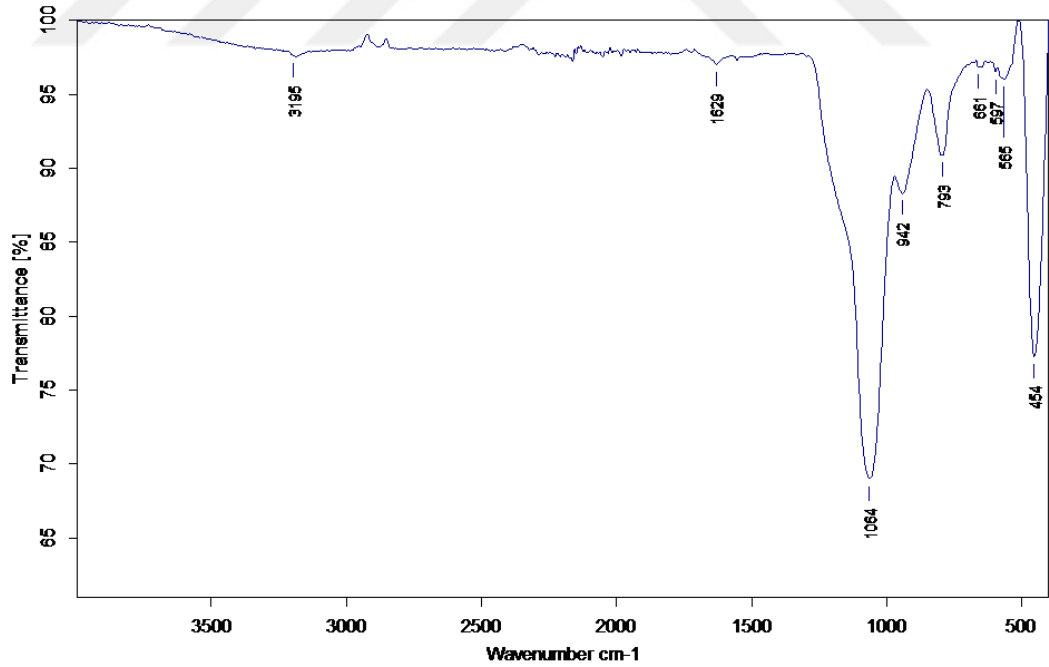
Şekil 3.2. Ham bioglass'ın FT-IR spektrumu.



D:\analizler\DOC.DR.MUSTAFA TURKVI+.0	Sample name	Sample form	18/03/2021
---------------------------------------	-------------	-------------	------------

Page 1/1

Şekil 3.3. Modifiye bioglass'ın FT-IR spektrumu.



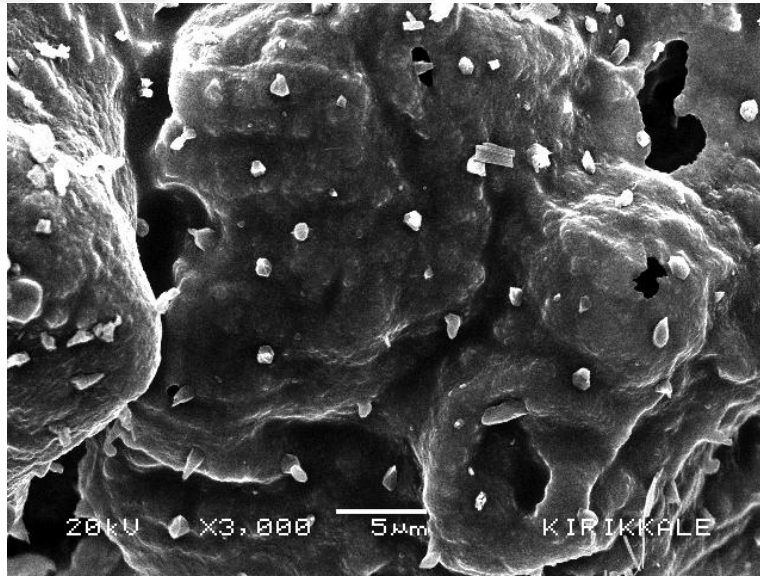
D:\ANALIZLER\DOC.DR.MUSTAFA TURKVI-YASIN.0	Sample name	Sample form	09/03/2021
--	-------------	-------------	------------

Page 1/1

Şekil 3.4. YVS'de işlem gören bioglass'ın FT-IR spektrumu.

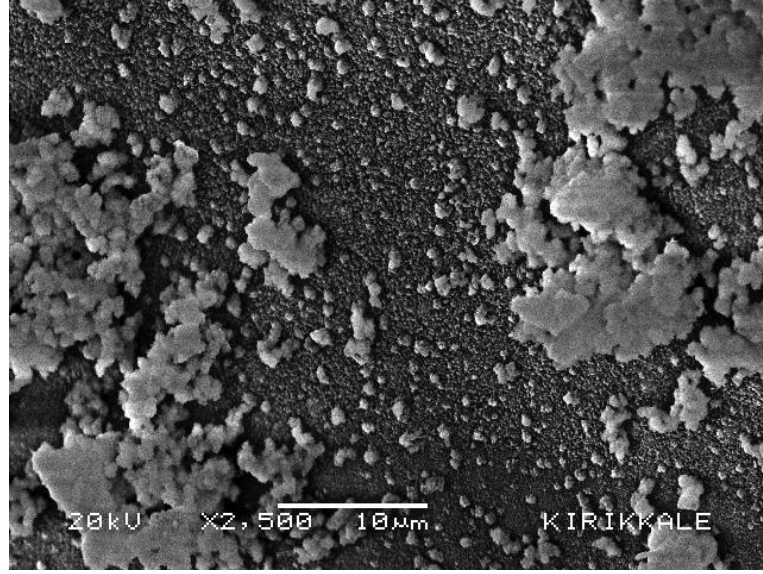
3.1.2. SEM Görüntüleme Sonuçları

Üretimi yapılan ve modifiye edilen bioglass'ın yüzey morfolojisini ve topoğrafyasını görüntülemek için SEM ile incelemeler yapıldı. Bu amaçla sol-jel yöntemiyle sentezlenen bioglass'ın, Modifiye bioglass'ın ve sadece YVS'de bekletilen bioglass'ın SEM incelemeleri yapılarak modifikasyon öncesi ve modifikasyon sonrası yüzey topoğrafyası değerlendirildi. Ham bioglass'ın SEM görüntüleri incelendiğinde gözenekli yapının görülmediği ve yüzeyde hidroksiapatit kristallerinin olmadığı ve amorf bir yapıda olduğu görülmektedir (Şekil 3.5.). YVS'de bekletilen bioglass'ın SEM görüntüleri incelendiğinde biyomateriyal yüzeyinde oluşan hidroksiapatit kristalleri (Şekil 3.6.) dikkat çekmektedir. Bu durum FT-IR ölçümleriyle bağdaşmaktadır. Modifiye edilen bioglass'ın SEM görüntüleri incelendiğinde, gözenekliliğin görülmesi (Şekil. 3.7.), biyomateriyal yüzeyine tutunan aminoasitlerin varlığı (Şekil 3.8.) ve yüzeyde görülen hidroksiapatit kristalleri (Şekil 3.9.) modifikasyon işleminden beklenen sonuçları doğrular niteliktedir. Böylece FT-IR sonuçlarında elde edilen hidroksiapatit ve amino asit bağlarını spesifik olarak gösteren absorpsiyon piklerinin SEM'de elde edilen görüntülerle bağdaştığı söylenebilir.



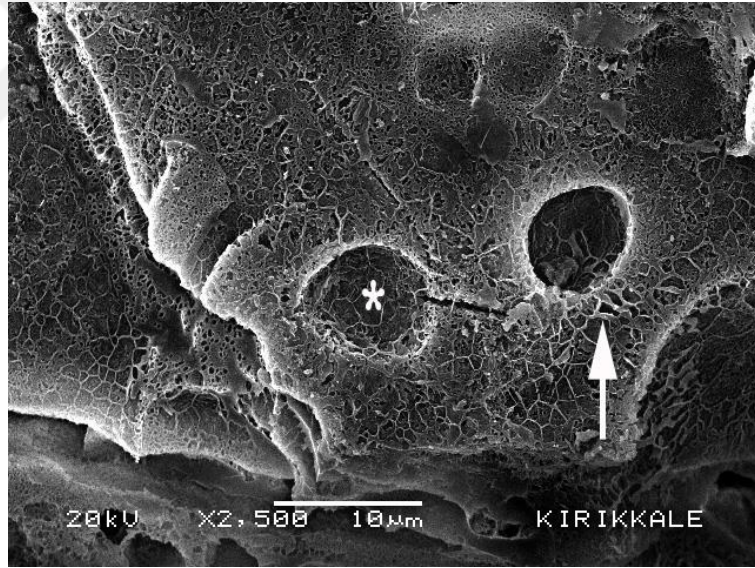
Şekil 3.5. Ham bioglass'ın SEM görüntüsü.

20kV, x3000 büyütme.



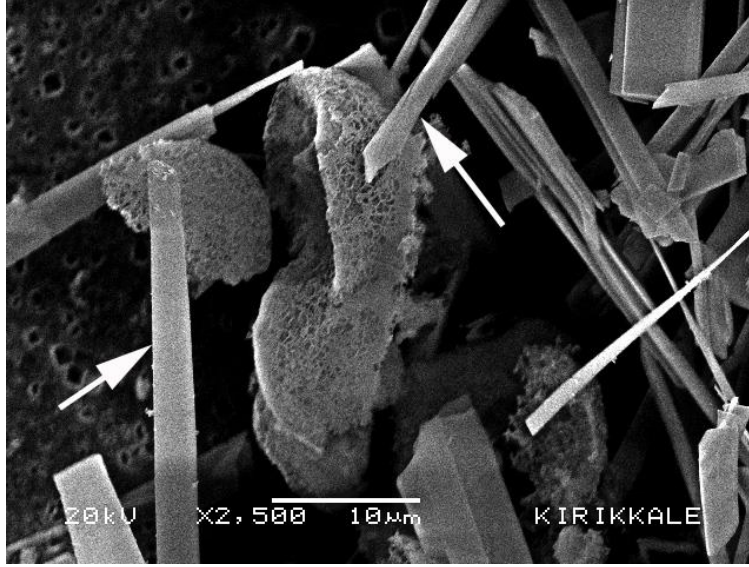
Şekil 3.6. YVS’de bekletilen bioglass’ın SEM görüntüsü.

Bioglass yüzeyinde görülen açık renkli alanlar hidroksiapaptit kristalleridir. 20kV, x2500 büyütme.



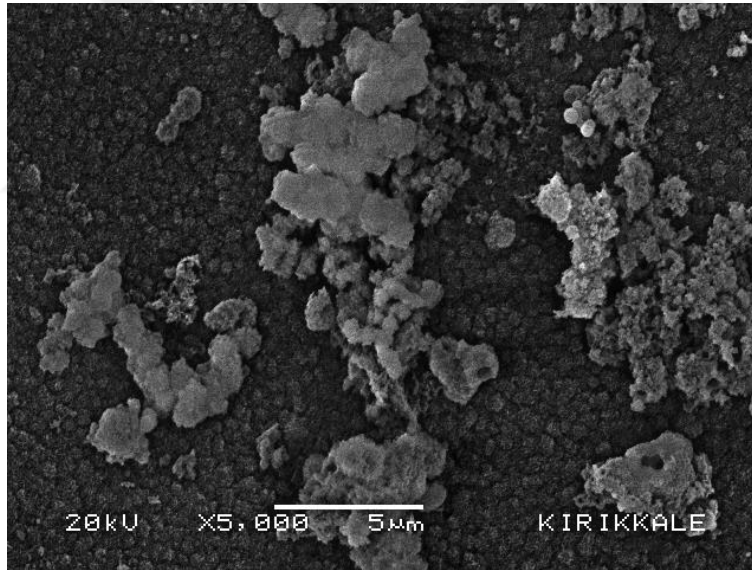
Şekil 3.7. Modifiye bioglass’ın (MB) SEM görüntüsü.

MB yüzeyinde modifikasyon sonrasında şekillenen gözenekler (asteriks) ve MB yüzeyine tutunan amino asit karışımı (beyaz ok) görülmektedir. 20kV, x2500 büyütme.



Şekil 3.8. Modifiye bioglass'ın (MB) SEM görüntüsü.

MB yüzeyine tutunan amino asit kristalleri (beyaz oklar) görülmektedir. 20kV, x2500 büyütme.



Şekil 3.9. Modifiye bioglass'ın (MB) SEM görüntüsü.

MB yüzeyinde modifikasyon sonrasında şekillenen hidroksiapatit kristalleri görülmektedir. 20kV, x5000 büyütme.

Yukarıda bahsedilen karakterizasyon testlerinin sonuçları, *in vitro* ve *in vivo* testlere geçilmeden önce sentezi yapılan biyomateriyallerin uygunluğunun ve sentez işleminin başarısının değerlendirilmesi için oldukça önem taşımaktadır. FT-IR ve SEM görüntüleri değerlendirildikten sonra *in vitro* testlere geçildi. *In vitro* testlerde test standartlarına ve literatürlerde geçen test protokollerine büyük ölçüde uyulmakla

birlikte karşılaştırmalı bir yaklaşım izlendi. Modifiye bioglass'ı hem ilk sentez edilen ham bioglass ile hem de sadece YVS'de bekletilen bioglass ile karşılaştırarak değerlendirmeler yapıldı.

3.2. *In vitro* Etkinlik ve Biyouyumluluk Testlerinin Sonuçları

3.2.1. *In vitro* Sitotoksosite Testi Sonuçları

In vitro sitotoksitenin belirlenmesi amacıyla MTT testi kullanıldı. Testler hem standartta belirtilen L-929 hücre hattı için hem de MC3T3-E1 hücre hattı için ayrı olarak yapıldı. Test sonucunda MB'nin en yüksek konsantrasyondaki uygulamalarının spektrofotometrik ölçümleri negatif kontrole göre hesaplandığında L-929 hücre hattında canlılık $84,64 \pm 11,63$ olarak, MC3T3-E1 hücre hattında ise $86,94 \pm 11,95$ olarak hesaplanmıştır. Her konsantrasyon için 6 tekrarlı olarak yapılan uygulamalara ait ölçümler L-929 hücre hattı için Çizelge 3.1.'de, MC3T3-E1 hücre hattı için ise Çizelge 3.2.'de canlılık yüzdeleri ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda MB özütünün L-929 ve MC3T3-E1 hücre hatlarında sitotoksik olmadığı görülmüştür.

Çizelge 3.1. L-929 hücre hattı için hesaplanan MTT testi sonuçları.

L-929 Hücre Hattı	
Konsantrasyon	Canlılık (%Ortalama $\pm$ Std.)
1/1	84,64 $\pm$ 11,63
1/2	82,35 $\pm$ 15,26
1/4	80,81 $\pm$ 16,29
1/8	86,31 $\pm$ 10,42
1/16	84,14 $\pm$ 12,20
1/32	82,01 $\pm$ 9,52
1/64	80,76 $\pm$ 13,05
Pozitif Kontrol	37,00 $\pm$ 4,05

Çizelge 3.2. MC3T3-E1 hücre hattı için hesaplanan MTT testi sonuçları.

MC3T3-E1 Hücre Hattı	
Konsantrasyon	Canlılık
(%Ortalama $\pm$ Std.)	
1/1	86,94 $\pm$ 11,95
1/2	86,26 $\pm$ 9,77
1/4	86,46 $\pm$ 7,37
1/8	83,82 $\pm$ 17,70
1/16	84,31 $\pm$ 12,12
1/32	84,71 $\pm$ 8,57
1/64	81,28 $\pm$ 15,97
Pozitif Kontrol	41,13 $\pm$ 7,69

3.2.2. *In vitro* Apoptoz-Nekroz Testi Sonuçları

In vitro olarak apoptoz-nekrozun belirlenmesi amacıyla MB'nin, YVS'de işlem gören bioglass'ın ve ham bioglass'ın üzerine ekimi yapılan hücrelere ait kültivasyonun 3., 7., ve 14. günlerinde Annexin V- FITC kiti ile yapılan test sonuçları inverted mikroskopta floresan ışık altında değerlendirildi. MB üzerine ekimi yapılan hücrelerde kültivasyonun 3., 7. ve 14. günlerinde yapılan apoptoz-nekroz oranlarına bakıldığında apoptoz ve nekroz oranının düşük olduğu ve hücrelerin büyük oranda canlılıklarını devam ettirdikleri gözlemlendi. Sadece YVS'de işlem gören bioglass'a ekimi yapılan hücrelerin MB'den daha yüksek oranda apoptoz ve nekroz oranlarına sahip olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.3.). Ham bioglass üzerine ekimi yapılan hücrelere ait apoptoz ve nekroz oranları ise MB'ye ve sadece YVS'de işlem gören bioglass'a göre daha yüksek oranda gözlemlendi (Çizelge 3.3.)

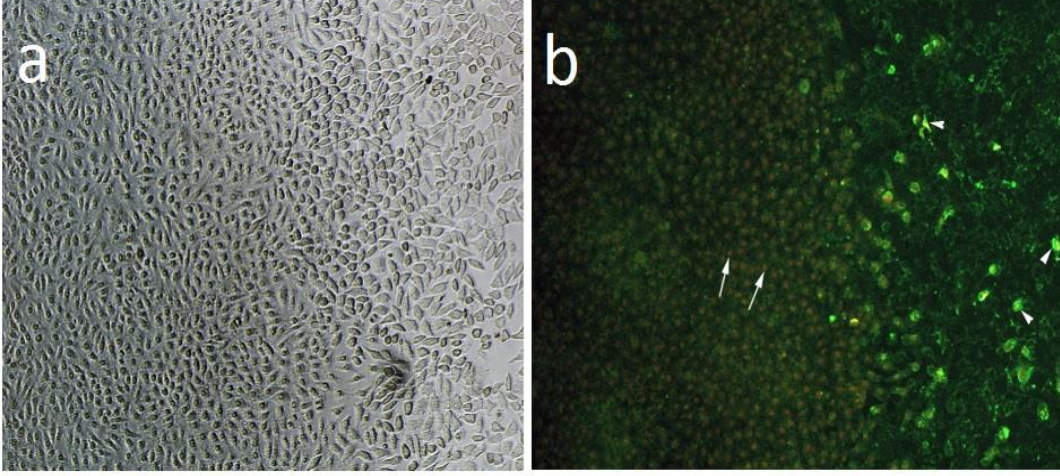
Apoptoz-nekroz testi için yapılan değerlendirmelerde sadece hücre bulunan kuyucuklara ait canlılık, apoptoz ve nekroz değerleri biyomateryal üzerine ekimi yapılan hücrelere ait değerlerle karşılaştırmada kullanılmadı. Fakat sonuçlara bakıldığında iki boyutlu kültür ortamının preosteoblastların (MC3T3-E1) canlılığını devam ettirebilmesi için ideal şartları taşımadığı görülmektedir (Şekil 3.10. ve Şekil

3.14.). Bu durum ise 3 boyutlu kültür ortamının uygunluğunu ve gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 3.3. Biyomateryaller üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin, kültürün 3, 7 ve 14. günlerinde Annexin V-FITC kiti ile belirlenen apoptoz-nekroz ve canlılık oranları.

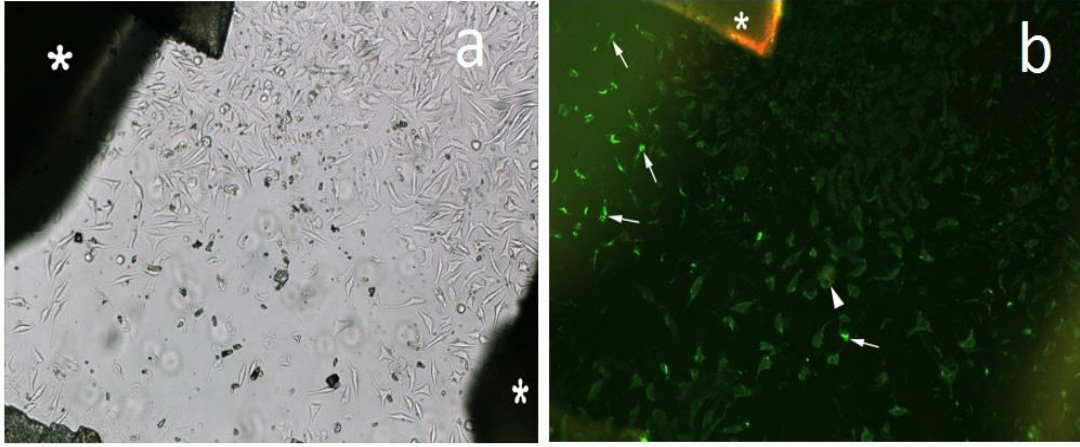
3. gün	Canlılık %	Apoptoz %	Nekroz %
Modifiye Bioglass	98,23 ± 0,05	1,29 ± 0,15	0,46 ± 0,10
YVS'de İşlem Gören Bioglass	94,54 ± 0,18	4,54 ± 0,96	0,90 ± 0,85
Ham Bioglass	90,25641 ± 1,03	7,69 ± 2,43	2,05 ± 0,97
7. gün			
Modifiye Bioglass	96,43 ± 0,60	2,77 ± 0,55	0,78 ± 0,04
YVS'de İşlem Gören Bioglass	94,50 ± 1,21	5,03 ± 0,74	0,45 ± 0,15
Ham Bioglass	93,33 ± 5,43	4 ± 1,34	2,66 ± 0,95
14. gün			
Modifiye Bioglass	95,29 ± 0,09	3,93 ± 0,46	0,77 ± 0,37
YVS'de İşlem Gören Bioglass	93,54 ± 3,56	4,83 ± 1,12	1,61 ± 0,18
Ham Bioglass	81,84 ± 3,65	13,03 ± 1,21	5,12 ± 4,87

*Değerler ortalama ± std. olarak verilmiştir.



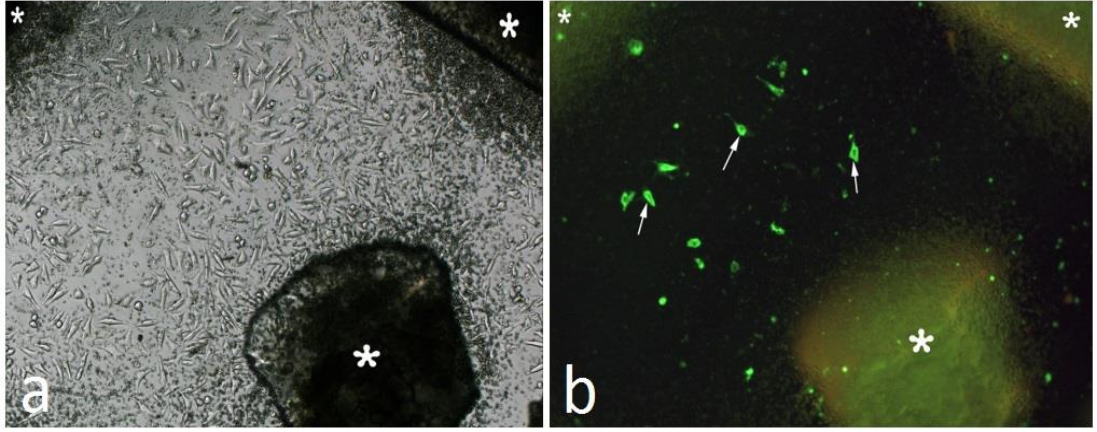
Şekil 3.10. 2d kültür ortamında kültivasyonun 3. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.

A'daki görüntü iki boyutlu kültür ortamındaki hücrelerin inverted mikroskoptaki filtresiz görüntüsü, b'deki görüntü ise 'a'daki alanın floresan filtredeki görüntüsüne aittir. B'de görülen beyaz oklar nekrotik hücreleri, ok başları ise apoptozdaki hücreleri göstermektedir. x10 büyütme.



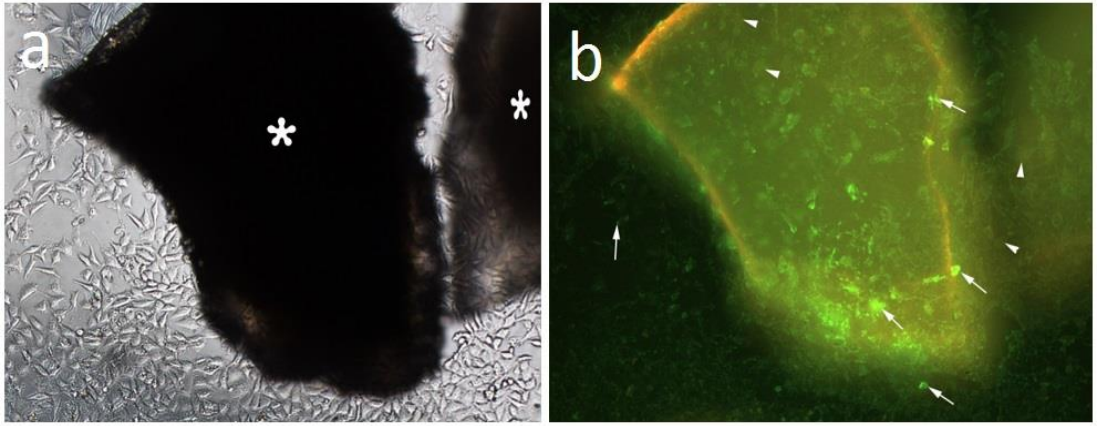
Şekil 3.11. Ham bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinde, kültivasyonun 3. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.

A'daki görüntü biyomalzeme üzerine ekimi yapılan hücrelerin inverted mikroskoptaki filtresiz görüntüsüne, b'deki görüntü ise 'a'daki alanın floresan filtredeki görüntüsüne aittir. B'de görülen beyaz oklar apoptozdaki hücreleri, ok başı nekrozdaki bir hücreyi göstermektedir. a ve b'de görülen asteriks biyomateryali göstermektedir. x10 büyütme.



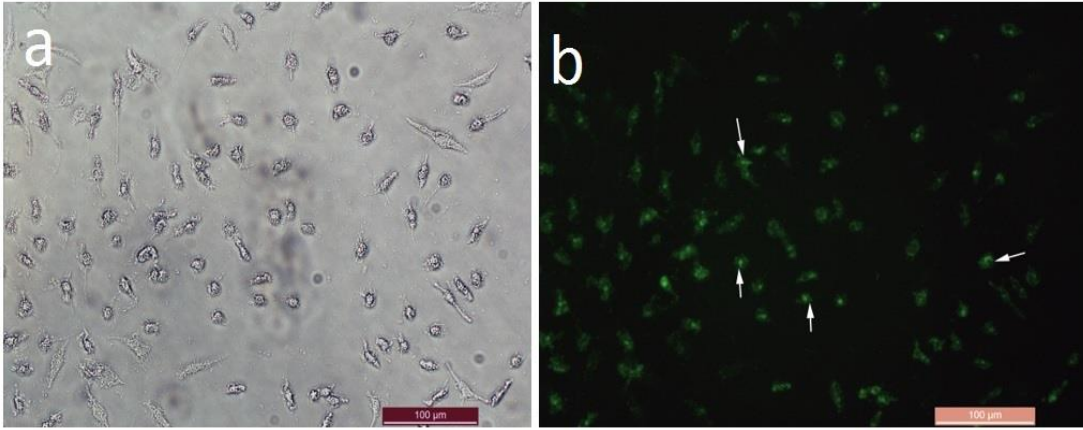
Şekil 3.12. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinde, kültivasyonun 3. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.

A'daki görüntü biyomalzeme üzerine ekimi yapılan hücrelerin inverted mikroskoptaki filtresiz görüntüsüne, b'deki görüntü ise 'a'daki alanın floresan filtredeki görüntüsüne aittir. B'de görülen beyaz oklar apoptozdaki hücreleri göstermektedir. a ve b'de görülen asteriksler biyomateryali göstermektedir. x10 büyütme.



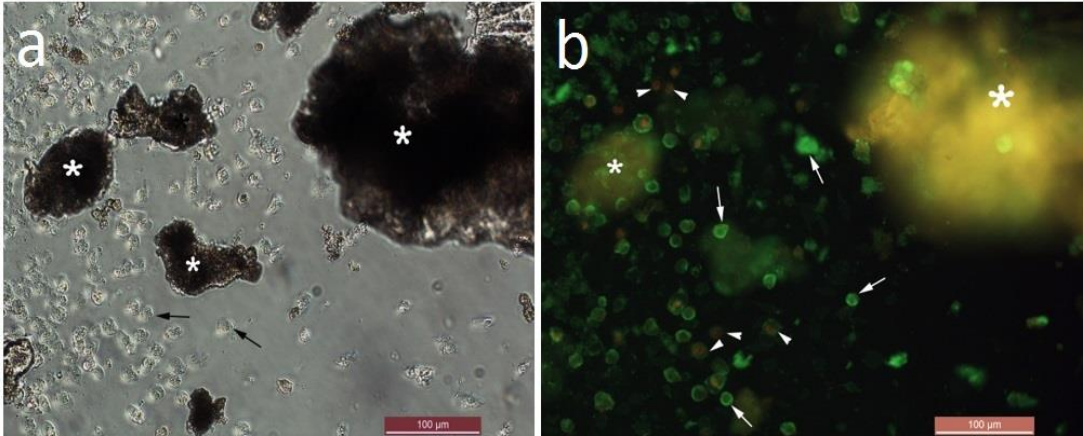
Şekil 3.13. YVS'de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinde, kültivasyonun 3. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.

A'daki görüntü biyomalzeme üzerine ekimi yapılan hücrelerin inverted mikroskoptaki filtresiz görüntüsüne, b'deki görüntü ise 'a'daki alanın floresan filtredeki görüntüsüne aittir. B'de görülen beyaz oklar apoptozdaki hücreleri, ok başları ise nekrotik hücreleri göstermektedir. a ve b'de görülen asteriksler biyomateryali göstermektedir. x10 büyütme.



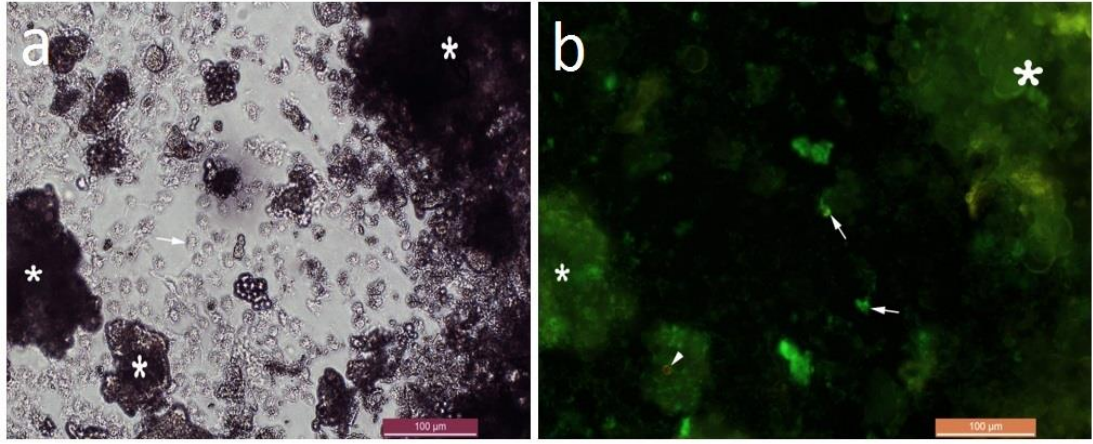
Şekil 3.14. 2d kültür ortamında kültivasyonun 14. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.

A'daki görüntü iki boyutlu kültür ortamındaki hücrelerin inverted mikroskoptaki filtresiz görüntüsü, b'deki görüntü ise 'a'daki alanın floresan filtredeki görüntüsüne aittir. B'de görülen beyaz oklar apoptozdaki hücreleri göstermektedir. x20 büyütme.



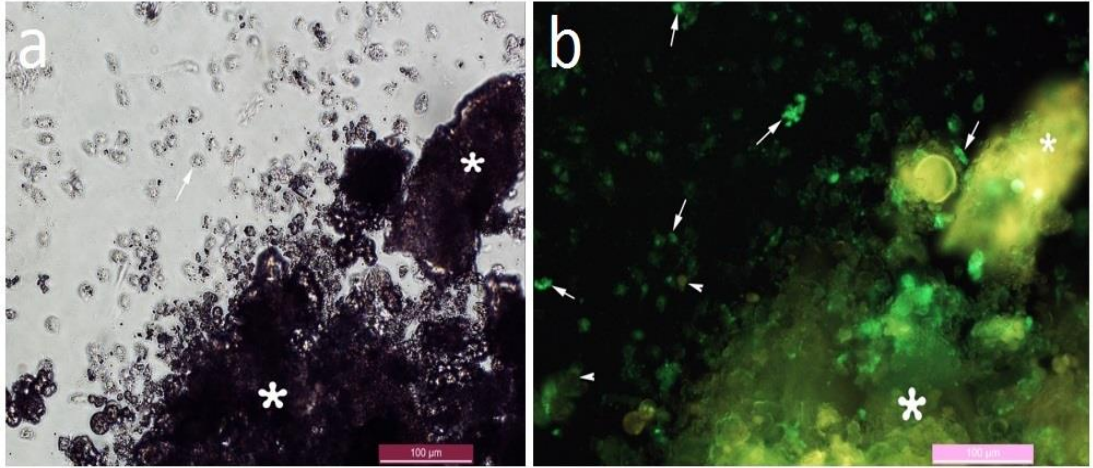
Şekil 3.15. Ham bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinde, kültivasyonun 14. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.

A'daki görüntü biyomalzeme üzerine ekimi yapılan hücrelerin inverted mikroskoptaki filtresiz görüntüsüne, b'deki görüntü ise 'a'daki alanın floresan filtredeki görüntüsüne aittir. B'de görülen beyaz oklar apoptozdaki hücreleri, ok başları nekrozdaki hücreleri göstermektedir. a ve b'de görülen asteriksler biyomateryali göstermektedir. x20 büyütme.



Şekil 3.16. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinde, kültivasyonun 14. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.

A'daki görüntü biyomalzeme üzerine ekimi yapılan hücrelerin inverted mikroskoptaki filtresiz görüntüsüne, b'deki görüntü ise 'a'daki alanın floresan filtredeki görüntüsüne aittir. B'de görülen beyaz oklar apoptozdaki hücreleri, ok başı ise nekrozdaki bir hücreyi göstermektedir. a ve b'de görülen asteriksler biyomateriyali göstermektedir. x20 büyütme.



Şekil 3.17. YVS'de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinde, kültivasyonun 14. gününde apoptoz-nekrozun gösterilmesi.

A'daki görüntü biyomalzeme üzerine ekimi yapılan hücrelerin inverted mikroskoptaki filtresiz görüntüsüne, b'deki görüntü ise 'a'daki alanın floresan filtredeki görüntüsüne aittir. B'de görülen beyaz oklar apoptozdaki hücreleri, ok başları ise nekrotik hücreleri göstermektedir. a ve b'de görülen asteriksler biyomateriyali göstermektedir. x20 büyütme.

3.2.3. *In vitro* Genotoksisite Testi Sonuçları

OECD 487 ve ISO 10993-3 standartlarına göre yapılan MB'ye ait *in vitro* mikronükleus testi sonuçları istatistik olarak değerlendirildiğinde; negatif kontrol ile MB özütüne ait uygulamaların istatistik olarak anlamlı bir fark göstermediği, pozitif kontrol ile MB özütüne ait uygulamaların istatistik olarak anlamlı fark gösterdiği tespit edildi (Çizelge 3.5.). Yapılan test sonucuna göre MB'nin genotoksik olmadığına karar verildi.

Çizelge 3.4. *In vitro* mikronükleus testine ait hücre sayıları ve hesaplanan değerler.

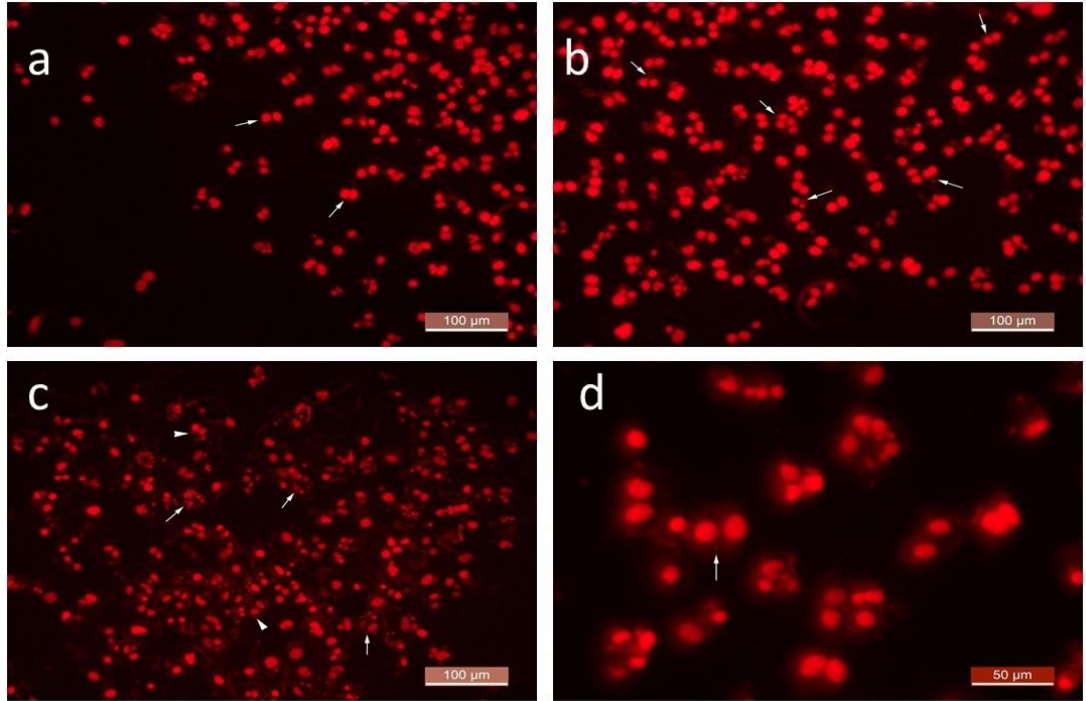
	Konsantrasyon	Binükleuslu hücre sayısı	Binükleuslu hücrelerdeki mikronükleus sayısı	Çok çekirdekli hücre sayısı	Toplam Hücre sayısı	Cytokinesis-Block Proliferation Index (CBPI)	% Cytostasis
3 Saat Uygulama	MB-1:1 (S9+)	513	7	124	1161	1,65	7,94
	MB-1:1 (S9-)	500	7	111	1109	1,65	8,57
	MB-1:2 (S9+)	503	6	119	1077	1,68	3,37
	MB-1:2 (S9-)	511	6	125	1113	1,68	3,97
	MB-1:4 (S9+)	531	6	129	1145	1,68	3,22
	MB-1:4 (S9-)	500	6	134	1113	1,69	3,09
	Negatif (S9+)	526	5	149	1157	1,71	
	Negatif (S9-)	512	5	157	1160	1,71	
	Pozitif (S9+)	500	65	117	1271	1,57	18,89
	Pozitif (S9-)	500	68	117	1252	1,58	17,66
24 Saat Uyg.	MB-1:1	512	8	118	1151	1,64	8,22
	MB-1:2	509	6	111	1117	1,65	7,58
	MB-1:4	505	6	139	1145	1,68	3,42
	Negatif Kontrol	503	5	167	1182	1,70	
	Pozitif	506	74	107	1298	1,55	21,66

-MB; modifiye bioglass; Pozitif; Mitomycin C kullanıldı.

Çizelge 3.5. *In vitro* mikronükleus testinde hesaplanan mikronükleus oranlarının (%) istatistik olarak karşılaştırması

3 saatlik uygulamada belirlenen mikronükleus oranları (%)				24 saatlik uygulamada belirlenen mikronükleus oranları (%)			
	Negatif Kontrol Besiyeri	Pozitif kontrol Mitomisin C	MB 1:1 konsantrasyon		Negatif Kontrol Besiyeri	Pozitif kontrol Mitomisin C	MB 1:1 konsantrasyon
S9+	0,97*	13,6	1,36 ^a		0,99*	14,62	1,56 ^c
S9-	0,95*	13	1,4 ^b				

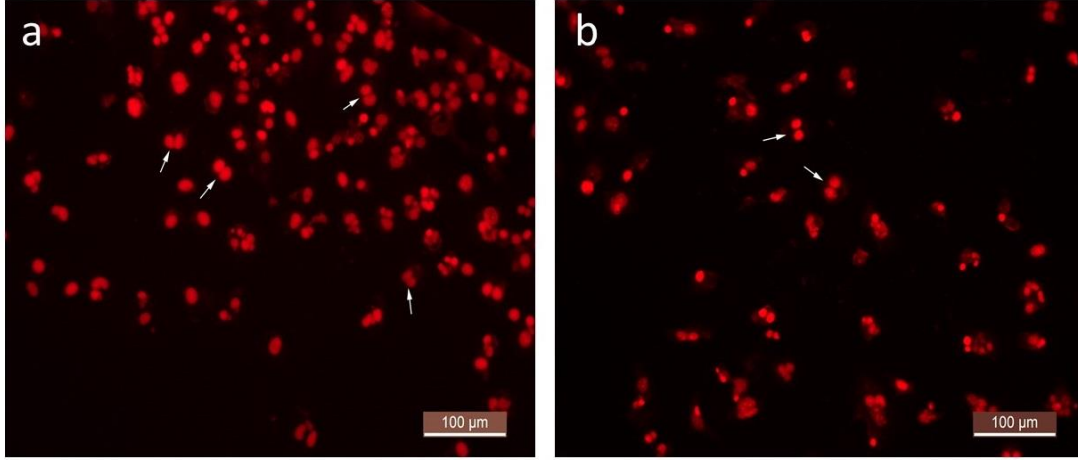
a; MB ile pozitif kontrol grubu karşılaştırması, 3 saat uygulama, $p=0,00028$
b; MB ile pozitif kontrol grubu karşılaştırması, 3 saat uygulama, $p=0,00025$
c; MB ile pozitif kontrol grubu karşılaştırması, 24 saat uygulama, $p=0,00047$
*Negatif kontrol ile MB grubu arasında anlamlı fark yoktur.



Şekil 3.18. *In vitro* mikronükleus testine ait negatif kontrol ve pozitif kontrol gruplarının floresan mikroskop incelemelerine ait fotoğraflar.

‘a’ negatif kontrole aittir, oklar binükleuslu hücreleri göstermektedir; ‘b’ Mitomycin-C kullanılan pozitif kontrole aittir, oklar binükleuslu ve mikronükleus içeren hücreleri göstermektedir; ‘c’ Kolşisin kullanılan pozitif kontrole aittir, oklar çok sayıdaki apoptotik hücreden birkaçını, ok başları ise binükleuslu ve mikronükleus bulunan hücreleri göstermektedir; ‘d’ binükleuslu ve mikronükleus

içeren hücrenin x40 büyütmedeki görüntüsü. Propidium iodide boyama, 'a', 'b' ve 'c' x20 büyütme, 'd' x 40 büyütme.



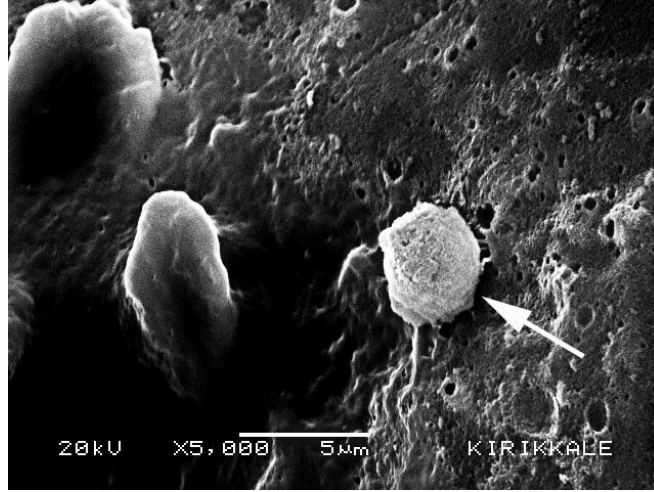
Şekil 3.19. Modifiye bioglass grubunun floresan mikroskop incelemelerine ait fotoğraflar.

'a' 3 saatlik uygulamaya aittir, oklar binükleuslu hücreleri göstermektedir; 'b' 24 saatlik uygulamaya aittir, oklar binükleuslu hücreleri göstermektedir. Propidium iodide boyama, 'a' ve 'b' x20 büyütme.

3.2.4. SEM ile Hücre Tutunma Testi Sonuçları

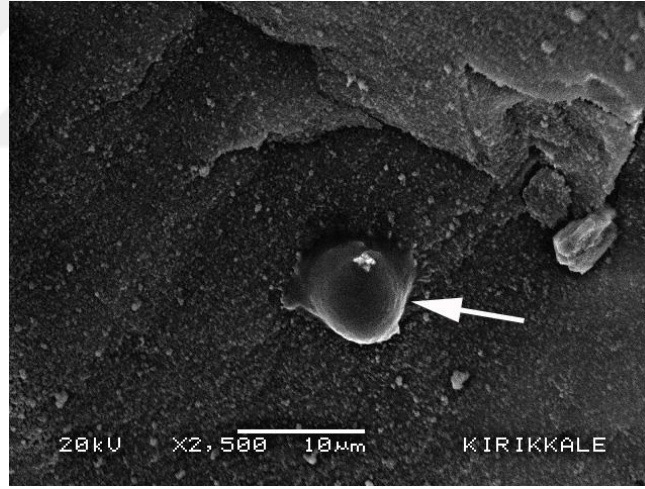
Hücre tutunmasını SEM ile göstermek için modifiye bioglass'ı hem ilk sentez edilen ham bioglass ile hem de sadece YVS'de bekletilen bioglass ile karşılaştırarak değerlendirmeler yapıldı. İncelemeler kültürasyonun 3., 7. ve 14. günlerinde olacak şekilde yapıldı.

MB'ye ekim yapılan hücrelere ait 3. gün SEM incelemesinde hücrelerin MB yüzeyine tutunmaya başladığı, sferoid morfolojide olduğu ve MB yüzeyine tutunan hücre uzantıları görülmektedir (Şekil 3.20.). Sadece YVS'de bekletilen bioglass'a ekim yapılan hücrelere ait 3. gün SEM incelemesinde hücrelerin tutunmaya başladığı görülmektedir (Şekil 3.21.). Herhangi bir işlem uygulanmayan bioglass'a ekim yapılan hücrelere ait 3. gün SEM incelemesinde ise bioglass yüzeyine tutunan çok az sayıda hücre varlığı ve tutunmanın MB'deki ve YVS'deki kadar belirgin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.22.).



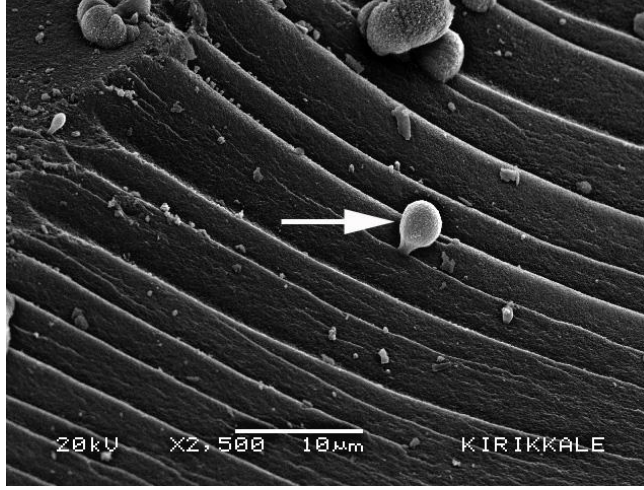
Şekil 3.20. Modifiye bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 3. günündeki SEM görüntüsü.

Beyaz ok biyomateriyal yüzeyine tutunan hücreyi göstermektedir. Biyomateriyal yüzeyine iyice tutunan hücrenin uzantıları görülmektedir. 20 kV, x2500 büyütme.



Şekil 3.21. Sadece YVS'de tutulan bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 3. günündeki SEM görüntüsü.

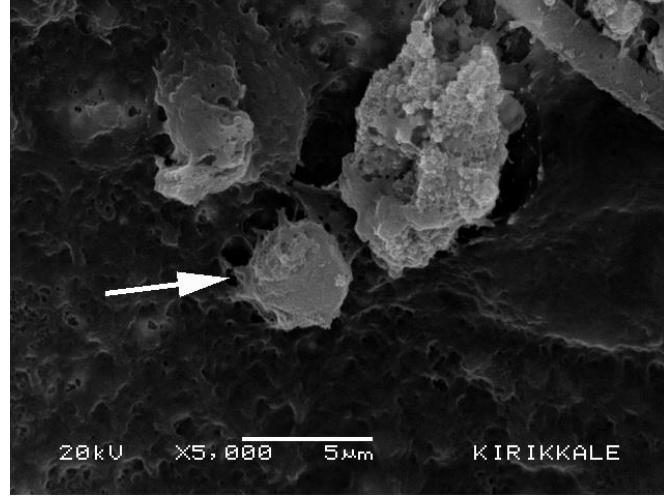
Beyaz ok biyomateriyal yüzeyine tutunan hücreyi göstermektedir. 20 kV, x2500 büyütme.



Şekil 3.22. Ham bioglass’a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 3. günündeki SEM görüntüsü.

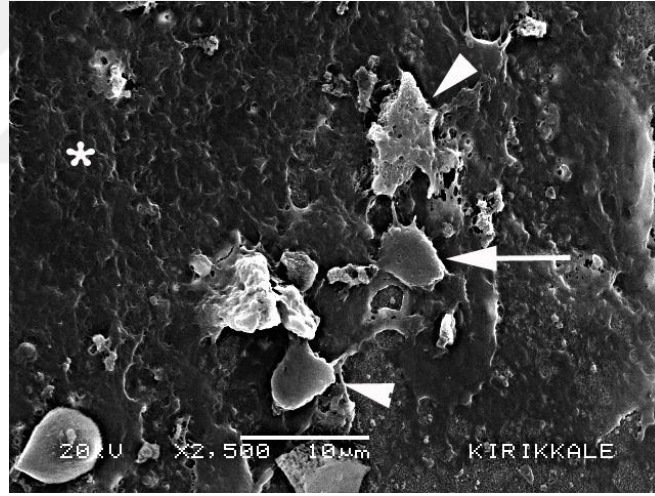
Beyaz ok biyomateriyal yüzeyine tutunan hücreyi göstermektedir. Hücre tutunması tam gerçekleşmemiştir. 20 kV, x2500 büyütme.

MB’ye ekim yapılan hücrelere ait 7. gün SEM incelemesinde MB yüzeyine tutunan hücrelerin morfolojilerinin yassılaştığı ve yer yer hücre uzantılarının olduğu görülmektedir (Şekil 3.23. ve Şekil 3.24.). Yassı hücre morfolojisi, hücrelerin ortama daha iyi uyum sağladığını ve iyi adapte olduğunu göstermektedir. MB’nin farklı bölgeleri incelendiğinde MB yüzeyine tutunan çok sayıda seferoid morfolojide MC3T3-E1 hücresi görülmektedir (Şekil 3.25.). Sadece YVS’de bekletilen bioglass’a ekim yapılan hücrelere ait 7. gün SEM incelemesinde kolonize olmuş sferoid morfolojide hücreler görülmektedir (Şekil 3.26.). Herhangi bir işlem uygulanmayan bioglass’a ekim yapılan hücrelere ait SEM incelemesinde az sayıda sferoid morfolojide hücrenin bioglass yüzeyine tutunduğu görülmektedir (Şekil 3.27.).



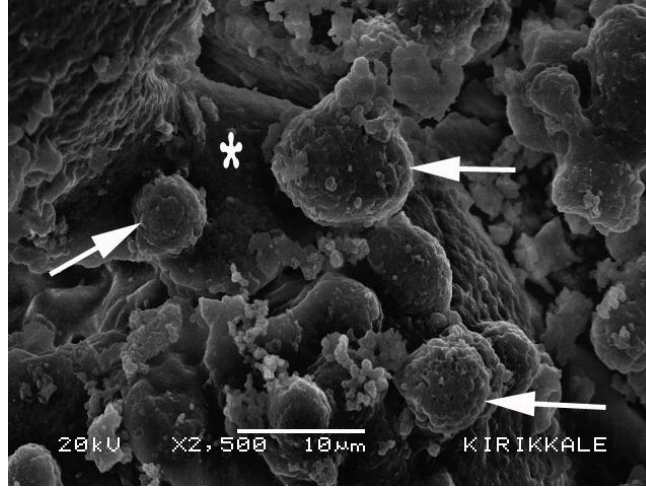
Şekil 3.23. Modifiye bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 7. günündeki SEM görüntüsü.

Beyaz ok biyomateryal yüzeyine tutunan hücreyi ve hücrenin uzantılarını göstermektedir. 20 kV, x5000 büyütme.



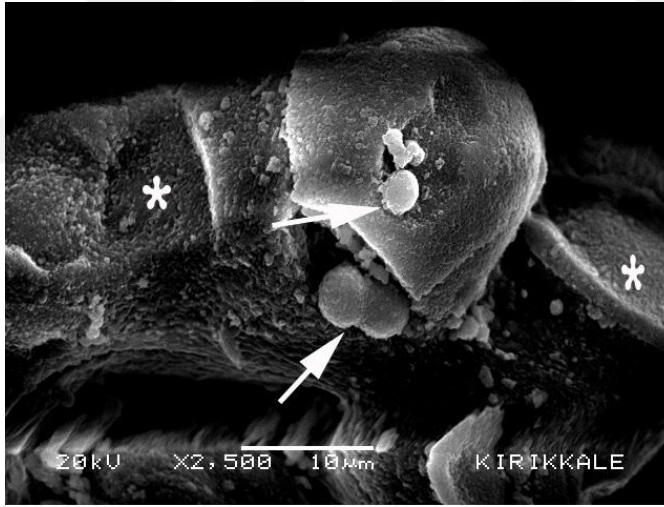
Şekil 3.24. Modifiye bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 7. günündeki SEM görüntüsü.

Beyaz ok biyomateryal yüzeyine tutunan ve uzantıları görülen yassı morfolojideki hücreyi, ok başları ise yüzeye tutunan ve yassı morfolojideki diğer hücreleri göstermektedir. 20 kV, x2500 büyütme.



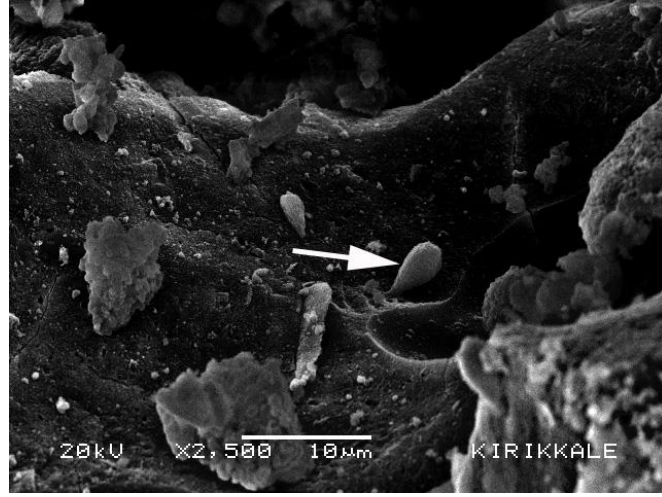
Şekil 3.25. Modifiye bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 7. günündeki SEM görüntüsü.

Beyaz oklar biyomateriyal yüzeyine tutunan çok sayıdaki sferoid morfolojili MC3T3-E1 hücrelerini, asteriks ise biyomateriyal yüzeyini göstermektedir. 20 kV, x2500 büyütme.



Şekil 3.26. Sadece YVS'de tutulan bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 7. günündeki SEM görüntüsü.

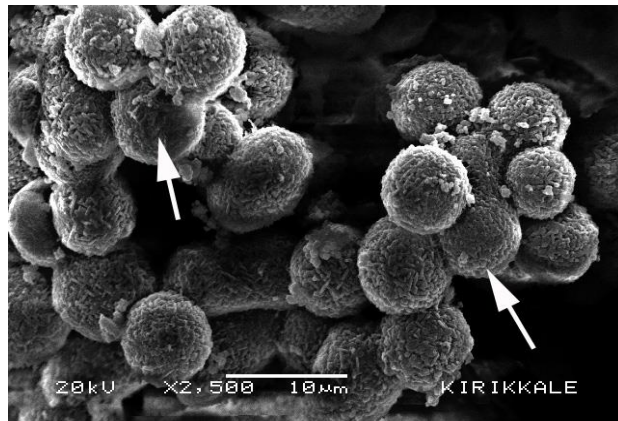
Beyaz oklar biyomateriyal yüzeyine tutunan hücreleri asteriks ise biyomateriyal yüzeyini göstermektedir. 20 kV, x2500 büyütme.



Şekil 3.27. Ham bioglass’a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 7. günündeki SEM görüntüsü.

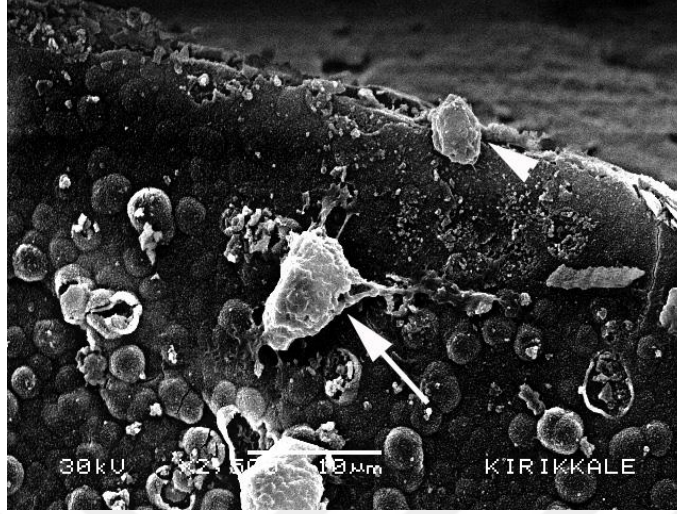
Beyaz ok biyomateriyal yüzeyine tutunan hücreyi göstermektedir. 20 kV, x2500 büyütme.

MB’ye ekim yapılan hücelere ait 14. gün SEM incelemesinde MB yüzeyinde çok sayıda sferoid morfolojili hüceler (Şekil 3.28.) ve farklı alanlarda yassı morfolojide ve uzantıları görülen hüceler gözlemlendi (Şekil 3.29). Sadece YVS’de bekletilen bioglass’a ekim yapılan hücelere ait 14. gün SEM incelemesinde biyomateriyal yüzeyine tutunan sferoid morfolojide hüceler görülmektedir (Şekil 3.30.). Herhangi bir işlem uygulanmayan bioglass’a ekim yapılan hücelere ait SEM incelemesinde az sayıda sferoid morfolojili hücrenin bioglass yüzeyine tutunduğu görülmektedir (Şekil 3.31.).



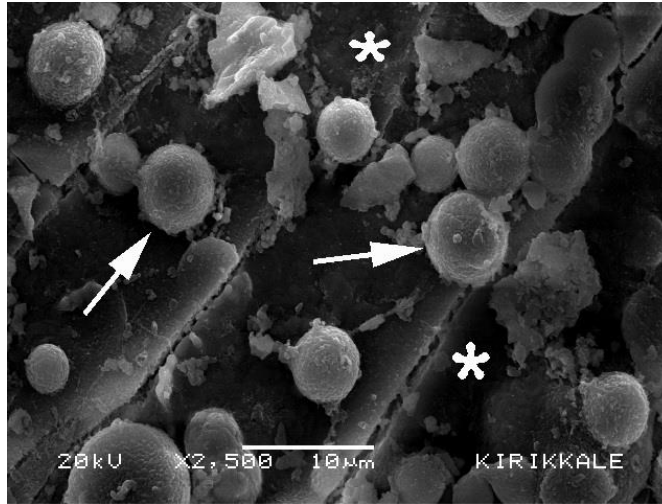
Şekil 3.28. Modifiye bioglass’a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 14. günündeki SEM görüntüsü.

Beyaz oklar biyomateriyal yüzeyine tutunan çok sayıdaki sferoid morfolojili MC3T3-E1 hücrelerini göstermektedir. 20 kV, x2500 büyütme.



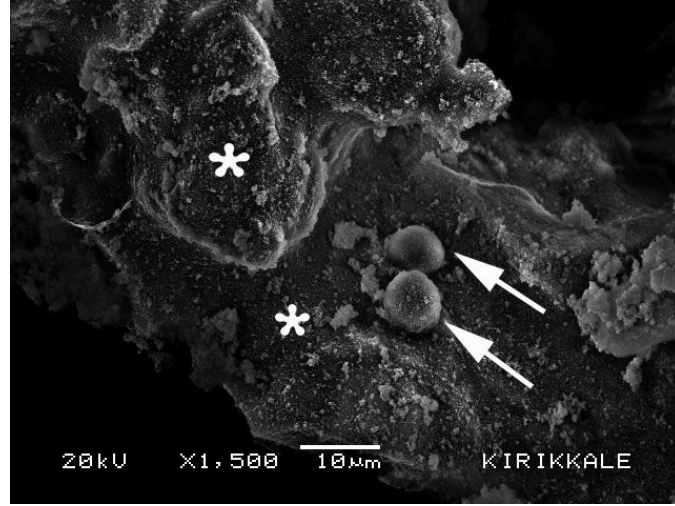
Şekil 3.29. Modifiye bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 14. günündeki SEM görüntüsü.

Beyaz ok biyomateriyal yüzeyine tutunan ve uzantıları görülen yassı morfolojideki hücreyi, ok başı ise yüzeye tutunan ve yassı morfolojideki başka bir hücreyi göstermektedir. 30 kV, x2500 büyütme.



Şekil 3.30. Sadece YVS'de tutulan bioglass'a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültivasyonun 14. günündeki SEM görüntüsü.

Beyaz oklar biyomateriyal yüzeyine tutunan hücreleri asteriks ise biyomateriyal yüzeyini göstermektedir. 20 kV, x2500 büyütme.



Şekil 3.31. İşlem uygulanmayan bioglass’a ekimi yapılan MC3T3-E1 hücresinin kültüvasyonun 14. günündeki SEM görüntüsü.

Beyaz oklar biyomateriyal yüzeyine tutunan hücreleri asteriks ise biyomateriyal yüzeyini göstermektedir. 20 kV, x1500 büyütme.

3.2.5. *In vitro* Alizarin Red S ile Boyama sonuçları

3.2.5.1. Modifiye Bioglass Üzerine Hücre Ekilerek Yapılan Alizarin Red S Sonuçları

Alizarin Red S ile kalsiyum birikimlerini göstermek amacıyla biyomateriyal üzerine hücre ekimi yapıldı. Modifiye bioglass’ı hem ilk sentez edilen bioglass ile hem de sadece YVS’de bekletilen bioglass ile karşılaştırarak değerdendirmeler yapıldı. Biyomateriyaller üzerine hücre ekimini takiben 3., 7. ve 14. günlerde Alizarin Red S ile kalsiyum birikimleri gösterildi (Şekil 3.32.-Şekil 3.43.).

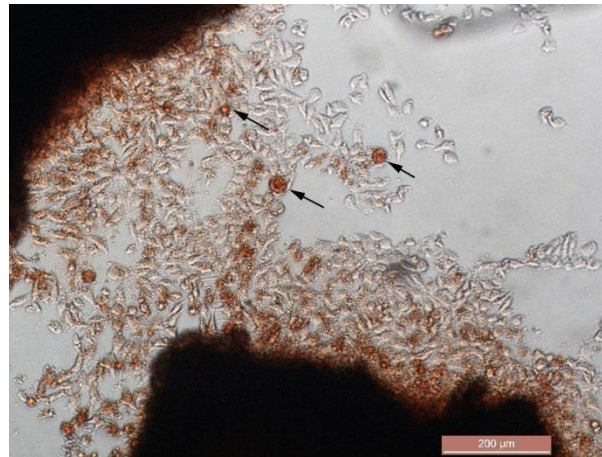
MB’ye ekim yapılan hücrelerin 3. gün Alizarin Red S boyamasına ait inverted mikroskop görüntüleri incelendiğinde kültür ortamında kalsiyum birikim alanları büyük oranda gözlenmektedir (Şekil 3.34.). Sadece YVS’de bekletilerek işlem gören bioglass’a ekim yapılan hücrelere ait Alizarin Red S boyaması sonucunda MB’ye oranla daha az kalsiyum birikim alanları görülmektedir (Şekil 3.35.). Herhangi bir işlem uygulanmayan ham bioglass’a ekim yapılan hücrelere ait Alizarin Red S boyamasında ise MB ve YVS’de işlem gören bioglass’a göre kalsiyum birikimlerinin daha az olduğu görülmektedir (Şekil 3.33.).

Aşağıda Alizarin Red S ile kalsiyum depozitlerini göstermek için yapılan boyama sonuçlarına ait fotoğraflar incelendiğinde, farklı gün grupları için (3, 7 ve 14. gün) biyomateryallere ekimi yapılan değerlendirmelerle birlikte iki boyutlu kültür ortamındaki boyama görüntülerine de yer verilmiştir. Üç boyutlu kültürle karşılaştırma amacı güdülmeyip sadece kalsiyum birikimlerinin çok daha az olduğu vurgulanmak istenmiştir. Her ne kadar semikantitatif bir değerlendirme olsa da bu durum üç boyutlu kültür şartlarının gerek hücre farklılaşması gerekse spesifik ekspresyonlar için daha elverişli olduğunu göstermektedir.



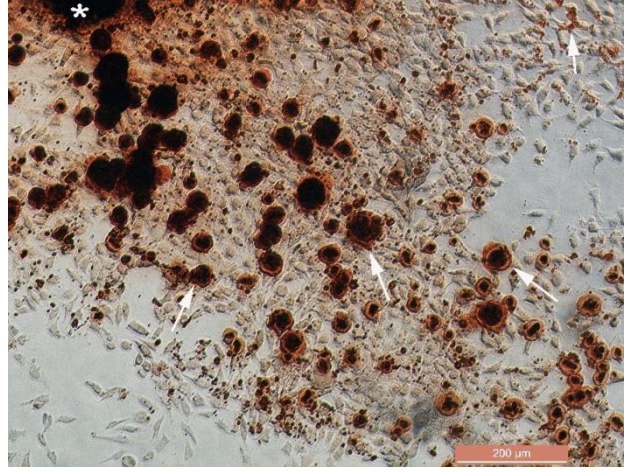
Şekil 3.32. MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu 2d kültür ortamında, kültürasyonun 3. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.

Kırmızı ile boyanan yapılar kalsiyum birikimlerini göstermektedir. x10 büyütme.



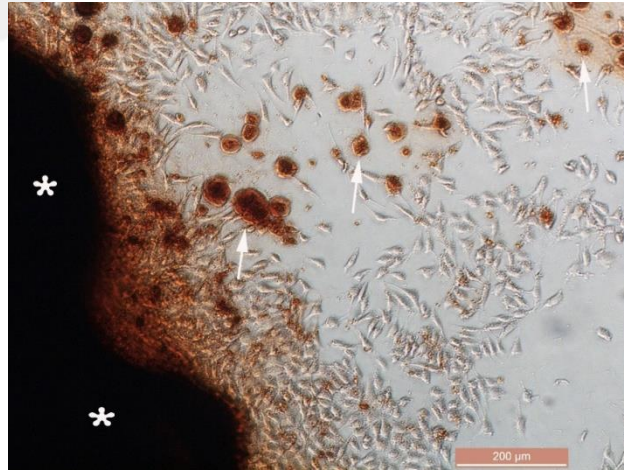
Şekil 3.33. Ham bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültürasyonun 3. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.

Beyaz oklar ortamdaki kalsiyum birikimlerini göstermektedir. x10 büyütme.



Şekil 3.34. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 3. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.

Beyaz oklar ortamdaki kalsiyum birikimlerini, asteriks ise biyomateryali göstermektedir. x10 büyütme.

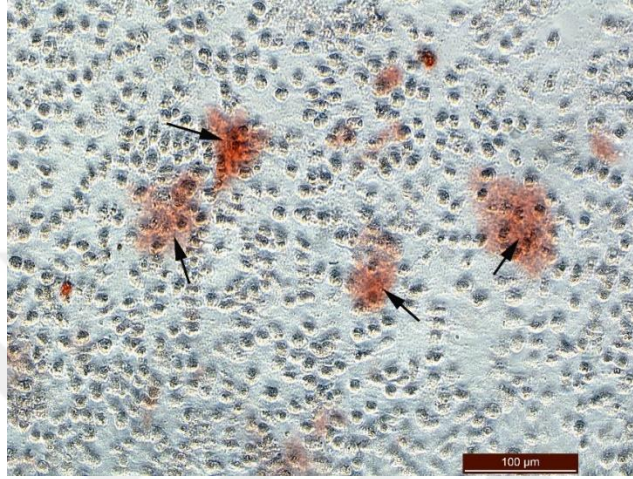


Şekil 3.35. YVS’de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 3. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.

Beyaz oklar ortamdaki kalsiyum birikimlerini, asteriks ise biyomateryali göstermektedir. x10 büyütme.

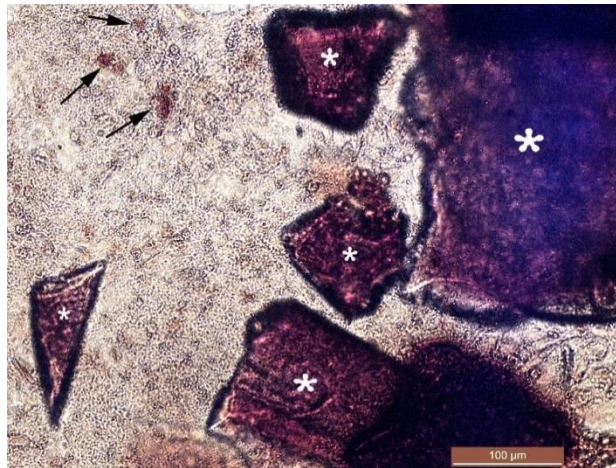
Kültivasyonun 7. ve 14. günlerinde yapılan Alizarin Red S boyamaları incelendiğinde, MB’ye ekimi yapılan kültür ortamındaki kalsiyum birikimleri ile

YVS'de işlem gören bioglass ve ham haldeki bioglass'a ekimi yapılan kültür ortamındaki kalsiyum birikimleri karşılaştırıldığında, MB'nin göreceli olarak daha iyi boyandığı görülmektedir (Şekil 3.37.- Şekil 3.43.). Bu durum ise MB üzerine ekim yapılan kültür ortamında kalsiyum birikiminin daha fazla olduğuna işaret etmektedir. Ancak karşılaştırmanın daha objektif olması amacıyla Alizarin Red S ile kalsiyum birikimi kolorimetrik olarak da gösterilmiştir.



Şekil 3.36. MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu iki boyutlu kültür ortamında, kültürasyonun 7. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.

Siyah oklar ortamdaki kalsiyum birikimlerini göstermektedir. x20 büyütme.



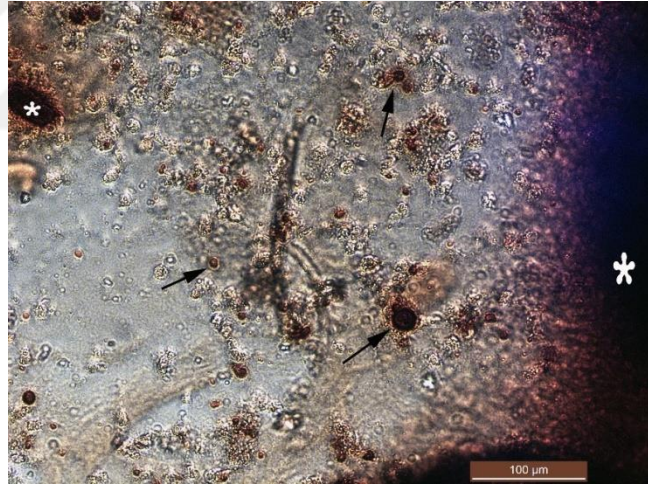
Şekil 3.37. Ham bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültürasyonun 7. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.

Siyah oklar ortamdaki kalsiyum birikimlerini, asteriksler ise biyomateryali göstermektedir. x20 büyütme.



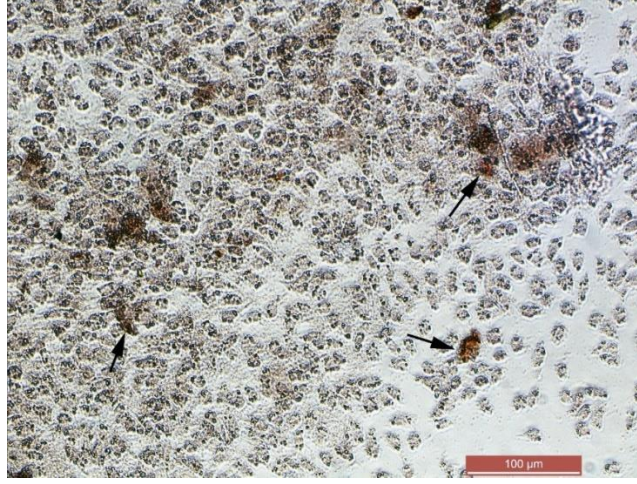
Şekil 3.38. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 7. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.

Siyah oklar ortamdaki kalsiyum birikimlerini, asteriks ise biyomateriyali göstermektedir. x20 büyütme.



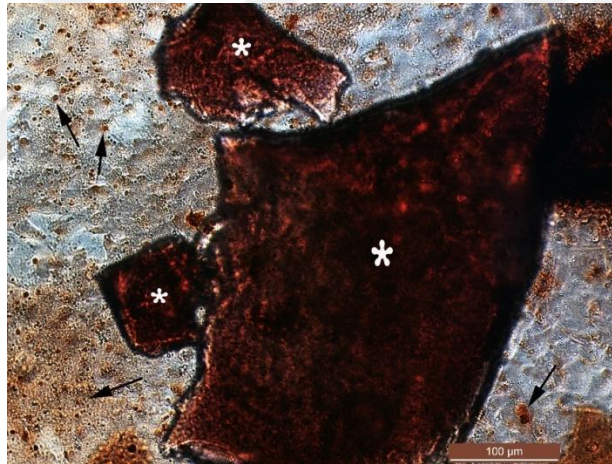
Şekil 3.39. YVS’de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 7. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.

Siyah oklar ortamdaki kalsiyum birikimlerini, asteriksler ise biyomateriyali göstermektedir. x20 büyütme.



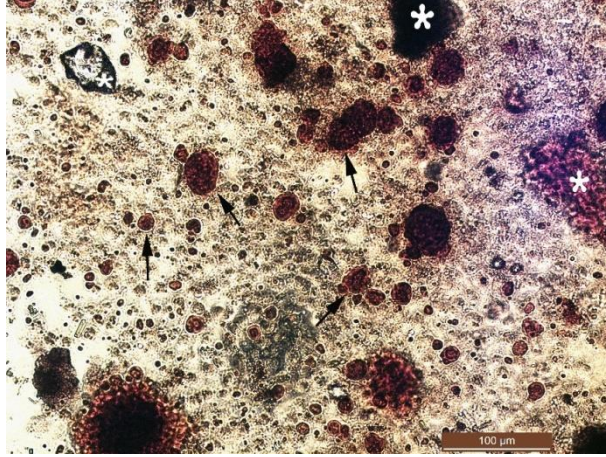
Şekil 3.40. MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu iki boyutlu kültür ortamında, kültivasyonun 14. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.

Siyah oklar ortamdaki kalsiyum birikimlerini göstermektedir. x20 büyütme.



Şekil 3.41. İşlem görmemiş bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 14. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.

Siyah oklar ortamdaki kalsiyum birikimlerini, asteriksler ise biyomateryali göstermektedir. x20 büyütme.



Şekil 3.42. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 14. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.

Siyah oklar ortamdaki kalsiyum birikimlerini, asteriksler ise biyomateryali göstermektedir. x20 büyütme.



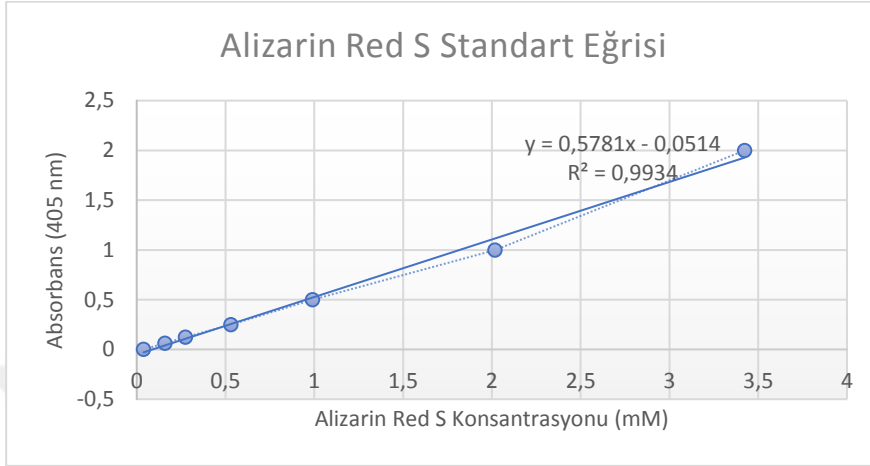
Şekil 3.43. YVS’de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 14. gününde yapılan Alizarin Red S boyaması ile kalsiyum birikimlerinin gösterilmesi.

Siyah oklar ortamdaki kalsiyum birikimlerini, asteriks ise biyomateryali göstermektedir. x20 büyütme.

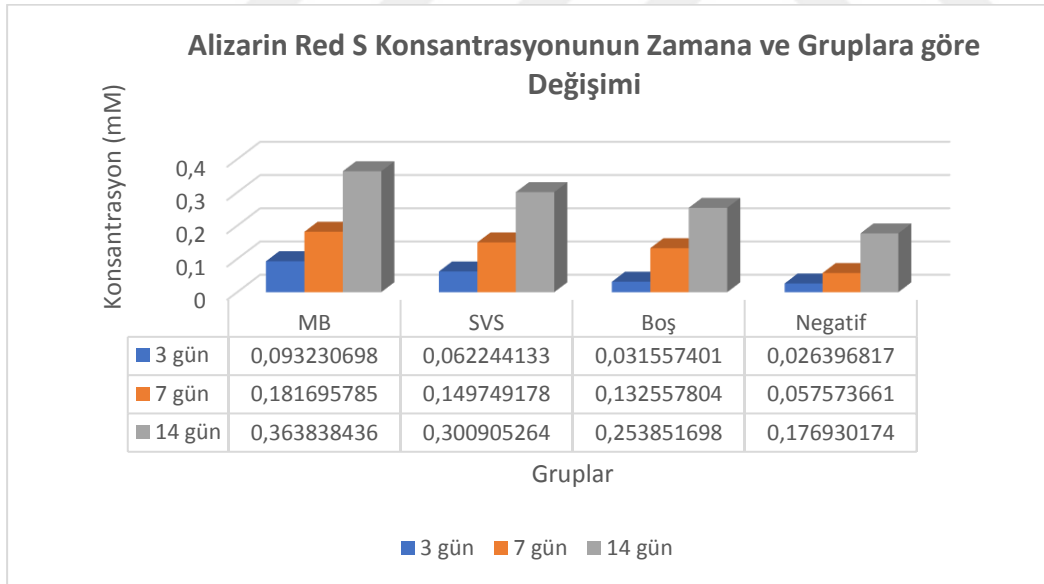
3.2.5.2. Kolorimetrik Yöntemle Alizarin Red S Boyama Sonuçları

Alizarin Red S ile kalsiyum birikimlerinin kolorimetrik olarak gösterilmesi amacıyla MB’nin, YVS’de işlem gören bioglass’ın ve ham haldeki bioglass’ın ekstraksiyon yöntemine göre özütü elde edilerek 2 boyutlu kültür ortamında MC3T3-E1 hücrelerine 3, 7 ve 14 gün olmak üzere uygulamaları yapıldı. Kültivasyon bitiminde

Alizarin Red S ile boyanarak eliza okuyucuda absorbans değerleri belirlendi. Elde edilen ham veriler Alizarin Red için hazırlanan standart (Şekil 3.34.) ile karşılaştırılarak mM cinsinden değerler belirlendi (Şekil 3.45. ve Çizelge 3.6.) ve gruplar arası istatistik karşılaştırmalar yapıldı (Çizelge 3.7.).



Şekil 3.44. Alizarin Red S Standart eğrisi ve regresyon denklemi.



Şekil 3.45. Alizarin Red S konsantrasyonunun zamana ve gruplara göre değişimi.

MB; modifiye bioglass, SVS; Yapay vücut sıvında bekletilen bioglass, Boş; ham bioglass. Değerler ortalama olarak verilmiştir.

Çizelge 3.6. *In vitro* Alizarin Red S konsantrasyonunun gruplara ve zamana bağlı değişimi.

	Modifiye Bioglass	YVS'de İşlem Gören	Ham Bioglass	Negatif
3 Gün	0,09 ± 0,015	0,06 ± 0,012	0,03 ± 0,005	0,02 ± 0,002
7 Gün	0,18 ± 0,011	0,14 ± 0,006	0,13 ± 0,009	0,05 ± 0,004
14 Gün	0,36 ± 0,012	0,30 ± 0,006	0,25 ± 0,010	0,17 ± 0,005

*Değerler ortalama ± std. mM olarak verilmiştir.

Alizarin Red S konsantrasyonunun kolorimetrik yöntemle belirlemek için kültivasyonun 3. gününde yapılan boyama sonuçlarına ait spektrofotometrik ölçümleri istatistik olarak karşılaştırıldığında, modifiye bioglass ile YVS'de işlem gören bioglass arasında istatistik olarak anlamlı bir fark olmadığı görülürken (Çizelge 3.7.); modifiye bioglass'ın ham bioglass'tan ve negatif kontrolden istatistik olarak anlamlı şekilde farklı olduğu görülmektedir (Çizelge 3.7.). Çizelge 3.6.'da verilen Alizarin Red S konsantrasyonunun gruplara ve zamana bağlı değişimi incelendiğinde, MB grubunun 3, 7 ve 14. gün ölçümlerinde kalsiyum birikimlerine ait absorbans değerlerinin diğer gruplardan daha yüksek olduğu görülmektedir.

Alizarin Red S konsantrasyonunun kültivasyonun 7. ve 14. günlerdeki ölçümleri istatistik olarak karşılaştırıldığında, MB'nin YVS'de işlem gören bioglass'tan ve ham bioglass'tan istatistik olarak anlamlı şekilde farklı olduğu görülmektedir (Çizelge 3.8.-3.9.). Bu durum ise modifiye bioglass özütünün YVS'de işlem gören bioglass ve ham bioglass özütlerinden *in vitro* olarak kalsiyum birikimi açısından daha üstün olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.7. *In vitro* Alizarin Red S konsantrasyonunun kültivasyonun 3. gününde gruplara ve zamana bağlı karşılaştırması

3 Gün	Modifiye Bioglass	YVS'de İşlem Gören Bioglass	Ham Bioglass	Negatif
Modifiye Bioglass	-	0,069	0,039 *	0,035 *
YVS'de işlem gören Bioglass	0,069	-	0,061	0,033 *
Ham Bioglass	0,039 *	0,061	-	0,21

*Gruplar arasındaki fark anlamlı

-Tabloda verilen değerler hesaplanan 'p' değerleridir.

Çizelge 3.8. *In vitro* Alizarin Red S konsantrasyonunun kültivasyonun 7. gününde gruplara ve zamana bağlı karşılaştırması

7 Gün	Modifiye Bioglass	YVS'de İşlem Gören Bioglass	Ham Bioglass	Negatif
Modifiye Bioglass	-	0,007033 *	0,000112 *	<0,0001 *
YVS'de işlem gören Bioglass	0,007033 *	-	0,031063 *	<0,0001 *
Ham Bioglass	0,000112 *	0,031063 *	-	<0,0001 *

*Gruplar arasındaki fark anlamlı

-Tabloda verilen değerler hesaplanan 'p' değerleridir.

Çizelge 3.9. *In vitro* Alizarin Red S konsantrasyonunun kültivasyonun 14. gününde gruplara ve zamana bağlı karşılaştırması

14 Gün	Modifiye Bioglass	YVS'de İşlem Gören Bioglass	Ham Bioglass	Negatif
Modifiye Bioglass	-	0,000338 *	<0,0001 *	<0,0001 *
YVS'de işlem gören Bioglass	0,000338 *	-	0,000455 *	<0,0001 *
Ham Bioglass	<0,0001 *	0,000455 *	-	<0,0001 *

*Gruplar arasındaki fark anlamlı

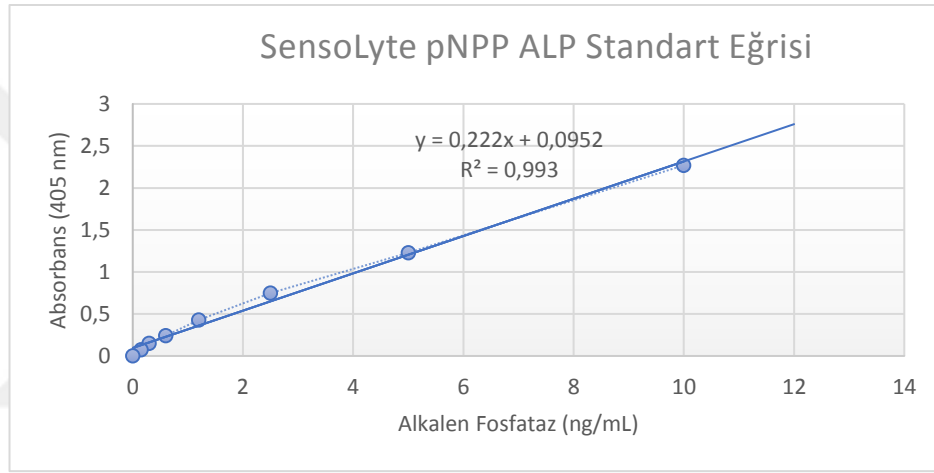
-Tabloda verilen değerler hesaplanan 'p' değerleridir.

3.2.6. *In vitro* ALP Aktivite Testi Sonuçları

ALP aktivitesinin kolorimetrik olarak gösterilmesi amacıyla MB'nin, YVS'de işlem gören bioglass'ın ve ham haldeki bioglass'ın ekstraksiyon yöntemine göre özütü elde edilerek 2 boyutlu kültür ortamında MC3T3-E1 hücrelerine 3, 7 ve 14 gün olmak üzere uygulamaları yapıldı. Kültivasyon bitiminde ALP test kiti protokolüne göre uygulamalar yapılarak eliza okuyucuda absorbans değerleri belirlendi. Elde edilen ham veriler ALP için hazırlanan standart (Şekil 3.46.) ile karşılaştırılarak ölçüm verilerinin ng/mL cinsinden değerleri belirlendi (Şekil 3.47. ve Çizelge 3.10.) ve gruplar arası istatistik karşılaştırmalar yapıldı (Çizelge 3.11., 3.12. ve 3.13.).

In vitro ALP aktivitesi sonuçları incelendiğinde MB grubunun ALP aktivitesinin 3, 7 ve 14. günlerde YVS'de bekletilen bioglass ve ham bioglass gruplarından daha yüksek olduğu görülmektedir. Farklı günlerdeki gruplar arası karşılaştırmalara bakıldığında MB ile ham bioglass için yapılan karşılaştırmalarda MB'nin 3, 7 ve 14.

günlerde ALP aktivitesinin ham bioglass grubundan daha yüksek olduğu, bu durumun istatistik olarak anlamlı olduğu görülmektedir (Çizelge 3.11., 3.12. ve 3.13.). MB'nin YVS'de bekletilen bioglass grubu ile yapılan karşılaştırmalarında kültürasyonun 3. gününe ait ALP aktivitesinin MB grubunda daha yüksek olduğu ancak istatistik olarak farkın anlamlı olmadığı görülmektedir (Çizelge 3.11.). 7. güne ait karşılaştırmada MB'nin daha yüksek ALP aktivitesi gösterdiği ancak istatistik olarak farkın anlamlı olmasa da hesaplanan 'p' değeri ($p=0,055$) dikkate değer görülmektedir (Çizelge 3.12.). 14. güne ait karşılaştırmada ise MB'nin daha yüksek ALP aktivitesi gösterdiği ve aradaki farkın istatistik olarak anlamlı olduğu görüldü (Çizelge 3.13.).



Şekil 3.46. SensoLyte pNPP ALP test kiti standart eğrisi ve regresyon denklemi.



Şekil 3.47. ALP aktivitesinin gruplara ve zamana bağlı değişimi.

MB; modifiye bioglass, SVS; Yapay vücut sıvında bekletilen bioglass, Boş; ham bioglass. Değerler ortalama olarak verilmiştir.

Çizelge 3.10. *In vitro* ALP aktivitesinin gruplara ve zamana bağlı değişimi.

	Modifiye Bioglass	YVS'de İşlem Gören	Ham Bioglass	Negatif
3 Gün	2,053 ± 0,46	1,656 ± 0,502	0,920 ± 0,163	0,640 ± 0,20
7 Gün	2,10 ± 0,503	1,711 ± 0,312	1,221 ± 0,298	0,957 ± 0,14
14 Gün	2,893 ± 0,514	1,942 ± 0,718	1,542 ± 0,28	1,33 ± 0,38

*Değerler ortalama ± std. ng/mL olarak verilmiştir.

Çizelge 3.11. *In vitro* ALP aktivitesinin kültivasyonun 3. gününde gruplara ve zamana bağlı karşılaştırması

3 Gün	Modifiye Bioglass	YVS'de İşlem Gören Bioglass	Ham Bioglass	Negatif
Modifiye Bioglass	-	0,228	0,008 *	0,003 *
YVS'de işlem gören Bioglass	0,228	-	0,027 *	0,009 *
Ham Bioglass	0,0089 *	0,0272 *	-	0,001 *

*Gruplar arasındaki fark anlamlı

-Tabloda verilen değerler hesaplanan 'p' değerleridir.

Çizelge 3.12. *In vitro* ALP aktivitesinin kültivasyonun 7. gününde gruplara ve zamana bağlı karşılaştırması

7 Gün	Modifiye Bioglass	YVS'de İşlem Gören Bioglass	Ham Bioglass	Negatif
Modifiye Bioglass	-	0,055	0,0035 *	0,007 *
YVS'de işlem gören Bioglass	0,055	-	0,030 *	0,006 *
Ham Bioglass	0,0035 *	0,030 *	-	0,14

*Gruplar arasındaki fark anlamlı.

-Tabloda verilen değerler hesaplanan 'p' değerleridir.

Çizelge 3.13. *In vitro* ALP aktivitesinin kültivasyonun 14. gününde gruplara ve zamana bağlı karşılaştırması

14 Gün	Modifiye Bioglass	YVS'de İşlem Gören Bioglass	Ham Bioglass	Negatif
Modifiye Bioglass	-	0,036 *	0,010 *	0,002 *
YVS'de işlem gören Bioglass	0,036 *	-	0,33	0,046 *
Ham Bioglass	0,010 *	0,33	-	0,34

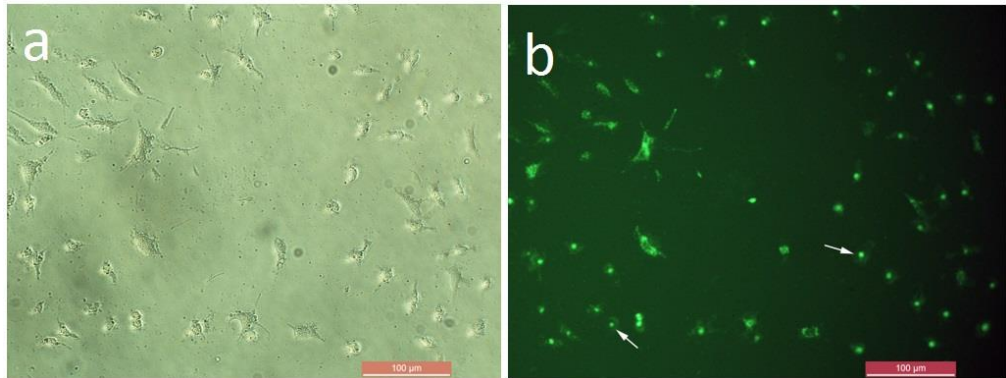
*Gruplar arasındaki fark anlamlı

-Tabloda verilen değerler hesaplanan 'p' değerleridir.

3.2.7. Calcein AM ile Canlılığın Gösterilmesi

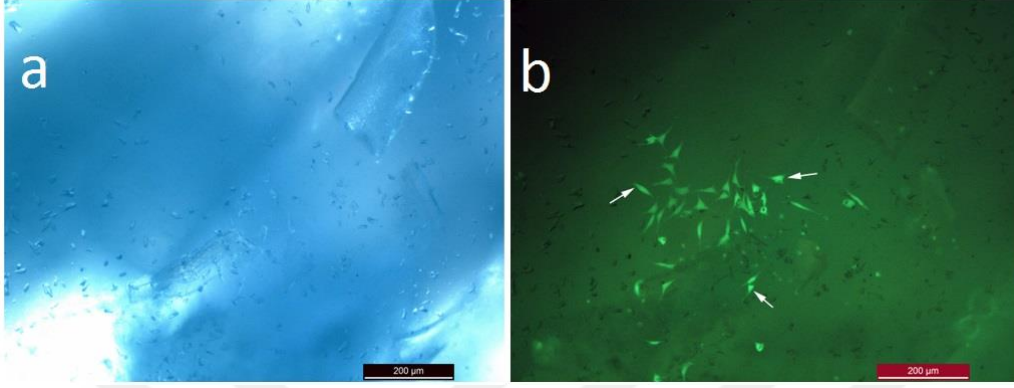
In vitro olarak hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla MB'nin, YVS'de işlem gören bioglass'ın ve ham haldeki bioglass'ın üzerine ekimi yapılan hücrelere ait kültivasyonun 3., 7., ve 14. günlerinde Calcein AM ile yapılan boyama sonuçları inverted mikroskopta floresan ışık altında değerlendirildi.

MB üzerine ekimi yapılan hücrelerde kültivasyonun 3., 7. ve 14. günlerinde yapılan Calcein AM boyama sonuçlarına bakıldığında hücrelerin büyük oranda canlılıklarını devam ettirdikleri ve hücre morfolojilerinin fibroblast benzeri olmayıp yuvarlak morfolojide olduğu gözlemlendi (Şekil 3.50., Şekil 3.54., Şekil 3.58. ve Şekil 3.59.). Sadece YVS'de işlem gören bioglass'a ekimi yapılan hücrelerin canlılığını devam ettirdiği ancak bazı bölgelerde fibroblast benzeri morfoloji gösteren hücrelerin varlığı gözlemlendi (Şekil 3.51., Şekil 3.55., Şekil 3.60. ve Şekil 3.61.). Ham bioglass üzerine ekimi yapılan hücrelere ait boyamalarda ise hücre canlılığının 3. günden 14. güne gidildikçe azaldığı ve fibroblast benzeri hücre morfolojileri gözlemlendi (Şekil 3.49., Şekil 3.53. ve Şekil 3.57.).



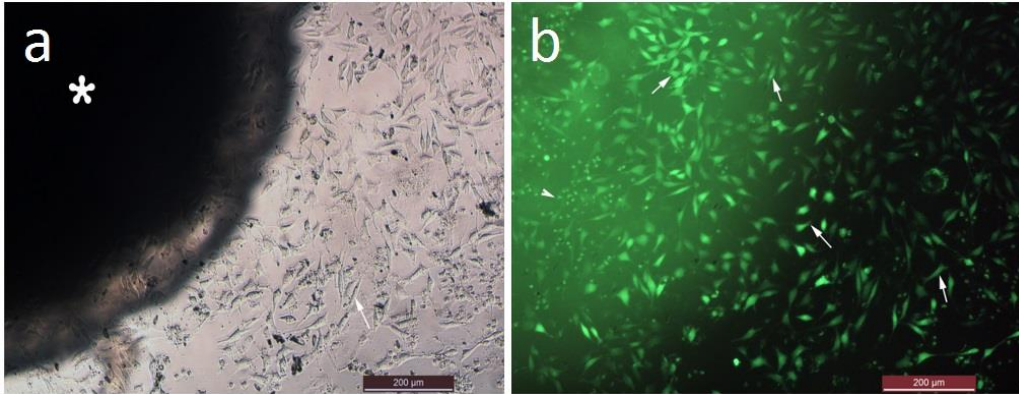
Şekil 3.48. MC3T3-E1 hücrelerinin 2d kültür ortamında, kültivasyonun 3. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.

A'da inverted mikroskopta filtresiz olarak görülen alanın B'de floresan filtredeki görüntüsü bulunmaktadır. B'de beyaz oklar apoptoza giren hücreleri göstermektedir x10 büyütme.



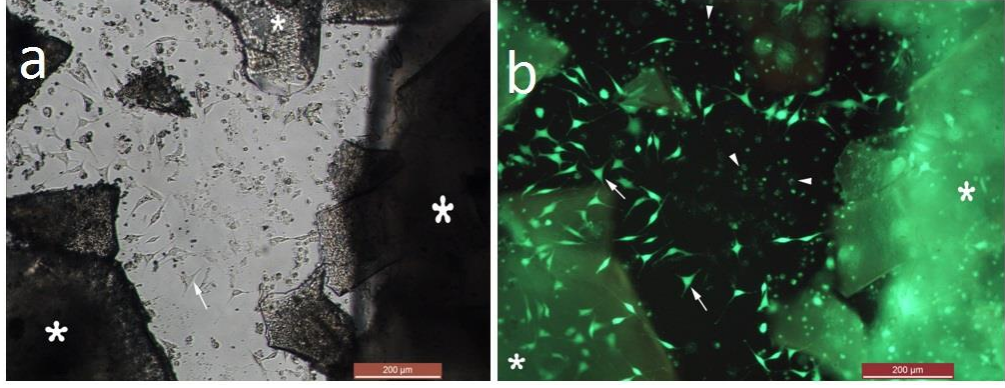
Şekil 3.49. Ham bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 3. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.

A'da inverted mikroskopta filtresiz olarak görülen alanın B'de floresan filtredeki görüntüsü bulunmaktadır. B'de beyaz oklar canlılığını devam ettiren hücreleri göstermektedir. x10 büyütme.



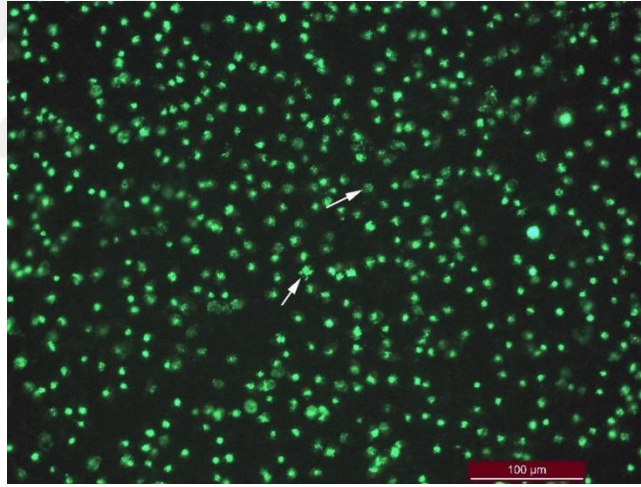
Şekil 3.50. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 3. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.

A'da inverted mikroskopta filtresiz olarak görülen alanın B'de floresan filtredeki görüntüsü bulunmaktadır. A'daki asteriks biyomateryali; B'de beyaz oklar canlılığını devam ettiren çok sayıdaki hücreleri, ok başı ise apoptozdaki hücreleri göstermektedir. x10 büyütme.



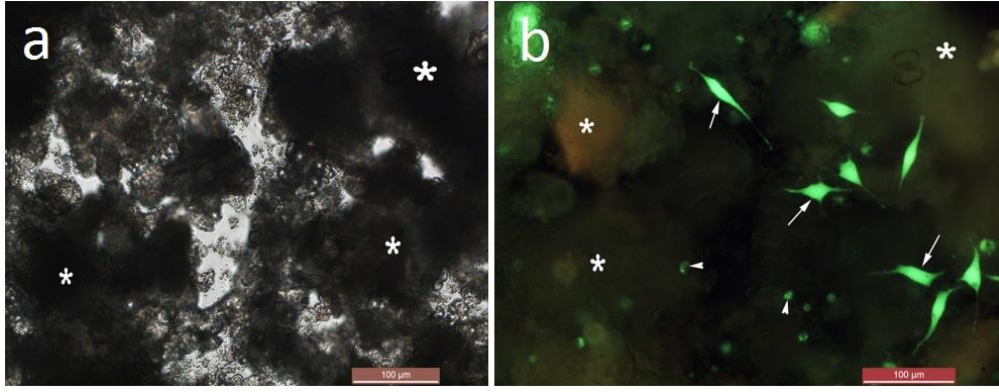
Şekil 3.51. YVS’de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 3. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.

A’da inverted mikroskopta filtresiz olarak görülen alanın B’de floresan filtredeki görüntüsü bulunmaktadır. A ve B’de asteriksler biyomateryali; B’de beyaz oklar canlılığını devam ettiren hücreleri, ok başı ise apoptozdaki hücreleri göstermektedir. x10 büyütme.



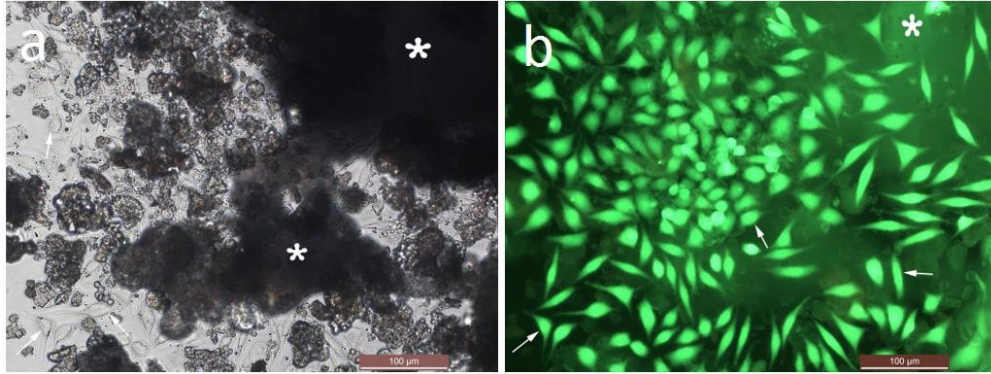
Şekil 3.52. MC3T3-E1 hücrelerinin 2d kültür ortamında, kültivasyonun 7. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.

Kültür ortamının floresan filtredeki görüntüsünde, beyaz oklar apoptoza giren çok sayıdaki hücrelerden bazılarını göstermektedir. x20 büyütme.



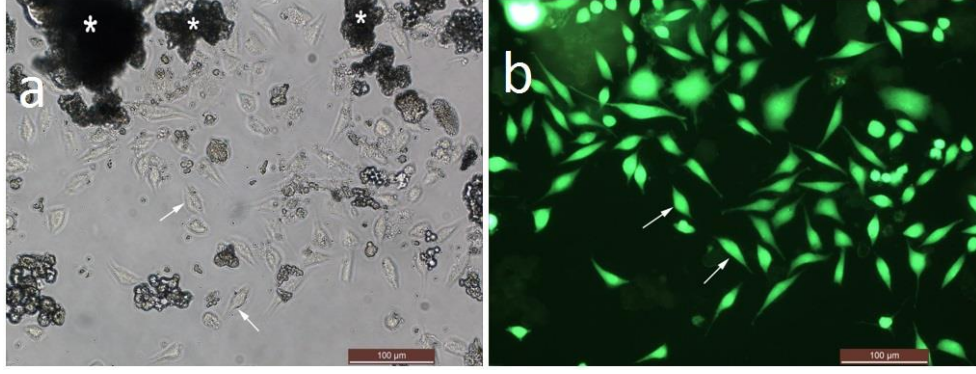
Şekil 3.53. Ham bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 7. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.

A'da inverted mikroskopta filtresiz olarak görülen alanın B'de floresan filtredeki görüntüsü bulunmaktadır. B'de beyaz oklar canlılığını devam ettiren az sayıdaki hücreleri, ok başı apoptozdaki hücreleri, asteriks ise biyomateryali göstermektedir. x20 büyütme.



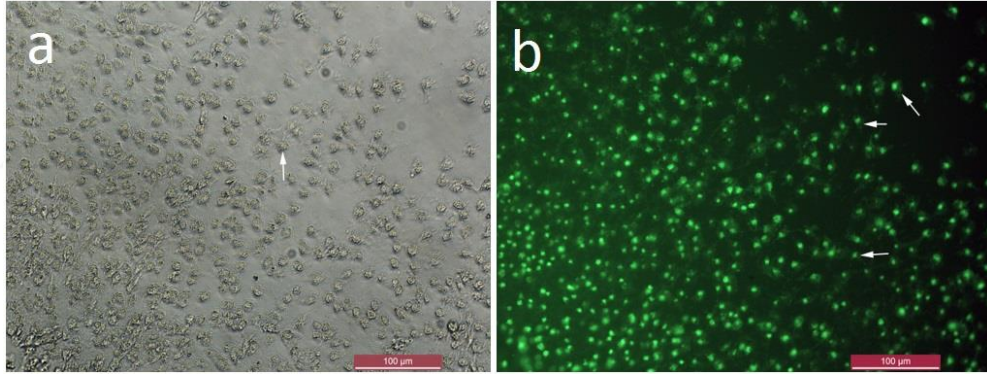
Şekil 3.54. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 7. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.

A'da inverted mikroskopta filtresiz olarak görülen alanın B'de floresan filtredeki görüntüsü bulunmaktadır. A'daki asteriks biyomateryali; B'de beyaz oklar canlılığını devam ettiren çok sayıdaki hücreleri, asteriks ise biyomateryali göstermektedir. x20 büyütme.



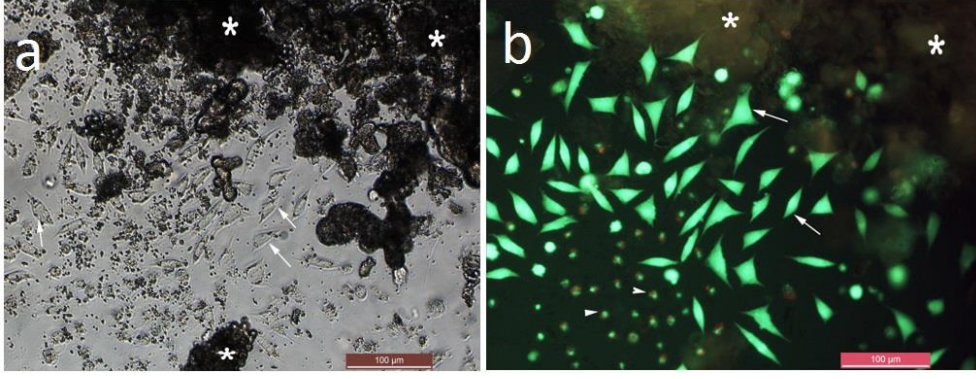
Şekil 3.55. YVS’de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 7. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.

A’da inverted mikroskopta filtresiz olarak görülen alanın B’de floresan filtredeki görüntüsü bulunmaktadır. A’da asteriksler biyomateriyali; B’de beyaz oklar canlılığını devam ettiren hücreleri göstermektedir. x20 büyütme.



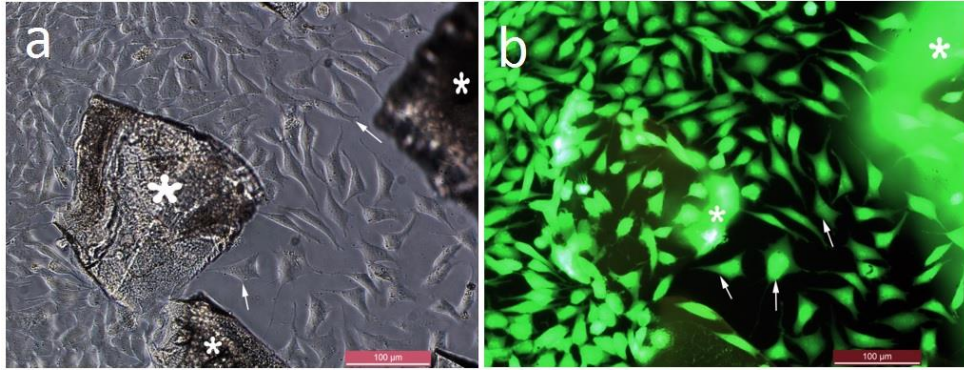
Şekil 3.56. MC3T3-E1 hücrelerinin 2d kültür ortamında, kültivasyonun 14. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.

A’da inverted mikroskopta filtresiz olarak görülen alanın B’de floresan filtredeki görüntüsü bulunmaktadır. B’de beyaz oklar apoptoza giren hücreleri göstermektedir x20 büyütme.



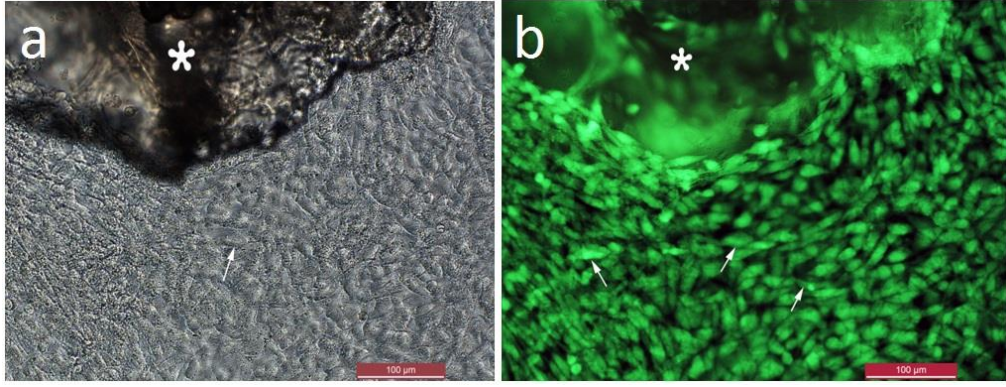
Şekil 3.57. Ham bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 14. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.

A'da inverted mikroskopta filtresiz olarak görülen alanın B'de floresan filtredeki görüntüsü bulunmaktadır. B'de beyaz oklar canlılığını devam ettiren az sayıdaki hücreleri, ok başları nekrozdaki hücreleri, asteriksler ise biyomateryali göstermektedir. x20 büyütme.



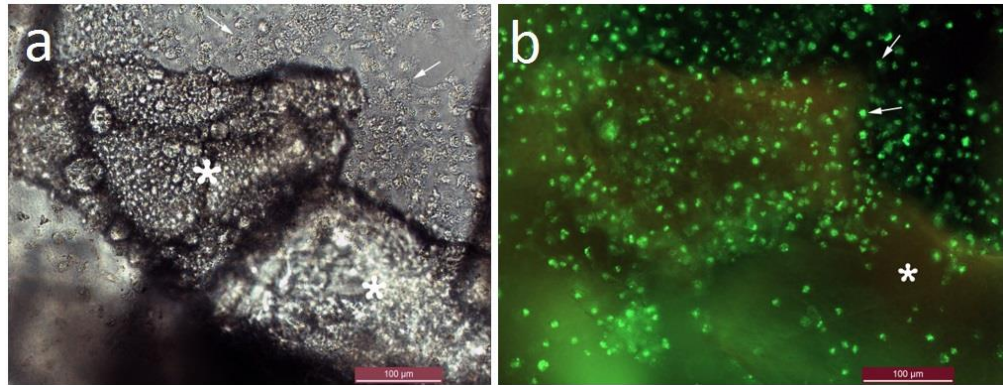
Şekil 3.58. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 14. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.

A'da inverted mikroskopta filtresiz olarak görülen alanın B'de floresan filtredeki görüntüsü bulunmaktadır. A'daki asteriks biyomateryali; B'de beyaz oklar canlılığını devam ettiren çok sayıdaki hücreleri, asteriks ise biyomateryali göstermektedir. x20 büyütme.



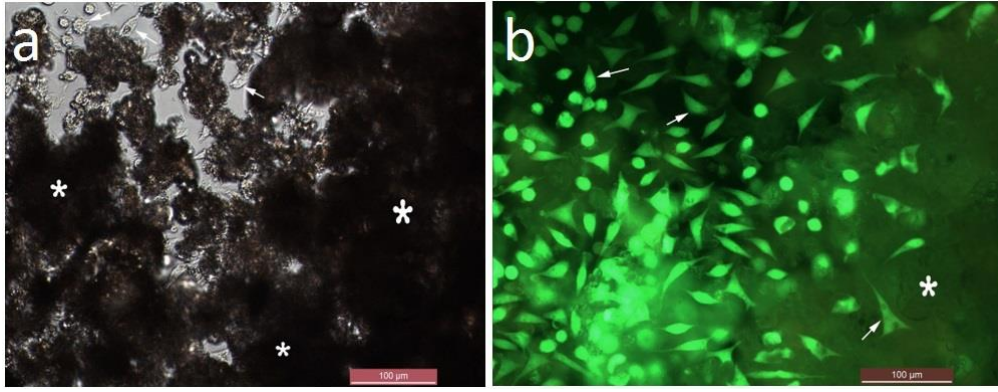
Şekil 3.59. Modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 14. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.

A'da inverted mikroskopta filtresiz olarak görülen alanın B'de floresan filtredeki görüntüsü bulunmaktadır. A'daki asteriks biyomateryali; B'de beyaz oklar canlılığını devam ettiren çok sayıdaki hücreleri, asteriks ise biyomateryali göstermektedir. x20 büyütme.



Şekil 3.60. YVS'de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültivasyonun 14. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.

A'da inverted mikroskopta filtresiz olarak görülen alanın B'de floresan filtredeki görüntüsü bulunmaktadır. A'da asteriks biyomateryali; B'de beyaz oklar apoptozdaki hücreleri, asteriks ise biyomateryali göstermektedir. x20 büyütme.

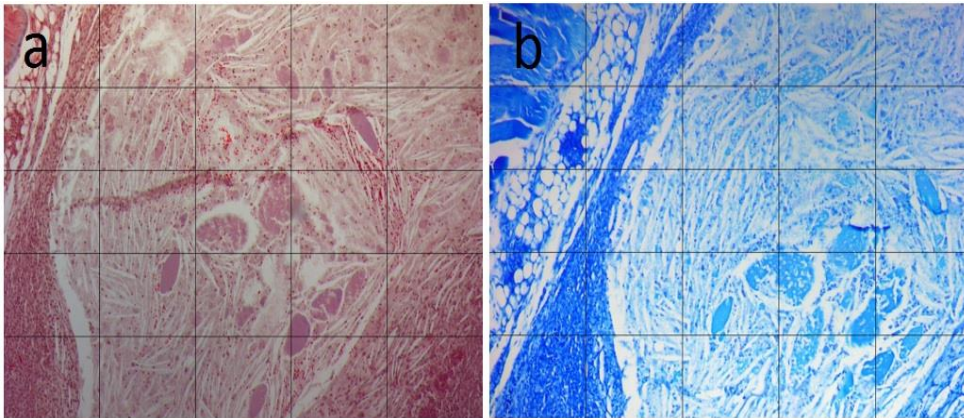


Şekil 3.61. YVS’de işlem gören bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin bulunduğu kültür ortamında, kültüvasyonun 14. gününde yapılan Calcein AM/PI boyaması ile hücre canlılığının gösterilmesi.

A’da inverted mikroskopta filtresiz olarak görülen alanın B’de floresan filtredeki görüntüsü bulunmaktadır. A’da asteriksler biyomateriyali; B’de beyaz oklar canlılığını devam ettiren hücreleri, asteriks ise biyomateriyali göstermektedir. x20 büyütme.

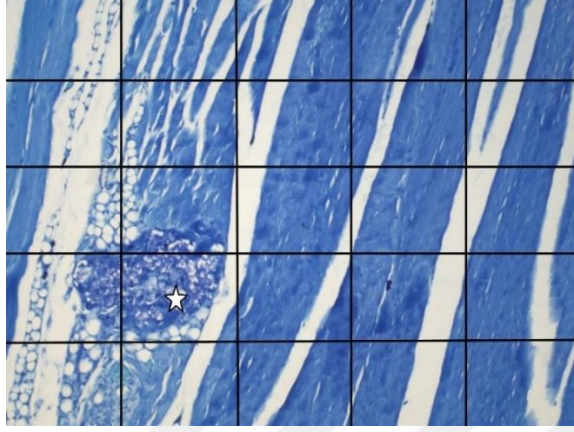
3.3. Osteoindüktif Potansiyel Testi Sonuçları

ASTM F2529-13 standardına göre yapılan osteoindüktif potansiyel testinde MB’nin %16,04 oranında osteoindüktivite gösterdiği hesaplanmıştır. Test sonucu standartta belirtilen skalada ‘2’ puana karşılık geldiğinden osteoindüktif potansiyeli açısından olumlu olarak değerlendirilmektedir. Test sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan histolojik fotoğraflar ve hesaplamalara ait açıklamalar aşağıda verilmektedir.



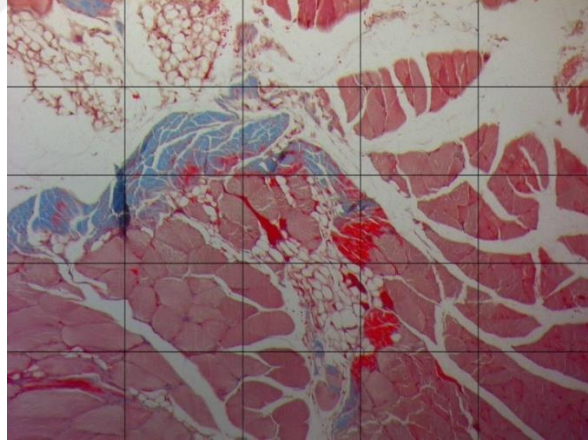
Şekil 3.62. Osteoindüktif potansiyel testinin değerlendirilmesinde kullanılan histolojik boyamalara ait görüntüler.

İmplantasyon bölgesinden alınan kesitlerde A’da Masson’un üçlü boyası ile boyanan aynı bölgenin B’de toluidine mavisi ile boyanan görüntüsü bulunmaktadır. Değerlendirmeye esas preparatların 25 gride bölündüğü görülmektedir. x10 büyütme.



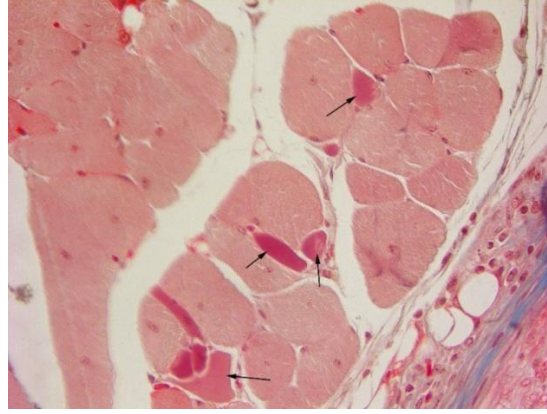
Şekil 3.63. OİP testinin değerlendirilmesinde kullanılan toluidine mavisi ile boyanmış histolojik preparata ait görüntü.

25 grid’e bölünen fotoğrafta görülen yıldızla işaretli alan kondrojenik aktivite olan bölgeyi göstermektedir. x10 büyütme.



Şekil 3.64. OİP testinin değerlendirilmesinde kullanılan Masson’un üçlü boyası ile boyanmış histolojik preparata ait görüntü.

25 grid’e bölünen fotoğrafta iskelet kasları arasında görülen koyu kırmızı alanlar kalsifiye bölgeleri göstermektedir. x10 büyütme.



Şekil 3.65. OİP testinin değerlendirilmesinde kullanılan Masson'un üçlü boyası ile boyanmış histolojik preparata ait görüntü.

İskelet kasları arasında görülen koyu kırmızı alanlar (siyah oklar) kalsifiye bölgeleri göstermektedir. x10 büyütme.

Osteoindüktif potansiyelin değerlendirilmesinde aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{OİP}^* = (\text{Yeni Kemik Dokusu Oluşan Grid} / \text{Toplam Grid Sayısı}) \times 100$$

*Osteoindüktif potansiyel.

İncelenen test materyali aşağıdaki gibi değerlendirilerek test sonuçlandırıldı.

Çizelge 3.14. Histomorfometrik Osteoindüktif Potansiyel Değerlendirme Sonuçları

(n=3)						
Deney Hay.No	Yeni Kemik Şekillenen Grid/ Toplam Grid Sayısı					Osteoindüktif Potansiyel
	İnceleme 1	İnceleme 2	İnceleme 3	İnceleme 4	İnceleme 5	
Test 1	4/24	5/23	3/22	4/21	4/24	20/114
Test 2	3/24	4/24	4/24	4/23	4/23	19/118
Test 3	3/23	4/25	4/24	3/23	3/22	17/117
Yüzde Alan						(56/349) x 100
						%16,04

0 = İncelenen Dokuda hiç implant tespit edilmesi—Olumsuz potansiyel-Testten kalır.

1 = < %10 yeni kemik doku oluşumu – Olumsuz potansiyel-Testten kalır.

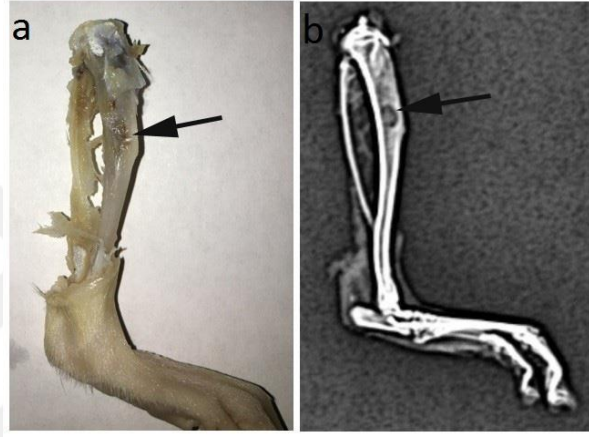
2 = % 10-20 yeni kemik doku oluşumu – Olumlu potansiyel- Testi Geçer

3 = % 21-30 yeni kemik doku oluşumu – Olumlu potansiyel- Testi Geçer

4 = > %30 yeni kemik doku oluşumu – Olumlu potansiyel- Testi Geçer

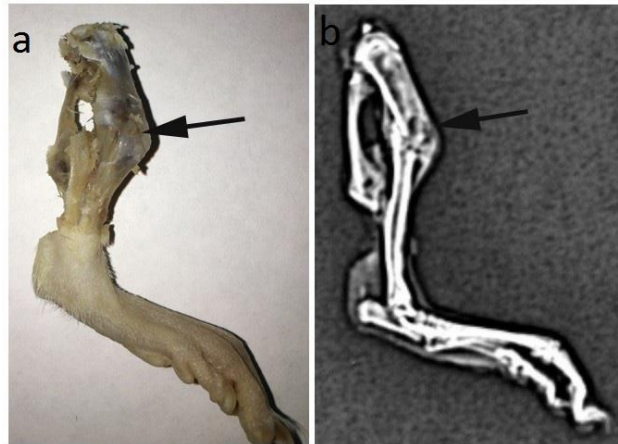
3.4. Kemik Defektinde Etkinlik Testi Sonuçları

Kemik defektinde etkinlik testinin değerlendirilmesi için deney süreleri bitiminde ötenazi yapılan deney hayvanlarının defekt modeli oluşturulan tibiaları çıkarılarak tespit solüsyonuna koyuldu. Tespit işleminin ardından defekt bölgelerindeki kaslar ve yumuşak dokular diseksiyonla uzaklaştırıldı ve defekt bölgesi açığa çıkarıldı. Açığa çıkarılan defekt bölgeleri tüm gruplar için ayrı ayrı fotoğraflandı ve radyografileri çekildi. Deney gruplarını temsil eden makroskobik ve radyografik görüntülere Şekil 3.66.-3.80.'de yer verilmiştir.



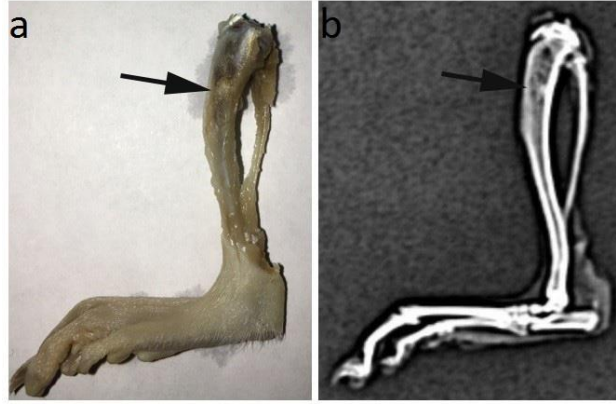
Şekil 3.66. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 1 ay sonunda post-mortem makroskobik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.

Oklar defekt alanını göstermektedir.



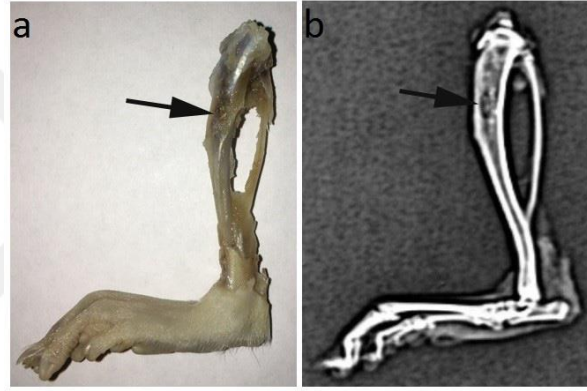
Şekil 3.67. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 1 ay sonunda post-mortem makroskobik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.

Oklar post-operatif dönemde meydana gelen kırık bölgesini göstermektedir.



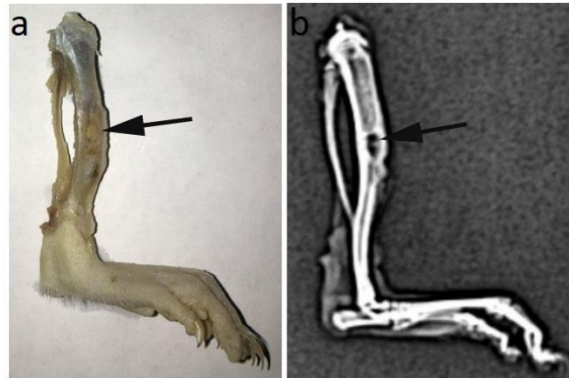
Şekil 3.68. Modifiye bioglass grubuna ait defekt alanının 1 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.

Oklar defekt alanını göstermektedir.



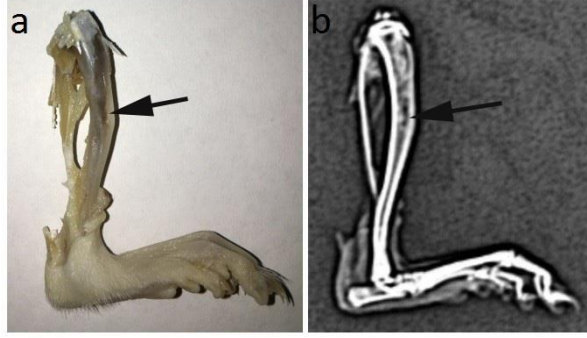
Şekil 3.69. Sadece YVS’de bekletilen bioglass grubuna ait defekt alanının 1 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.

Oklar defekt alanını göstermektedir.



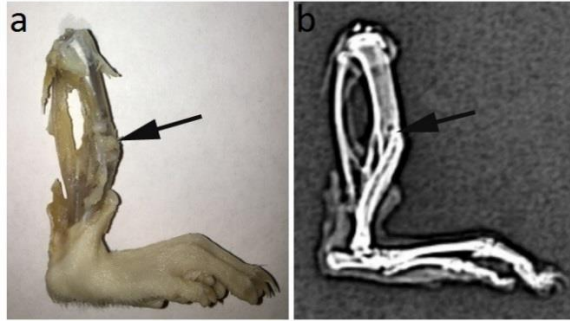
Şekil 3.70. Ham bioglass grubuna ait defekt alanının 1 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.

Oklar defekt alanını göstermektedir.



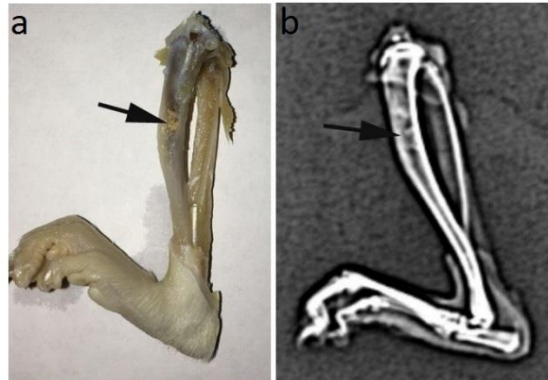
Şekil 3.71. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 2 ay sonunda post-mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.

Oklar defekt alanını göstermektedir.



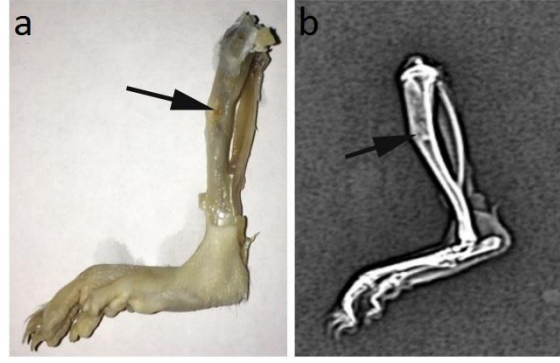
Şekil 3.72. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 2 ay sonunda post-mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.

Oklar post-operatif dönemde meydana gelen ve kaynaklı kırık bölgesini göstermektedir.



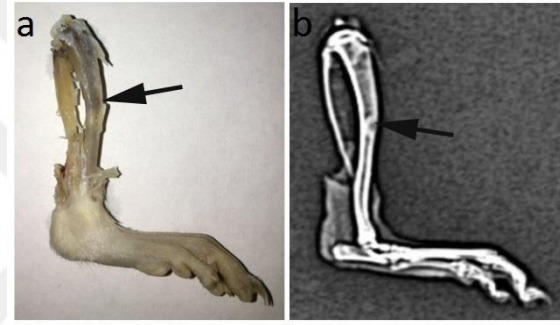
Şekil 3.73. Modifiye bioglass grubuna ait defekt alanının 2 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.

Oklar defekt alanını göstermektedir.



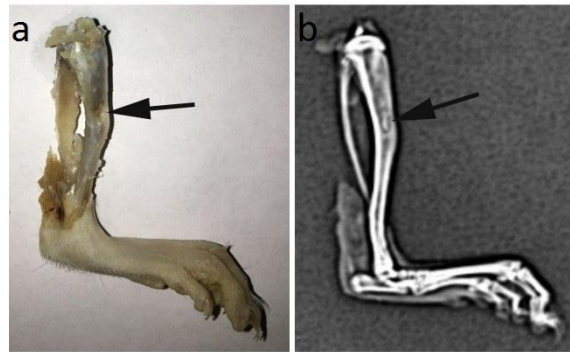
Şekil 3.74. Sadece YVS’de bekletilen bioglass grubuna ait defekt alanının 2 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.

Oklar defekt alanını göstermektedir.



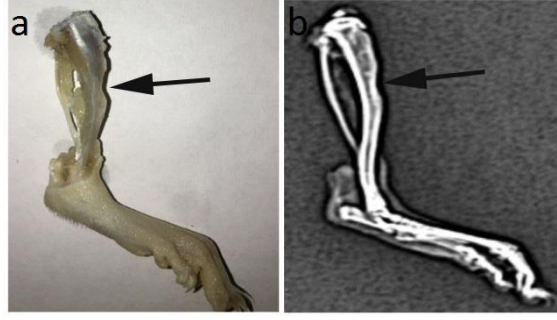
Şekil 3.75. Ham bioglass grubuna ait defekt alanının 2 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.

Oklar defekt alanını göstermektedir. Radyografik görüntüde (b) defekt alanında kortekste opasite azalması görülmektedir.



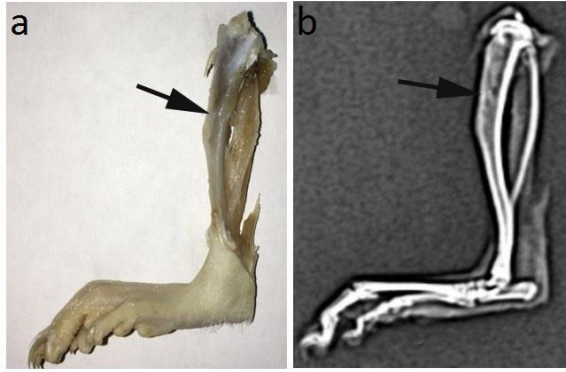
Şekil 3.76. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 3 ay sonunda post-mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.

Oklar defekt alanını göstermektedir. Makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntülerde defekt alanının yetersiz iyileştiği görülmektedir.



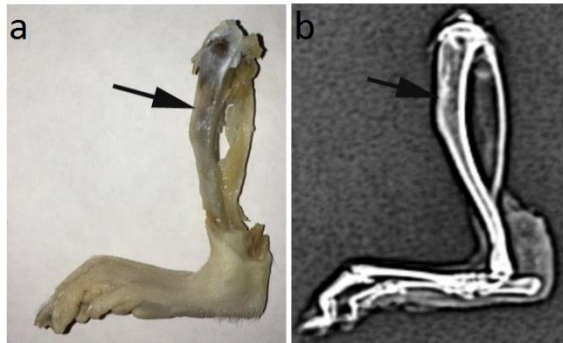
Şekil 3.77. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 3 ay sonunda post-mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.

Oklar defekt alanında korteksteki yetersiz iyileşmeyi göstermektedir. Hem makroskopik (a) hem de radyografik görüntüde (b) defekt bölgesinde (oklar) korteksin inceldiği ve çukurlaştığı görülmektedir.



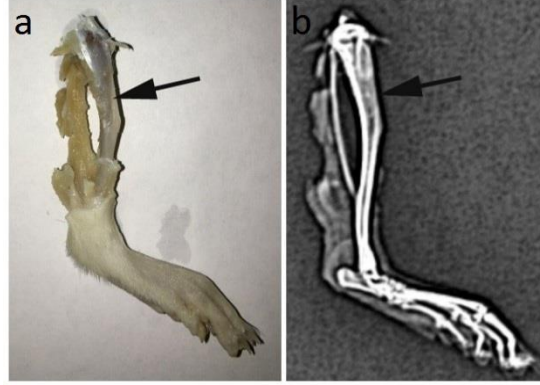
Şekil 3.78. Modifiye bioglass grubuna ait defekt alanının 3 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.

Oklar defekt alanını göstermektedir. Radyografik görüntüde defekt bölgesinde (ok) kortekste yeterli kalınlıkta ve opasitede alanlar görülmektedir.



Şekil 3.79. Sadece YVS’de bekletilen bioglass grubuna ait defekt alanının 3 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.

Oklar defekt alanını göstermektedir. Radyografik görüntüde defekt bölgesinde (ok) korteksin incelendiği görülmektedir.

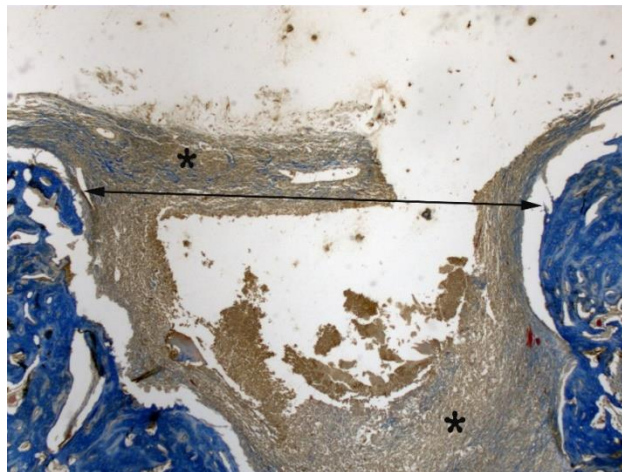


Şekil 3.80. Ham bioglass grubuna ait defekt alanının 3 ay sonunda post mortem makroskopik (a) ve radyografik (b) görüntüsü.

Oklar defekt alanını göstermektedir. Radyografik görüntüde defekt alanında kemik korteksindeki opasitenin azalmış olması dikkat çekmektedir.

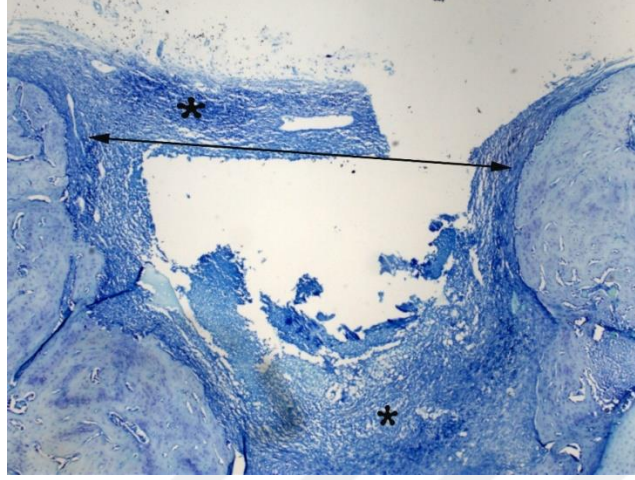
Deney gruplarının post-mortem makroskopik ve radyografik incelemelerini takiben kontrollü olarak dekalsifikasyonu yapılan örnekler rutin doku takip basamaklarından geçirilerek parafine bloklandı. 5 µm'lik kesitler alınarak Masson'un üçlü boyası ve toluidine mavisi ile boyandı. Deney gruplarına ait bazı histolojik fotoğraflara aşağıda yer verilmektedir.

-1 aylık gruplara ait histolojik fotoğraflar:



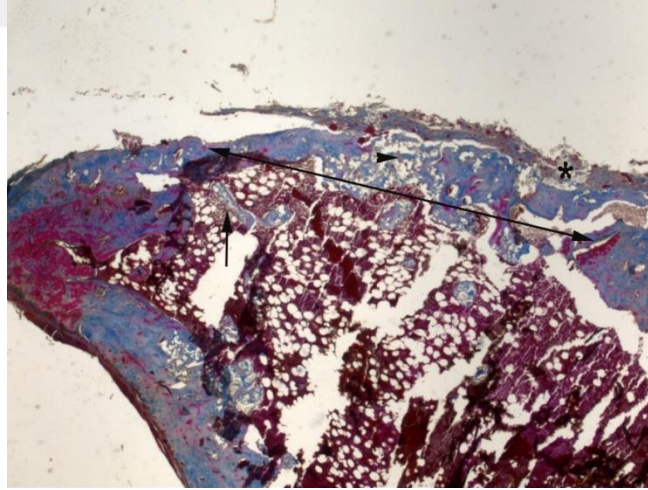
Şekil 3.81. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 1 ay sonundaki histolojik görüntüsü.

İki uçlu siyah ok defekt alanını göstermektedir. Defekt alanında yeni kemik oluşumu görülmemektedir. Üstteki asteriks defekt bölgesini dolduran bağ dokuyu, alttaki asteriks ise cavum medullaristeki bağ dokulu alanları göstermektedir. Masson'un üçlü boyaması, x4 büyütme.



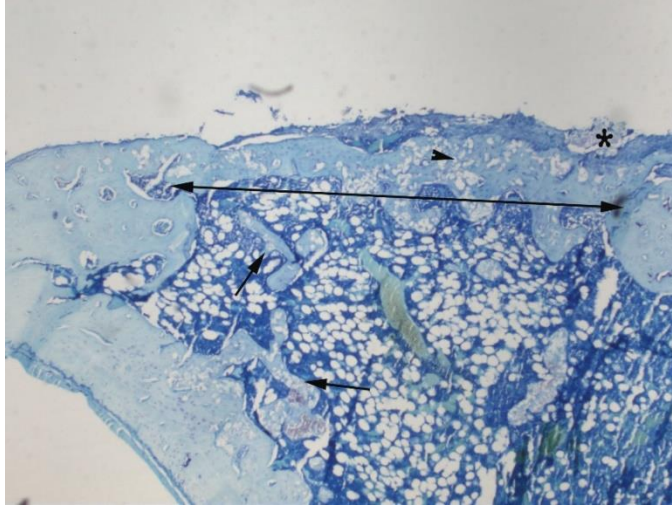
Şekil 3.82. Şekil 3.81.'deki negatif kontrol grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.

Defekt alanında (iki uçlu siyah ok) bağ dokulu alanlar (asteriksler) dikkat çekmektedir, x4.



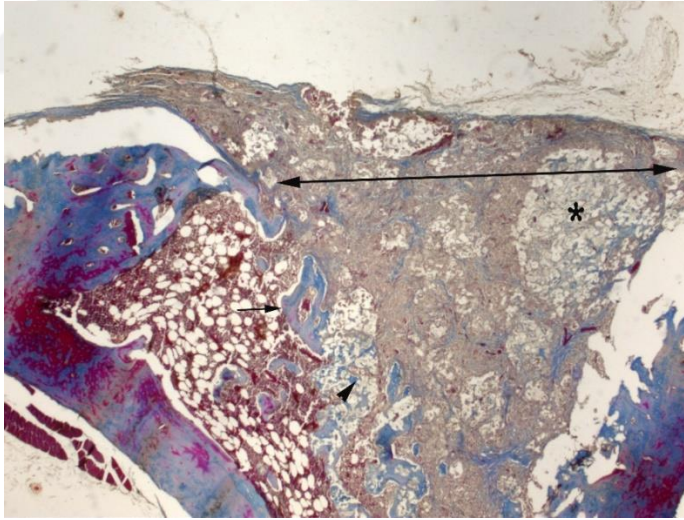
Şekil 3.83. Modifiye bioglass grubuna ait defekt alanının 1 ay sonundaki histolojik görüntüsü.

İki uçlu siyah ok defekt alanını, ok yeni yapılan trabeküler kemiği, ok başı defekt alanında biyomateriyaller etrafındaki yeni yapılan trabeküler kemik alanlarını ve asteriks ise yüzeydeki biyomateriyal kalıntılarını göstermektedir. Masson'un üçlü boyaması, x4.



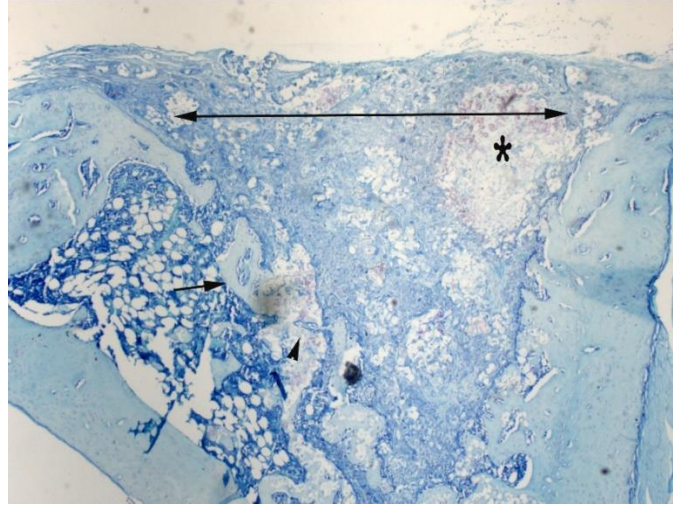
Şekil 3.84. Şekil 3.83’deki modifiye bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.

Defekt alanında (iki uçlu siyah ok) modifiye bioglass etrafında şekillenen trabeküler kemik alanları (ok başı), yüzeydeki biyomateriyal kalıntıları (asteriks) ve cavum medullaristeki biyomateriyal etrafında şekillenen trabeküler kemik alanları (siyah oklar) görülmektedir, x4.



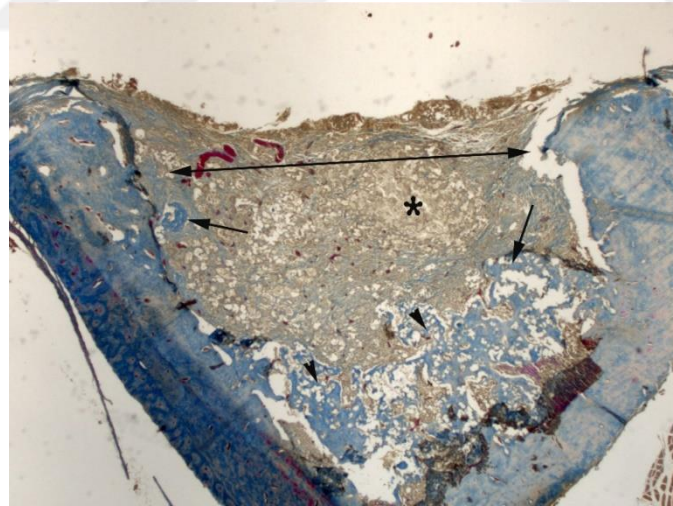
Şekil 3.85. Sadece YVS’de bekletilen bioglass grubuna ait defekt alanının 1 ay sonundaki histolojik görüntüsü.

İki uçlu siyah ok defekt alanını, siyah ok cavum medullaristeki yeni yapılan trabeküler kemiği, ok başı cavum medullaristeki biyomateriyaller etrafında şekillenen kemik trabeküllerini ve asteriks ise biyomateriyal kalıntılarını göstermektedir. MB grubunun aksine defekt alanının tam kapanmamış olması, yeni şekillenen trabeküler kemiğin cavum medullaris yönünde ilerlediği görülmektedir. Masson’un üçlü boyaması, x4.



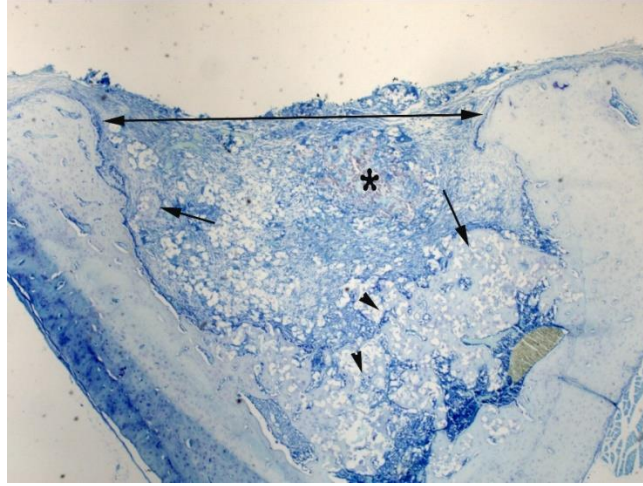
Şekil 3.86. Şekil 3.85.'deki sadece YVS'de bekletilen bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.

Defekt alanının (iki uçlu siyah ok) tam kapanmadığı, yeni yapılan trabeküler kemiğin (siyah ok) ve biyomateriyal etrafındaki kemik trabeküllerinin (ok başı) cavum medullaris yönünde ilerlediği görülmektedir. Ayrıca morumsu renkli olarak defekt alanındaki biyomateriyal kalıntıları (asteriks) görülmektedir, x4.



Şekil 3.87. İşlem uygulanmayan bioglass grubuna ait defekt alanının 1 ay sonundaki histolojik görüntüsü.

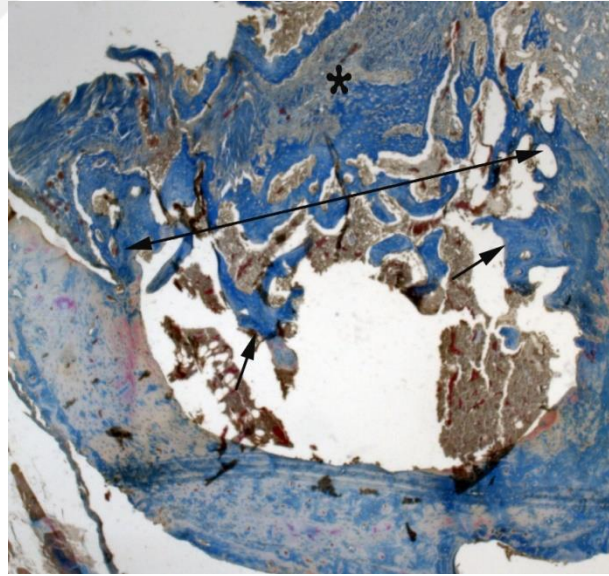
İki uçlu siyah ok defekt alanını, siyah oklar cavum medullaristeki yeni yapılan trabeküler kemiği, ok başları cavum medullaristeki biyomateriyaller etrafında şekillenen kemik trabeküllerini ve asteriks ise biyomateriyal kalıntıları göstermektedir. MB grubunun aksine defekt alanının tam kapanmamış olması, yeni şekillenen trabeküler kemiğin cavum medullariste olduğu görülmektedir. Masson'un üçlü boyaması, x4.



Şekil 3.88. Şekil 3.87.'deki işlem uygulanmayan bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.

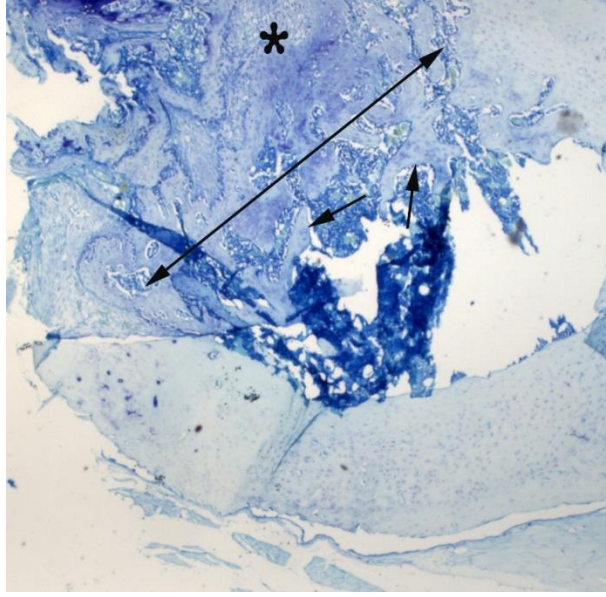
Defekt alanının (iki uçlu siyah ok) tam kapanmadığı, yeni yapılan trabeküler kemiğin (siyah oklar) ve biyomateriyal etrafındaki kemik trabeküllerinin (ok başları) cavum medullaris yönünde ilerlediği görülmektedir. Ayrıca morumsu renkli olarak defekt alanındaki biyomateriyal kalıntıları (asteriks) görülmektedir, x4.

-2 aylık gruplara ait histolojik fotoğraflar:



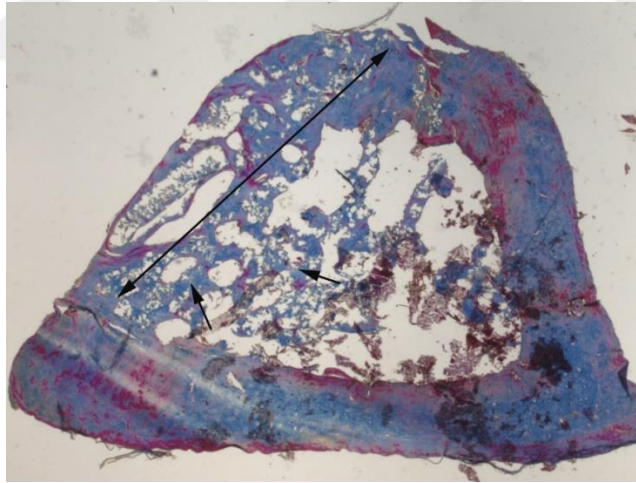
Şekil 3.89. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 2 ay sonundaki histolojik görüntüsü.

İki uçlu siyah ok defekt alanını göstermektedir. Defekt alanında düzensiz olarak şekillenen trabeküler kemik alanları siyah oklarla görülmektedir. Asteriks ise defekt bölgesinde yüzeyi dolduran bağ dokulu alanları göstermektedir. Masson'un üçlü boyaması, x4 büyütme.



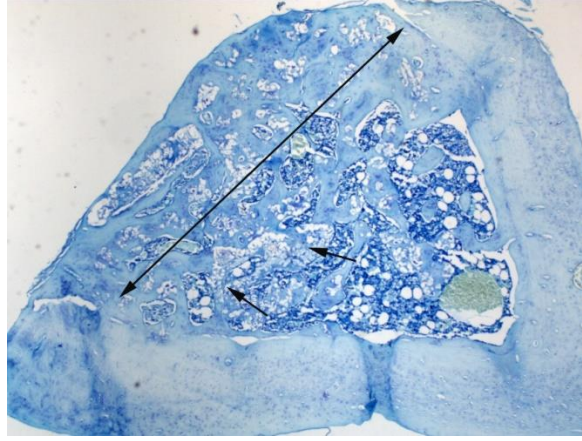
Şekil 3.90. Şekil 3.89.'daki negatif kontrol grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.

Defekt alanında (iki uçlu siyah ok) düzensiz şekillenen kemik trabekülleri (siyah oklar) ve defekt yüzeyindeki bağ dokulu alanlar (asteriks) görülmektedir. Ayrıca defekt bölgesindeki metakromatik görünüm 2 aylık süreçte yeni kemik oluşumundaki gecikmeye işaret etmektedir, x4.



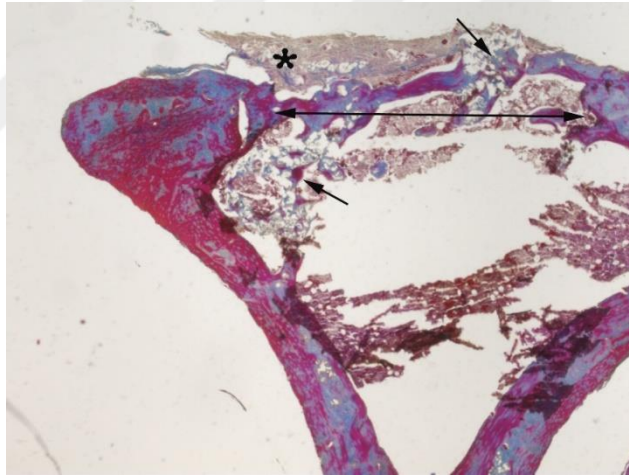
Şekil 3.91. Modifiye bioglass grubuna ait defekt alanının 2 ay sonundaki histolojik görüntüsü.

İki uçlu siyah ok defekt alanını, siyah oklar hem defekt alanında hem de cavum medullaristeki yeni yapılan trabeküler kemik alanlarını göstermektedir. Masson'un üçlü boyaması, x4.



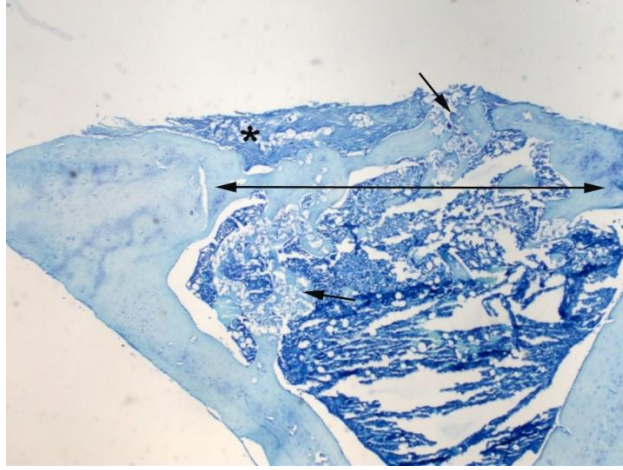
Şekil 3.92. Şekil 3.91’deki modifiye bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.

Defekt alanında (iki uçlu siyah ok) ve cavum medullariste biyomateriyaller etrafında trabeküler kemik oluşumu (oklar) görülmektedir. Ayrıca defekt alanında kemik korteksindeki sekonder kemik lamellerinin yeterli kalınlıkta olduğu dikkat çekmektedir. x4 büyütme.



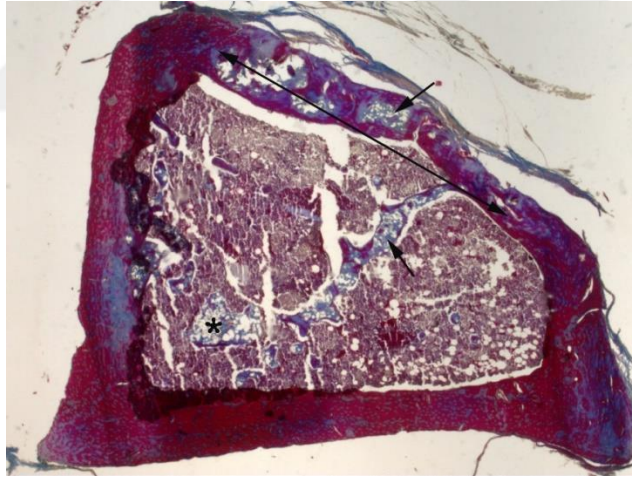
Şekil 3.93. Sadece YVS’de bekletilen bioglass grubuna ait defekt alanının 2 ay sonundaki histolojik görüntüsü.

İki uçlu siyah ok defekt alanını, oklar defekt alanında (üstte) ve cavum medullariste (altta) biyomateriyaller etrafındaki yeni yapılan trabeküler kemik alanlarını, asteriks ise yüzeydeki biyomateriyal kalıntılarını göstermektedir. Defekt alanında korteksin inceldiği dikkat çekmektedir. Masson’un üçlü boyaması, x4 büyütme.



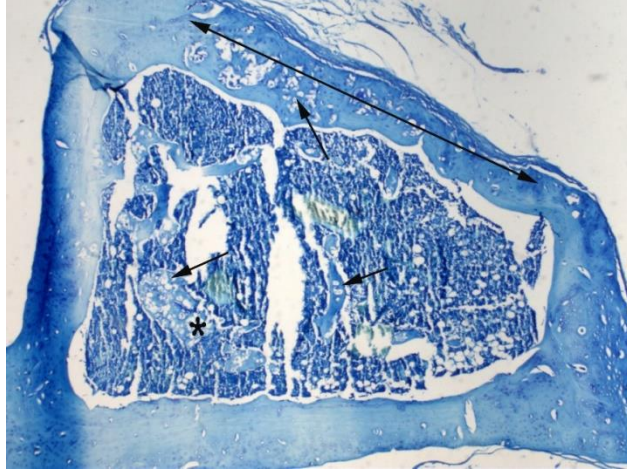
Şekil 3.94. Şekil 3.93'deki sadece YVS'de bekletilen bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.

Defekt alanında (iki uçlu siyah ok) biyomateryal etrafında şekillenen trabeküler kemik alanları (üst ok), yüzeydeki biyomateryal kalıntıları (asteriks) ve cavum medullaristeki biyomateryal etrafında şekillenen trabeküler kemik alanları (alt ok) görülmektedir. x4.



Şekil 3.95. İşlem uygulanmayan bioglass grubuna ait defekt alanının 2 ay sonundaki histolojik görüntüsü.

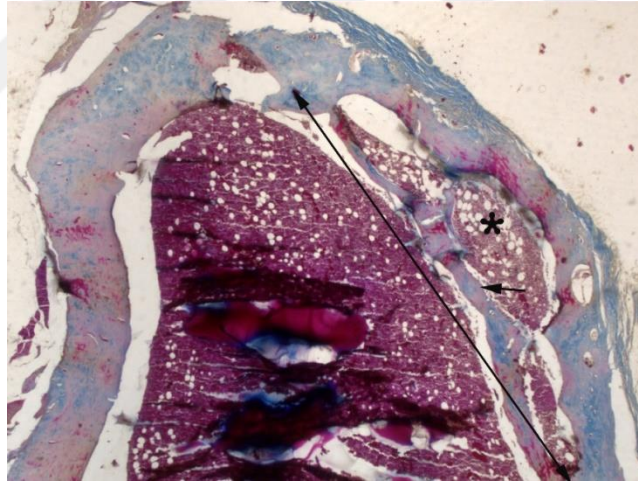
İki uçlu siyah ok defekt alanını, siyah oklar cavum medullaristeki ve defekt alanındaki yeni yapılan trabeküler kemiği ve asteriks ise biyomateryal kalıntıları göstermektedir. MB grubunun aksine defekt alanında korteksin incelmesi ve cavum medullarise doğru az miktarda trabeküler kemik alanları görülmektedir. Masson'un üçlü boyaması, x4.



Şekil 3.96. Şekil 3.95.'deki işlem uygulanmayan bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.

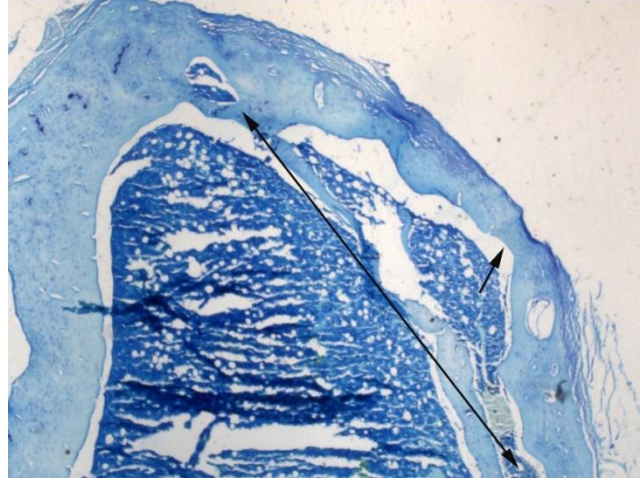
Defekt alanında (iki uçlu siyah ok) korteksin incelendiği dikkat çekmektedir. Defekt alanında ve cavum medullaris'te biyomateriyaller etrafındaki kemik lamelleri görülmektedir (siyah oklar). Asteriks ise cavum medullaristeki biyomateriyal kalıntılarını göstermektedir. x4 büyütme.

-3 aylık gruplara ait histolojik fotoğraflar:



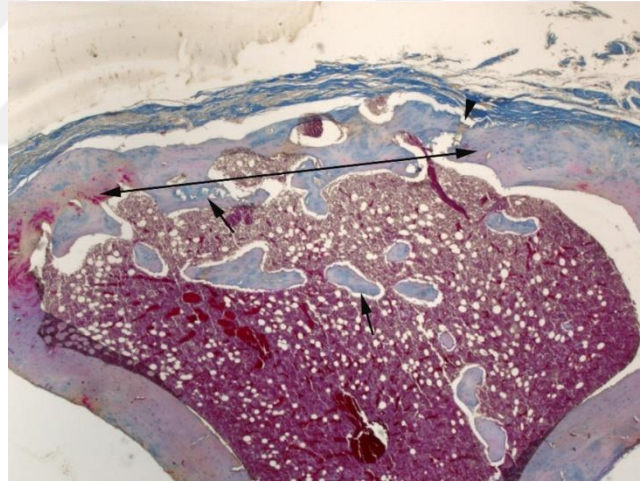
Şekil 3.97. Negatif kontrol grubuna ait defekt alanının 3 ay sonundaki histolojik görüntüsü.

İki uçlu siyah ok defekt alanını göstermektedir. Defekt alanında korteksin cavum medullarise bakan yüzeyinde trabeküler kemik (siyah ok) varlığı görülmektedir. Ayrıca defekt alanında henüz kapanmamış ve içerisi kemik iliği ile dolu (asteriks) alanlar görülmektedir. Masson'un üçlü boyaması, x4 büyütme.



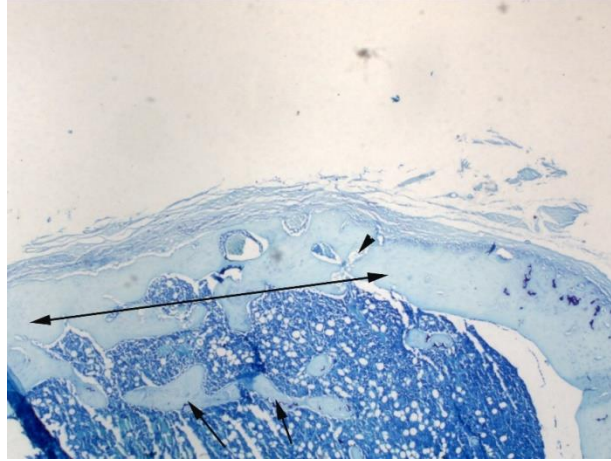
Şekil 3.98. Şekil 3.97’deki negatif kontrol grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.

Defekt alanında (iki uçlu siyah ok) korteksin oldukça incelmış olduğu (siyah ok) görülmektedir. x4 büyütme.



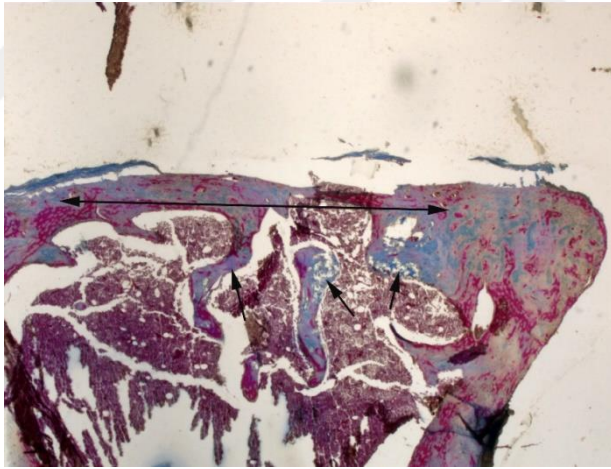
Şekil 3.99. Modifiye bioglass grubuna ait defekt alanının 3 ay sonundaki histolojik görüntüsü.

İki uçlu siyah ok defekt alanını, siyah oklar hem defekt alanında hem de cavum medullaristeki yeni yapılan trabeküler kemik alanlarını göstermektedir. Defekt bölgesinde korteksin yeterli kalınlıkta olduğu ve kompakt kemik alanlarının çoğunlukta olduğu görülmektedir. Masson’un üçlü boyaması, x4 büyütme.



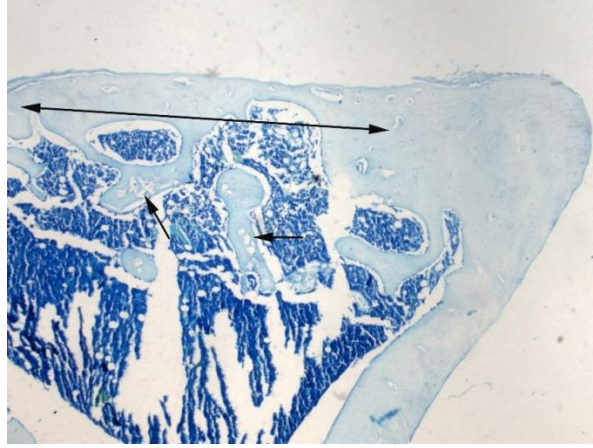
Şekil 3.100. Şekil 3.99.'daki modifiye bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.

Defekt alanında (iki uçlu siyah ok) sekonder kemik alanlarının çoğunlukta olduğu ve korteksin yeterli kalınlıkta olduğu görülmektedir. Ayrıca cavum medullaris'te de trabeküler kemik alanları (siyah oklar) görülmektedir. x4 büyütme.



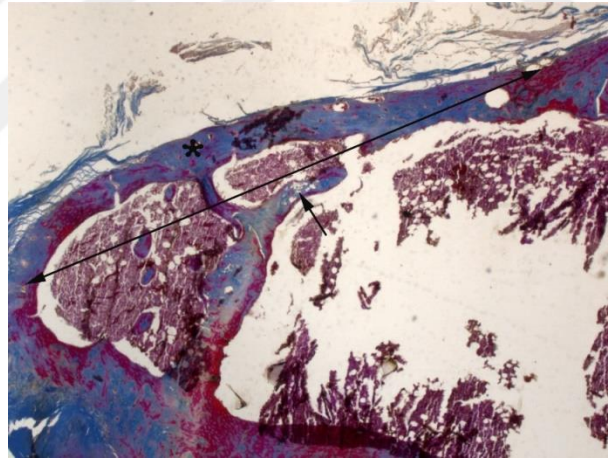
Şekil 3.101. Sadece YVS'de bekletilen bioglass grubuna ait defekt alanının 3 ay sonundaki histolojik görüntüsü.

İki uçlu siyah ok defekt alanını, siyah oklar defekt alanında ve cavum medullariste biyomateryaller etrafındaki yeni yapılan trabeküler kemik alanlarını göstermektedir. Defekt alanında korteksin incelendiği dikkat çekmektedir. Masson'un üçlü boyaması, x4 büyütme.



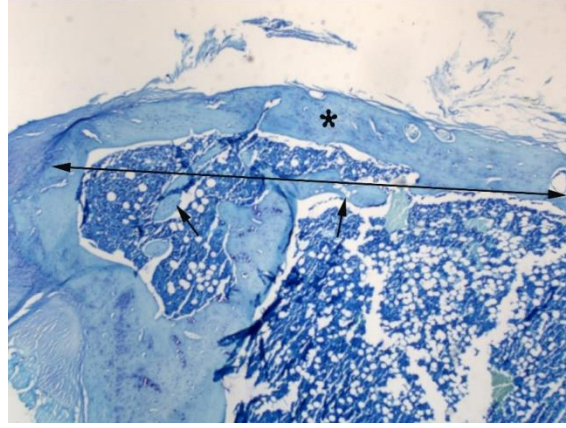
Şekil 3.102. Şekil 3.101.'deki sadece YVS'de bekletilen bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.

Defekt alanında (iki uçlu siyah ok) ve cavum medullaris'te biyomateriyaller etrafında şekillenen trabeküler kemik alanları (siyah oklar) görülmektedir. Ayrıca defekt alanında korteksin incelendiği görülmektedir. x4 büyütme.



Şekil 3.103. İşlem uygulanmayan bioglass grubuna ait defekt alanının 3 ay sonundaki histolojik görüntüsü.

İki uçlu siyah ok defekt alanını, siyah ok ise cavum medullaristeki trabeküler kemik alanlarını göstermektedir. Ayrıca defekt alanında korteksin incelendiği (asteriks) ve cavum medullarise doğru yönelen trabeküler kemik alanları görülmektedir. Masson'un üçlü boyaması, x4 büyütme.



Şekil 3.104. Şekil 3.103.'deki işlem uygulanmayan bioglass grubuna ait aynı defekt alanının toluidine blue ile boyanması sonucu elde edilen histolojik görüntüsü.

Defekt alanında (iki uçlu siyah ok) korteksin incelendiği dikkat çekmektedir (asteriks). Defekt alanında ve cavum medullaris'te biyomateryaller arasındaki trabeküler kemik lamelleri görülmektedir (siyah oklar). x4 büyütme.

Çizelge 3.15. Emery değerlendirme skoruna göre değerlendirilen grupların skorları ve istatistik olarak karşılaştırılması.

	Negatif (n=7)	Modifiye Bioglass (n=7)	YVS'de bekletilen (n=7)	Ham bioglass (n=7)	P*
1 Ay	1 (0-2)	3 (2-5) ^a	2 (1-3) ^{b*}	2 (1-2) ^c	0,004*
2 Ay	3 (1-4)	6 (5-6) ^d	5 (4-6) ^e	4 (3-5) ^f	0,0001*
3 Ay	4 (3-5)	6 (5-7) ^g	5 (4-6) ^{h*}	5 (3-6) ⁱ	0,022*

-Değerler ortanca (en küçük-en büyük) olarak verilmiştir.

P* p<0,05

a= N-M gruplarının 1 aylık uygulamalarının karşılaştırılması, p=0,002.

b*= M-YVS gruplarının 1 aylık uygulamalarının karşılaştırılması, p=0,017.

c= M-B gruplarının 1 aylık uygulamalarının karşılaştırılması, p=0,007.

d= N-M gruplarının 2 aylık uygulamalarının karşılaştırılması, p=0,001.

e= M-YVS gruplarının 2 aylık uygulamalarının karşılaştırılması, p=0,08.

f= M-B gruplarının 2 aylık uygulamalarının karşılaştırılması, p=0,002.

g= N-M gruplarının 3 aylık uygulamalarının karşılaştırılması, p=0,004

h*= M-YVS gruplarının 3 aylık uygulamalarının karşılaştırılması, p=0,03.

i= M-B gruplarının 3 aylık uygulamalarının karşılaştırılması, p=0,025.

3.5. İmplantasyon Testi Sonuçları

Modifiye bioglass, YVS'de işlem gören bioglass ve işlem görmeyen bioglass'ın implantasyon sonrası lokal etki değerlendirmesi TS EN ISO 10993-6 protokolüne göre yapıldı. İmplantasyon süreleri 1, 2 ve 3 ay olarak belirlenen gruplar için tüm

deney hayvanları deney süreleri tamamlanıncaya kadar kontrol edildi ve implantasyon sonrası dönemde genel sağlık durumları, yem ve su tüketimleri yönünden herhangi bir olumsuzluk gözlenmedi. Deney süreleri dolan hayvanlara ötenazi yapıldı ve implantasyon bölgesi lokal olarak incelendi, biyomateryalin etrafında herhangi bir patolojik değişiklik bulunmadığı görüldü. Histopatolojik incelemeler için Masson'un üçlü boyası ile boyanarak hazırlanan kesitler ışık mikroskopta incelendi. 1 aylık, 2 aylık ve 3 aylık uygulamalara ait semikantitatif histopatolojik skorlar Çizelge 3.16., 3.17. ve 3.18'de verilmektedir. Test sonuçları değerlendirildiğinde modifiye bioglass'ın implantasyon sonrası lokal etki kategorilerine göre 1 aylık uygulamaya ait değerlendirme skoru 0,7 (Çizelge 3.16.), 2 aylık uygulamaya ait değerlendirme skoru 0,43 (Çizelge 3.17.) ve 3 aylık uygulamaya ait değerlendirme skoru ise 0,2 (Çizelge 3.18.) bulunduğundan modifiye bioglass'ın iritan etkisi bulunmamaktadır.

Çizelge 3.16. 1 aylık uygulama sonunda ISO 10993-6 Tablo 1 (Annex5)'e göre semikantitatif histopatolojik skorları.

Grup	Pol y.	Le nf.	Pla z.	Ma k.	Dev h.	Nek r.	ARA TOP. (x2)	Neo .	Fibros is	Yağ inf./ dej.	ARA TOP.	TOPL AM	ORT. SKOR
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Negatif	1	0	1	0	0	0	4	0	0	0	0	4	
Negatif	0	0	0	1	0	0	2	0	2	2	4	6	3
Negatif	0	0	0	1	0	0	2	0	1	2	3	5	
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	
Negatif	0	0	0	1	0	0	2	0	2	0	2	4	
Modifiye	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Modifiye	0	0	0	1	1	0	4	0	1	0	1	5	
Modifiye	0	0	0	1	0	0	2	0	1	0	1	3	3,7
Modifiye	0	0	0	1	1	0	4	1	0	1	2	6	
Modifiye	0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	2	4	
Modifiye	0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	2	4	
Modifiye	0	0	0	1	0	0	2	0	1	1	2	4	
Modifiye Bioglass grubu Toplam Skor= 0,7***													

YVS 1	0	0	0	1	1	0	4	1	3	0	4	8	
YVS 1	0	0	0	1	0	0	2	1	1	1	3	5	
YVS 1	0	0	0	1	0	0	2	0	1	1	2	4	6,4
YVS 1	0	0	0	1	1	0	4	0	1	1	2	6	
YVS 1	0	0	0	1	2	0	6	0	1	1	2	8	
YVS 1	0	0	0	1	2	0	6	1	1	0	2	8	
YVS 1	0	0	0	1	1	0	4	1	1	0	2	6	
YVS1 Grubu Toplam Skor=3,4 **													
Ham b.	0	0	0	1	1	0	4	0	2	1	3	7	
Ham b.	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	
Ham b.	0	0	0	2	1	0	6	1	3	0	4	10	5,58
Ham b.	0	1	0	1	1	0	6	0	3	0	3	9	
Ham b.	0	0	0	1	1	0	2	1	2	0	3	5	
Ham b.	0	0	0	1	1	0	4	1	1	0	2	6	
Ham b.	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	
Ham Bioglass Grubu Toplam Skor=2,58 **													

Modifiye= Modifiye bioglass 1 aylık uygulama; YVS1= YVS’de bekletilen bioglass 1 aylık uygulama; Ham b.=İşlem göremeyen bioglass 1 aylık uygulama; Poly.=Polimorf lökosit; Lenf.=Lenfosit; Plaz.=Plazma hücresi; Dev h.=Dev hücre; Nekt.=Nekrozis; Neo.=Neovaskülarizasyon; Yağ inf./dej.=Yağ infiltrasyonu/dejenerasyonu.

-Toplam skor=Test skoru-negatif skor

**İrritasyon skorları: Yok (0,0-2,9); Hafif (3,0-8,9); Orta (9,0-15,0); Şiddetli (>15,0)

Çizelge 3.17. 2 aylık uygulama sonunda ISO 10993-6 Tablo 1 (Annex5)’e göre semikantitatif histopatolojik skorları.

Grup	Pol y	Le nf.	Pla z.	Ma k.	Dev h.	Nek r.	ARA TOP. (x2)	Neo.	Fibrozi s	Yağ inf./ dej.	ARA TOP.	TOPL AM	ORT. SKOR
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	3	
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,14
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	

Modifiye	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
Modifiye	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
Modifiye	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,57
Modifiye	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
Modifiye	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	3	
Modifiye	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
Modifiye	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	1	2	4	
M2 grubu Toplam Skor= 0,43*,**														
YVS 2	0	0	0	1	1	0	4	0	1	0	0	1	5	
YVS 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
YVS 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,2
YVS 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
YVS 2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	2	
YVS 2	0	1	0	1	0	0	4	0	0	0	1	1	5	
YVS 2	1	0	0	1	0	0	4	0	0	0	0	0	4	
YVS2 Grubu Toplam Skor=1,06 **,**														
Ham b.	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	2	
Ham b.	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	2	
Ham b.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
Ham b.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1,86
Ham b.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ham b.	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	1	1	3	
Ham b.	0	0	0	0	1	0	2	0	1	0	1	2	4	
B2 Grubu Toplam Skor=1,44 **,**														

Modifiye= Modifiye bioglass 2 aylık uygulama; YVS 2= YVS'de bekletilen bioglass 2 aylık uygulama; Ham b.=İşlem göremeyen bioglass 2 aylık uygulama; Poly=Polimorf lökosit; Lenf.=Lenfosit; Plaz.=Plazma hücresi; Dev h.=Dev hücre; Nkr.=Nekrozis; Neo.=Neovaskülarizasyon; Yağ inf./dej.=Yağ infiltrasyonu/dejenerasyonu.

-Toplam skor=Test skoru-negatif skor

**İrritasyon skorları: Yok (0,0-2,9); Hafif (3,0-8,9); Orta (9,0-15,0); Şiddetli (>15,0)

Çizelge 3.18. 3 aylık uygulama sonunda ISO 10993-6 Tablo 1 (Annex5)'e göre semikantitatif histopatolojik skorları.

Grup	Poly	Len	Plaz	Mak	Dev	Nekr	ARA TOP. (x2)	Neo.	Fibrosis	Yağ inf./d ej.	ARA TOP.	TOPL AM	ORT. SKOR
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
Negatif	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Negatif	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Modifiye	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,8
Modifiye	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	
Modifiye	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Modifiye	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	
Modifiye	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
Modifiye	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Modifiye	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	
M3 grubu Toplam Skor= 0,2*,**													
YVS 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,1
YVS 3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	3	
YVS 3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	
YVS 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
YVS 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
YVS 3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	
YVS 3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	
YVS3 Grubu Toplam Skor=0,5 *,**													
Ham b.	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	1
Ham b.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
Ham b.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
Ham b.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Ham b.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ham b.	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2
Ham b.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B3 Grubu Toplam Skor=0,4 **													

Modifiye= Modifiye bioglass 3 aylık uygulama; YVS 3= YVS’de bekletilen bioglass 3 aylık uygulama; Ham b.=İşlem göremeyen bioglass 3 aylık uygulama; Poly=Polimorf lökosit; Lenf.=Lenfosit; Plaz.=Plazma hücresi; Dev h.=Dev hücre; Nekt.=Nekrozis; Neo.=Neovaskularizasyon; Yağ inf./dej.=Yağ infiltrasyonu/dejenerasyonu.

-Toplam skor=Test skoru-negatif skor

**İrritasyon skorları: Yok (0,0-2,9); Hafif (3,0-8,9); Orta (9,0-15,0); Şiddetli (>15,0)



4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında modifiye bioglass'ın *in vitro* ve *in vivo* deneylerle etkinliği değerlendirildi. 45S5 olarak bilinen ham bioglass ve yapay vücut sıvısında (YVS) bekletilen bioglas, sert doku mühendisliği uygulamalarında kullanım alanı olan biyomateriyallerdendir. Mevcut durumda kullanım alanı olan ham bioglass ve YVS'de bekletilen bioglass'ın modifiye bioglass ile karşılaştırıldığı bu çalışmada, biyomateriyallerin konak dokuya uygulandıklarında doku ile olan biyoyumluluğun anahtarı rolündeki konak-biyomateriyal arayüzü ilişkisinden yola çıkılarak yüzey modifikasyon işlemi uygulandı. Bu amaçla kolay temin edilmesi, düşük maliyetli oluşu ve uygulama kolaylığı nedeniyle sentez basamağında oranları detaylı olarak belirtilen çeşitli amino asitler kullanıldı.

Yeni bir biyomateriyalin üretilmesindeki bazı amaçları söylemek gerekirse; bunları var olan bir probleme daha iyi bir çözüm üretmek veya yeni bir problemin çözümlerinden biri olmak şeklinde ifade edebiliriz. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında ise bir problemin birden fazla çözümü ve her uygulamanın avantaj veya dezavantajları olabilmektedir. Biyomateriyal açısından değerlendirilecek olursa yeni üretilen veya bu çalışmada olduğu gibi mevcut bir biyomateriyalin bir veya daha fazla özelliğinin geliştirilmesini amaç edinen modifiye biyomateriyallerin nihayetinde beşeri veya veteriner sahada kullanımı olan ticari bir ürün olması hedeflenmekte ve beklenmektedir. Bu noktada ise biyoyumluluk terimi akla gelmektedir. Çeşitli ulusal veya uluslararası kuruluşlarca (FDA, OECD, ISO gibi) açıkça belirtilen test standartlarına göre gerek *in vitro* gerekse *in vivo* testlerle biyomedikal bir araç olarak kullanılan bu gibi biyomateriyallerin biyoyumluluklarının test edilmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında sentez edilen modifiye bioglass'ın ilk olarak fiziksel karakterizasyon testleri yapıldı. Daha sonra ise çeşitli standartlara uygun olarak *in*

vitro ve *in vivo* testler yapılarak, modifiye bioglass'ın etkinliği ve biyouyumluluğu değerlendirildi.

Biyoaktif camlar vücut sıvıları veya dokularla temasta bulunduğunda implante edildiği konak dokusuyla biyoaktif cam yüzeyi arasında reaktif tabakalar oluşturarak yüzeyinde hidroksiapatit tabakası oluştururlar. *İn vitro* koşullarda vücut sıvılarını taklit eden bir sıvı içerisinde vücut ısısında bekletildiğinde de bioglass yüzeyinde hidroksiapatit oluşumu gözlenmektedir. Bu çalışmada bioglass'ın yüzey modifikasyonu amacıyla YVS ve amino asitlerden oluşan bir karışım kullanıldı. Karşılaştırma yapmak amacıyla ise YVS'de bekletilen bioglass ve ham bioglass kullanıldı. Ham bioglass'ın, YVS'de bekletilen bioglass'ın ve modifiye bioglass'ın ayrı ayrı FT-IR spektrumları alınarak biyomateryallerin yapısındaki fonksiyonel gruplar belirlendi. Bu çalışmada ham bioglass'ın Si-O-Si bağlarına ait spesifik pikler daha önceki çalışmalarda belirtilen piklerle (Vallet-Regí vd., 1999; Rámila ve Vallet-Regí, 2001) benzerlik gösterdiğinden sentezi yapılan bioglass'a ait camsı yapı doğrulanmaktadır. Modifiye bioglass'a ait absorbsiyon pikleri incelendiğinde biyomateryal yüzeyinde oluşan hidroksiapatit varlığını doğrulayan ve literatür verilerle bağdaşan spesifik pikler görüldü (Bayraktar ve Taş, 1999; Tas, 2000; Mollazadeh vd., 2007; Adawy vd., 2009; Kundu vd., 2010). Sadece YVS'de bekletilen bioglass için ölçülen absorbsiyon piklerinin modifiye bioglass ile olan benzerliği hidroksiapatit varlığını doğrulamaktadır. Ayrıca absorbsiyon pikleri incelendiğinde YVS'de bekletilen bioglass ve modifiye bioglass'a ait P-O arasındaki bağlara ait piklerin ham bioglass'a göre şiddetlerinin arttığı görülmektedir. Literatür verilerde, yapay vücut sıvısındaki bekleme süresinin artması hidroksiapatit piklerindeki şiddetin artması şeklinde yorumlanmaktadır (Kim, Miyaji, Kokubo, Ohtsuki ve Nakamura, 1995). YVS'de bekletilen bioglass ve ham bioglass'tan farklı olarak sadece modifiye bioglass'ta görülen 1554 cm^{-1} dalga boyundaki absorbsiyon pikinin Silva vd. (2005) ve Zhang vd. (2007)'nin belirttiği N-H eğilme titreşimine ait olduğu tespit edilmiştir. Bu durum ise modifiye bioglass için amino asit karışımıyla yapılan yüzey modifikasyonunun başarılı olduğunu göstermektedir.

Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomateryallerin bazı morfolojik özellikleri taşınması beklenir. Gözeneklilik, tanecik boyutu ve yüzey morfolojisi gibi özelliklerin belirlenmesi gerek sert doku mühendisliği gerekse diğer doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan herhangi bir biyomateryalin doğal dokuya uygunluğunu

değerlendirmek açısından önemlidir. Bu amaçla biyomateryallerin SEM görüntüleri alınarak yüzey yapıları incelenmektedir. Bu çalışmada karşılaştırma yapabilmek amacıyla ham bioglass'ın, YVS'de bekletilen bioglass'ın ve modifiye bioglass'ın SEM görüntüleri çekildi. Daha önceki çalışmalarda belirtildiği üzere bioglass'ı yapay vücut sıvısında bekletmek yüzeyinde hidroksiapatit oluşumuna yol açmaktadır (Ohtsuki, Kokubo ve Yamamuro, 1992; Kasuga, Hosoi, Nogami ve Niinomi, 2001; Kim vd., 2003). Bu nedenle bioglass numunelerinin ilk olarak YVS'ye koyulmadan önceki hali SEM'de görüntülendi. Ham bioglass'ın SEM görüntüleri incelendiğinde amorf bir yapıda olduğu ve yüzeyinde hidroksiapatit tabakası bulunmadığı gözlemlendi. Ham bioglass'ın SEM incelemelerinde elde edilen bulgular daha önce yapılan bazı çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Saboori vd., 2009; Ravarian vd., 2010). Ancak tanecik boyutu ve gözenek yapısı hem aynı numunenin farklı bölgesinde hem de benzer çalışmalardakiyle farklılık göstermektedir. Bu durumun bioglass sentez basamağındaki bazı manüplasyon farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. YVS'de bekletilen bioglass numunelerine ait SEM görüntüleri incelendiğinde biyomateryal yüzeyinin hidroksiapatit ile kaplı olduğu, ham bioglass'ta görülen amorf yapının yerine daha pürüzlü bir görünüm kazandığı ve yüzeyin kristalize formda olduğu görüldü. Bu durum bioglass numuneleri YVS'de bekletildiğinde yüzeyinde hidroksiapatit oluşacağını bildiren literatür verilere (Ohtsuki vd., 1992; Kasuga vd., 2001; Kim vd., 2003) ve bu çalışmada YVS'de bekletilen bioglass için ölçülen FT-IR değerlerine uygunluk göstermektedir. Modifiye bioglass numunelerinin SEM incelemelerine bakıldığında yüzeyinde oluşan hidroksiapatit tabakası ve kristalize yapılar dikkat çekmektedir. Bu durum ham bioglass'ta görülen amorf ve keskin kenarlı yapının yerini modifikasyon işlemi sonucunda pürüzlü, kristalize, yer yer gözenekli yer yer de amino asit kaplamasına atfedilen alanların alması şeklinde açıklanmakta ve FT-IR ölçümlerinde görülen hidroksiapatit oluşumu ve amino asit kaplamasına işaret eden absorpsiyon piklerinin SEM ile doğrulandığını göstermektedir.

Yeni üretilen veya modifiye edilen bir biyomateryal insanda test edilmeye veya kullanılmaya başlamadan önce bazı testleri geçmesi gerekir. ISO, OECD veya FDA gibi kurum ve kuruluşların belirlediği çeşitli *in vitro* ve *in vivo* test standartları bu amaca hizmet etmektedir. Biyoyumluluk testleri olarak nitelendirebileceğimiz bu testlerden bir tanesi de *in vitro* sitotoksikite testidir. Bu çalışmada TS EN ISO 10993-

5 standartlarına göre ekstraksiyon metodu kullanılarak modifiye bioglass özütünün hem test standardında tavsiye edilen L-929 fibroblast hücre hattında hem de MC3T3-E1 preosteoblast hücre hattında sitotoksik olup olmadığı incelenmiştir. Ekstraksiyon metoduyla biyomateryalin bir besi ortamı içerisinde belli sıcaklıklarda bekletilerek ortama saldığı maddelerin uygulanan hücrelere nasıl bir etki gösterdiği belirlenmektedir. Test metoduna göre numune özütü uygulanan hücrelere ait hesaplanan canlılık değerlerinin %70'in altında olması o numunenin sitotoksik olduğunu göstermektedir. L-929 ve MC3T3-E1 hücre hatları için 1:1 konsantrasyondaki uygulamalarına ait canlılık değerleri sırasıyla $84,64 \pm 11,63$ ve $86,94 \pm 11,95$ olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle modifiye bioglass özütü iki hücre hattı için de sitotoksik değildir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar hem daha önce yapılan hücre çalışmalarıyla (Gough, Notingher ve Hench, 2004; Comesaña v.d., 2011) hem de yine bu çalışmada biyomateryal üzerine ekilen MC3T3-E1 hücrelerinin canlılık oranlarının gösterildiği testlerin sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. *In vitro* sitotoksikite testinin sonuçlarına bakıldığında hücre canlılık oranlarının MC3T3-E1 hücrelerinde L-929 hücre hattına göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Ancak istatistik olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Modifiye bioglass'tan ortama salınan iyonların MC3T3-E1 hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı bilinmektedir (Toworfe, Composto, Shapiro ve Ducheyne, 2006). Buna rağmen L-929 hücre hattı ile MC3T3-E1 hücre hattı arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmaması modifiye bioglass özütünün hücrelere test standardında belirtildiği gibi sadece 24 saat uygulanmasından kaynaklanmış olabilir. Bu nedenle ham bioglass, YVS'de bekletilen bioglass ve modifiye bioglass üzerine MC3T3-E1 hücresi ekilerek kültürasyonun 3, 7 ve 14. günlerinde hücre canlılığı ve apoptoz-nekroz oranlarını belirlemek için ayrıca testler yapılmıştır.

Modifiye bioglass, YVS'de bekletilen bioglass ve ham bioglass'ın üzerine kültüre edilen MC3T3-E1 hücrelerinin kültürasyonun 3, 7 ve 14. günlerindeki canlılık, apoptoz ve nekroz oranları karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuçlarla karşılaştırılan bioglass'ların preosteoblastlar için uygun kültür ortamı sağladığı ve proliferasyonu desteklediği söylenebilir. Karşılaştırılan bioglass grupları için farklı günlere ait canlılık değerlerine bakıldığında modifiye bioglass grubunda % değerleri açısından canlılığın daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca apoptoz ve nekroz oranlarının da YVS'de

bekletilen bioglass'a ve ham bioglass'a göre daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum ise modifiye bioglass'tan kültür ortamına salınan amino asitlerin varlığıyla açıklanabilir. Çünkü modifikasyonda kullanılan amino asitlerin daha önce yapılan çalışmalarda osteoblast proliferasyonunu desteklediği (Torricelli, Fini, Giavaresi ve Giardino, 2001; Fini vd., 2001; Boanini, Torricelli, Gazzano, Giardino ve Bigi, 2006) veya glutatyon sentezine katılarak sitoprotektif etki gösterebileceği bildirilmiştir (Beutler, 1989).

Calcein ile hücre canlılığı değerlendirildiğinde sonuçların apoptoz-nekroz testiyle uyumlu olduğu ve canlılığın MB grubunda daha yüksek olduğu görülmektedir. Apoptoz-nekroz testinden farklı olarak Calcein AM/PI boyamasıyla canlı hücrelerin morfolojileri hakkında da tespitlerde bulunuldu. Gruplar arasında semikantitatif değerlendirme yapıldığında MB grubunda hücrelerin sferoid morfolojide oldukları görülürken, YVS'de bekletilen bioglass grubunda az sayıda, ham bioglass grubunda ise YVS grubuna göre daha fazla sayıda fibroblast benzeri hücrelerin varlığı tespit edildi. Bu durum ise MB grubundaki osteoblastik farklılaşmanın daha iyi olabileceği yönünde değerlendirildi.

In vitro sitotoksosite testinde modifiye bioglass özütünün sitotoksitesi değerlendirilmişti. Annexin V-FTIC kiti ile yapılan apoptoz-nekroz testinde ise ham bioglass, YVS'de bekletilen bioglass ve modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan preosteoblast hücre hattı için (MC3T3-E1) canlılık ve apoptoz-nekroz değerlendirilmesi yapıldı. Biyomateryal konsantrasyonunun yüksek olması sitotoksosite endişesini arttıran bir durumdur (Rath vd., 2014) ancak elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde yüksek canlılık oranlarıyla örtüşen düşük apoptoz ve nekroz oranları modifiye bioglass'ın hücre canlılığını büyük ölçüde desteklediği yönünde değerlendirilebilir. Ham bioglass, YVS'de bekletilen bioglass ve modifiye bioglass için yapılan canlılık, apoptoz ve nekroz oranlarının karşılaştırmasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmasa da modifiye bioglass'ın daha yüksek canlılık oranına ve daha düşük apoptoz-nekroz oranlarına sahip olduğu görülmektedir. İstatistik fark bulunmamasının bir diğer sebebi de apoptoz-nekroz oranlarının akış sitometrisi kullanılarak değil de semikantitatif olarak belirlenmesinden kaynaklanmış olabilir.

Yeni üretilen biyomateryallerin genotoksik potansiyellerinin değerlendirilmesi biyoyumluluğu açısından oldukça önemlidir. Genotoksisitenin belirlenmesi amacıyla *in vitro* veya *in vivo* olarak yapılan çeşitli testler bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında OECD 487 *in vitro* mikronükleus testi kullanıldı. Klastojen veya anojen maddelerin DNA’da yol açtığı kırılma (klastojenik etki) veya kromozom ayrışmaları (anojenik etki) mikronükleus oluşumunu indükler ve mikronükleus indüksiyonu genotoksik etkiye işaret eder (De Souza vd., 2020). Bu nedenle mikronükleus oluşumu mutajenik potansiyeli göstermesi bakımından oldukça önemlidir. Biyomateryaller implantasyondan sonra vücutta uzun süre kalırlar. Bu uzun sürelerde doku uyumu ne kadar önemliyse çözünme ürünlerinin ve metabolitlerinin yapacağı etkiler de o derece önemlidir. OECD 487 *in vitro* mikronükleus testinde numune özütlüğünün bulunduğu ortama S9 enzimi ilave edilerek ikincil metabolitlerin genotoksik hasara yol açıp açmadığı da belirlenmektedir. Bu çalışmadaki *in vitro* mikronükleus test sonuçları değerlendirildiğinde; modifiye bioglass özütü negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 3 saatlik ve 24 saatlik uygulamalar için mikronükleus oluşumu açısından istatistik olarak anlamlı fark görülmedi. Modifiye bioglass ile pozitif kontrol grubu karşılaştırıldığında ise hem 3 saat hem de 24 saatlik uygulamalarda mikronükleus oluşumu açısından istatistik olarak fark anlamlı bulundu. Test standardı gereği ikincil metabolitler açısından sadece 3 saatlik uygulamalarda karşılaştırma yapılabilir. Yapılan istatistik karşılaştırmalarda negatif kontrol grubuyla modifiye bioglass grubu arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmadığı, pozitif kontrol grubuyla modifiye bioglass grubu arasında istatistik olarak anlamlı fark olduğu görüldü. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde ise modifiye bioglass özütünün genotoksik olmadığı yönünde değerlendirildi.

Modifiye bioglass, YVS’de bekletilen bioglass ve ham bioglass üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin kültivasyonun 3, 7 ve 14.günlerinde yapılan SEM incelemelerinde hücre tutunmasının 3 biyomateryalde de gerçekleştiği görülmektedir. Ancak modifiye bioglass üzerine ekimi yapılan hücrelerin kültivasyonun 7. ve 14. günlerinde yapılan SEM incelemesinde, YVS’de bekletilen bioglass ve ham bioglass’tan farklı olarak yassı morfolojide ve belirgin şekilde sitoplazmik uzantıları olduğu görülmektedir (Şekil 3.23., Şekil 3.24 ve Şekil 3.29.). Bu durum ise MC3T3-E1 hücrelerinin modifiye bioglass yüzeyine daha iyi adapte olduğunu ve uyum sağladığını göstermektedir. 3 biyomateryal için biyomateryal

yüzeyine tutunan hücre sayıları ve hücre sıklığı açısından değerlendirildiğinde, ham bioglass'ta kültürasyonun 14. gününde yapılan SEM incelemesinde biyomateriyal yüzeyi incelendiğinde oldukça az sayıda hücre tutunduğu görülmektedir. YVS'de tutulan bioglass için ise yüzeye tutunan hücre sayısının daha çok olduğu ancak farklı alanlar taranmasına rağmen yassı ve sitoplazmik uzantıları bulunan hücrelere rastlanmadığı görüldü. Modifiye bioglass için yapılan farklı günlerdeki SEM değerlendirmelerinde ise yüzeye tutunan hücre sayısının daha fazla olduğu, yassı morfolojideki hücrelerin varlığı ve sferoid morfolojideki hücreleri koloni oluşturmuş tarzda görüldüğü dikkat çekmektedir.

Yüzey modifikasyonu biyomateriyallerin hidrofobik veya hidrofilik özelliklerini değiştirerek hücre tutunması, proliferasyonu ve farklılaşması üzerine etki eder (Arima ve Iwata, 2007; Zhao vd., 2015). Ayrıca biyomateriyaller üzerine kaplanan NH_2 , CH_3 ve COOH gibi fonksiyonel grupların fibronektine bağlanma kapasitesini arttırdığı bildirilmektedir (Keselowsky, Collard ve García, 2003). Bu durum modifiye bioglass grubunda 3, 7 ve 14. günlerde hücre tutunmasının daha iyi olmasını açıklamaktadır. Yassı hücre morfolojisi osteojenik farklılaşmanın göstergesi olarak bildirilmektedir (Ventre, Causa ve Netti, 2012). Ayrıca yassı hücrelerdeki belirgin uzantılar hücrelerin iyi yayıldığını ve sıkı bağlandığını gösterdiklerinden (Clupper vd., 2003) preosteoblast hücrelerinin (MC3T3-E1) biyomateriyale adaptasyonunun kanıtı niteliğindedir. Bu nedenle SEM incelemelerinde hücre adezyonunun, hücre uzamasının (elongation) ve uzantıları belirgin hücrelerin modifiye bioglass grubunda daha fazla görülmesi MB'nin osteojenik potansiyelinin daha iyi olduğunu göstermektedir. Ayrıca söz konusu özellikler biyomateriyale karşı hücre davranışının önemli bir göstergesi olduğundan implantasyonda beklenen hücre yanıtı hakkında da fikir vermektedir.

Bioglass kemik doku mühendisliğinde kullanılan bir biyomalzemedir (Hench, 2009; Hoppe vd., 2011). Bu tez çalışmasında 45S5 olarak bilinen ham bioglass'ın hem yapay vücut sıvısında bekletilen hem de amino asit karışımıyla modifiye edilen formları karşılaştırılmıştır. *In vitro* olarak ALP aktiviteleri ve Alizarin Red S ile boyanarak kalsiyum depozitleri gösterilmiştir. Testlerde kullanılan MC3T3-E1 hücre hattı preosteoblast hücre hattıdır. Bu nedenle biyomateriyaller üzerine ekimi yapılan MC3T3-E1 hücrelerinin ALP aktivitesi ve kültür ortamındaki kalsiyum miktarı osteojenik aktiviteyi göstermesi bakımından önemlidir ve sonuçları birlikte

değerlendirilmiştir. Yapılan önceki çalışmalarda artan ALP aktivitesinin osteoblast fenotipinin ve farklılaşmasının erken belirteçlerinden biri olduğu belirtilmektedir (Boanini vd., 2006). Preosteoblast hücrelerinin (MC3T3-E1) farklılaşma süreci proliferasyon, ekstrasellüler matriks olgunlaşması ve mineralizasyon aşamalarını içermektedir (Beck, 2003). Başka bir deyişle osteoblast proliferasyonu ve farklılaşması kemik mineralizasyonundan önce gerçekleşmektedir (Beresford, Graves ve Smoothy, 1993; Ramaswamy, Wu, Zhou ve Zreiqat, 2008). Bioglass'tan ortama salınan bazı iyonların (Ca, Sr gibi) osteoblastların metabolik aktivitesini arttırdığı, ALP aktivitesi, osteojenik gen ekspresyonu ve matriks mineralizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Silver, Deas ve Erecińska, 2001; Valerio, Pereira, Goes ve Leite, 2004). Ayrıca önceki çalışmalarda ortama amino asit ilavesinin (aspartik asit, arjinin, lizin gibi) osteoblast farklılaşmasını ve ekstrasellüler mineralizasyonunu arttırdığı bildirilmektedir (Toricelli vd., 2002; Sarig, 2004; Rautaray, Mandal ve Sastry, 2005). Test sonuçları değerlendirildiğinde; modifiye bioglass'ın ALP aktivitesini ve mineralizasyonu arttırmasının daha önceden bildirilen literatür verileriyle uyumlu olduğu ve YVS'de bekletilen bioglass ve ham bioglass'tan osteojenik potansiyel açısından üstün olduğu görülmektedir. Bu durum ise modifiye bioglass'tan ortama salınan iyonların ve yüzey modifikasyonunda kullanılan amino asitlerin varlığıyla açıklanabilir.

Yeni üretilen bir biyomateriyalin karakterizasyonu ve *in vitro* testlerle değerlendirilmesi, etkinliğinin ve biyouyumluluğunun belirlenmesi için oldukça önemlidir. Biyomedikal cihaz kapsamında değerlendirilen yeni biyomateriyallerin insan kullanımından önce çeşitli deney hayvanları üzerinde test edilmesi ve kullanılacağı amaca göre spesifik değerlendirilmesi de gerekebilir. Doku kayıplı kırıklar, malformasyonlar veya kemik dokuya ait geniş rezeksiyon gerektiren tümör cerrahilerinde kullanılma potansiyeli taşıyan yeni veya çeşitli modifikasyonlarla üretilen biyomateriyallerin taşınması gereken özelliklerden biri de osteoindüktif olmasıdır. Osteoindüktivite en genel hatlarıyla kemik doku olmayan bir dokuya (deri altı, kas içi gibi) implante edilen biyomateriyalin, kök hücreleri uyarak implantasyon bölgesinde ektopik kemik oluşumu olarak tarif edilebilir. Tanımdan da anlaşılacağı gibi osteoindüktivite özelliği bir biyomateriyalin kemik oluşturabilme kabiliyetidir ve bu kabiliyetin değerlendirilmesinde kullanılan testlerden biri de osteoindüktif potansiyel testidir (OİP). Bu çalışma kapsamında MB'nin

osteoindüktivitesini göstermek amacıyla yapılan OİP testinde; MB'nin değerlendirilen preparatlardaki kemik oluşturma kapasitesi %16,04 olarak hesaplandı. Hesaplanan bu değer test standardında belirtilen skor karşılığı '2' olduğundan MB'nin osteoindüktif potansiyelini belirlemek için yapılan bu testten geçtiği söylenebilir.

Bioglass için daha önceden yapılan OİP testleri incelendiğinde Poh vd.'nin (2016) yaptığı ve implantasyon için atimik çıplak sıçanlarda deri altı modeli kullandıkları çalışmada, histolojik incelemelerde ektopik kemik oluşumu gözlemediklerini bildirmişlerdir. Westhauser vd.'nin (2016) immunsuprese farelerde yaptığı ve arka ekstremitte bölgesinde deri altı implantasyon yöntemini kullandıkları çalışmada, uygulanan biyoglass numunesinin osteoindüktif özellik gösterdiğini oran vermeksizin bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında OİP testinden elde edilen veriler daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında incelenen dokulardaki kemik oluşumu oransal olarak karşılaştırılamadığından OİP açısından MB'nin diğer bioglass modifikasyonlarına olan üstünlüğünden bahsedilememiştir. Bir diğer durum ise test için kullanılan hayvan modelinin ve uygulama bölgesinin OİP'in değerlendirilmesi açısından farklı sonuçlar doğurabileceği gerçeğidir. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda aynı biyomateriyalin kas içi uygulaması ile deri altı uygulamasının OİP açısından farklılık gösterebileceği bildirilmiştir (Yang vd., 1996). Farklı bir çalışmada ise hayvan türüne bağlı olarak (uygulama bölgesi ve şekli aynı olsa da) OİP testi sonuçlarının da farklı olabileceği bildirilmiştir (Ripamonti, 1996). Bu nedenle atimik çıplak farelerde kas içi implante edilen MB'nin osteoindüktif özellik gösterdiği söylenirken, uygulama bölgesi/şekli veya tür farklılıklarının OİP açısından fark yaratabileceği gözardı edilmemelidir.

MB'nin osteoindüktif aktivite göstermesinde modifikasyon işlemi sonucu oluşan hidroksiapatit'in yanısıra yüzey modifikasyonunda kullanılan amino asitlerin varlığı düşünülebilir. Daha önce yapılan bir çalışmada fenilalanin içeren bioglass'ta biyoaktivitenin ve mineralizasyon kabiliyetinin arttığı bildirilmiştir (Stakleff vd., 2013). Başka bir çalışmada ise histidin bağlı bir biyomateriyalin osteoindüktivite açısından daha iyi olduğu bildirilmiş ve bu durumu histidinin katyonik yapısına bağlı olarak hücre tutunmasını arttırmasıyla ilişkilendirmişlerdir (Iwasaki vd., 2015; Jahed vd., 2019). Ayrıca bu çalışmada *in vitro* testlerin değerlendirilmesiyle ilgili kısımlarda da belirtildiği gibi aspartik asit, arjinin ve lizin gibi amino asitlerin

osteoblast farklılaşmasını ve matriks mineralizasyonunu arttırdığı bilinmektedir (Toricelli vd., 2002; Sarig, 2004; Rautaray vd., 2005). Bu nedenle MB'nin yüzeyinde bulunan amino asitlerin gerek hücre tutunmasını gerekse osteojenik hücrelerin farklılaşma ve mineralizasyon kabiliyetini arttırması osteojeniteyi olumlu yönde etkilemiştir.

Tez çalışmasının son aşamasında ekstremite defekt modelinde MB'nin YVS'de bekletilen bioglass'ın ve ham bioglass'ın etkinliği değerlendirildi. Cerrahi olarak rat tibial unikortikal kritik boyutlu defekt modeli oluşturuldu. Kritik boyutlu kemik defekti kendiliğinden iyileşmeyecek boyuttaki kemik kusurunu ifade etmektedir (Keating vd., 2005). Her ne kadar tanım olarak kendiliğinden iyileşmeyen kemik hasarı olarak söylene de hayvan modelleri için düşünüldüğünde deney sürelerinin bir sınırı olacağından Gosain vd.'nin (2000) söylediği gibi çalışma boyunca iyileşmeyen kemik kusurları için kritik boyutlu olarak nitelemek daha uygun görünmektedir. Bu nedenle deney süresi, hayvan türü ve uygulanan bölgeye göre defekt boyutu değişiklik göstermektedir (Keating vd., 2005; Sanders vd., 2014). Rat için 3 mm uzunluğunda 3mm çapında tam katman unikortikal defektin kritik boyutlu olduğu bildirilmiştir (Lewandrowski vd., 1999). Ayrıca Bernabé vd.'nin (2012) yaptıkları çalışmada 4mm x 4mm boyutlarındaki tibial defektin kritik boyutta olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle bu çalışmada 4x4 mm'lik tibial defekt modeli kullanıldı.

Kritik boyutlu unikortikal tibial defektin postmortem 1, 2 ve 3 aylık uygulama gruplarına ait histopatolojik değerlendirmeleri Emery değerlendirme skoruna göre yapıldı ve daha sonra istatistik karşılaştırmalar yapıldı. MB grubuna ait değerlendirme skorlarına bakıldığında 1, 2 ve 3 aylık uygulamalarda hem YVS'de bekletilen bioglass grubu hem de ham bioglass grubundan yüksek olduğu görüldü. Ham bioglass ile MB arasında yapılan istatistik karşılaştırmalarda MB'nin 1, 2 ve 3 aylık uygulama grupları için istatistik olarak anlamlı bir fark gösterdiği görülmektedir. YVS'de bekletilen bioglass grubu ile MB arasındaki karşılaştırmada ise MB YVS'de bekletilen bioglass grubundan 1 ve 3 aylık uygulama grupları için istatistik olarak anlamlı fark gösterirken 2 aylık uygulama grubu için değerlendirme skoru açısından daha iyi olduğu ancak aradaki farkın istatistik olarak anlamlı olmadığı ($p=0,08$) görüldü. Değerlendirme sonuçlarına bakıldığında MB'nin osteokondüktivitesinin daha iyi olduğu ancak geliştirmeye açık olduğu söylenebilir. Bu çalışmada etkinlik testi için deney hayvanı olarak sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar

yetişkin olduklarında da kemik rejenerasyon süreçlerini büyük ölçüde devam ettiriler (Ghafoor, 2019). Bu çalışmada negatif kontrol grubunun 3 ay sonundaki iyileşmesine bakıldığında beklenenden daha iyi bir iyileşme olduğu görülmektedir. Bu durum yetişkin sıçanların kemik rejenerasyon kabiliyetleri ve devam eden büyüme olgusuyla açıklanabilir.

Bir biyomateriyalin konak doku ile olan ilişkisi yüzeyi ile doğrudan ilgilidir. Konak-biyomateriyal arayüzünde meydana gelen olaylar biyoaktivitenin en önemli belirleyicilerindendir. Bioglass vücutta hidroksiapatit oluşturma kabiliyetiyle kemik doku için ideal bir biyomateriyaldir. Bu çalışmada modifikasyon işlemi ile bioglass'ın yüzeyinde hem hidroksiapatit şekillenmesi hem de amino asit kaplaması yapılmıştır. Yapılan daha önceki çalışmalarda çeşitli amino asitlerin *iv vitro* testlerle osteojenik aktiviteyi ve mineralizasyonu olumlu yönde etkilediği vurgulanmaktadır (Toricelli vd., 2002; Sarig, 2004; Rautaray vd., 2005). Başka bir çalışmada fare osteoblast hücrelerinin bulunduğu kültür ortamına arjinin ilavesinin IGF-1 ve kollajen sentezini arttırdığı bildirilmektedir (Chevalley, Rizzoli, Manen, Caverzasio ve Bonjour, 1998). Ayrıca arjinin ve L-lizin kombinasyonunun osteoblast hücreler üzerinde proliferasyonu ve tip-1 kollajen sentezini arttırdığı başka bir çalışmayla gösterilmiştir (Trippel, 1998). Bu çalışmada MB'nin YVS'de bekletilen bioglass grubuna göre farklı olmasının nedeni kullanılan amino asit kombinasyonunun osteokondüktiviteyi ve osteoindüktiviteyi daha iyi desteklemesinden kaynaklanmış olabilir. Cerrahi prosedür esnasında defekt oluşturulduktan sonra kanama tamponlanarak durduruldu ve biyomateriyaller defekt alanına dolduruldu. YVS ve ham bioglass gruplarında defekt alanı tamamen biyomateriyal ile doldurulduktan sonra kanama görülmezken, MB grubunda biyomateriyali koyduktan hemen sonra bir miktar kanama olduğu daha sonra ise pıhtılaşmanın gerçekleştiği gözlemlendi. Bu durumun sadece amino asit kombinasyonu ile modifiye edilen bioglass'ta görülmesi dikkat çekerken; kanama ve devamındaki pıhtılaşma ile kemik iliğinden gelen kök hücrelerin ve kan pulcuklarının osteoblastik aktivite açısından yarar sağlamış olabileceği akla gelmektedir.

Bu çalışmada kemik defekt modelinde aynı zamanda implantasyon testi için de değerlendirmeler yapıldı. ISO 10993 test standartlarına göre yapılan değerlendirmelerde MB'nin doku reaksiyonuna yol açmadığı ve biyouyumlu olduğu sonucuna varıldı. İmplantasyon testinin değerlendirilmesinde kullanılan kriterlerden

biri de anjiyogenezdır. İmplantasyon sonrası bağ doku proliferasyonuna eşlik eden anjiyogenez yabancı cisim reaksiyonu ile ilişkilendirilir ve inflamatuvar yanıtı ifade eder (Dreanca vd., 2021). Kemik ve kas doku yaralanmalarında ise spesifik olarak immün hücre ve sitokin salımıyla seyreden inflamatuvar yanıt oluşur, bu yanıt revaskülarizasyon gerektiren doku yaralanmalarında hayati önem taşır (Tidball, 2005; Mountziaris ve Mikos, 2008; Jin, Yang ve Li, 2010). Bu nedenle revaskülarizasyon kemik iyileşmesinde büyük önem taşır. Çünkü anjiyogenez osteogenez için olmazsa olmaz süreçlerden biridir (Zelzer ve Olsen, 2005; Geris, Gerisch, Vander Sloten, Weiner ve Van Oosterwyck, 2008). Biyomateryal aracılı bir uygulamada defekt alanına implante edilen biyomateryal, mekanik desteğin yanı sıra hem hücre göçü ve proliferasyonuna hem de anjiyogenez için uygun ortam sağlar. Kemik doku için bu durum osteokondüktivite terimi ile ifade edilebilir. Bu anlamda MB'nin osteogenezi desteklediği ve osteokondüktif özellik gösterdiği söylenebilir ancak defekt boyutu kritik boyutta olduğunda, başka bir deyişle büyük defektlerde osteokondüktivitenin yanı sıra osteoindüktivite de gereklidir. Anjiyogenezin iyi olmasının bir diğer önemi de damar duvarında bulunan olgunlaşmamış vasküler perisitlerdir (Chang vd., 1997). Bu olgunlaşmamış endotelial hücrelerin aynı zamanda osteoprogenitör hücreler olduğu bildirilmektedir (Zengin vd., 2006; Matsumoto vd., 2008). Bu nedenle angiogenez osteoblast popülasyonunun artmasına katkı sağlar.

Modifiye bioglass'ın değerlendirildiği bu tez çalışmasında çeşitli *in vitro* ve *in vivo* testlerle MB'nin osteojenitesi, osteokondüktivitesi ve osteoindüktivitesi gibi özellikleri incelendi. Yapılan test sonuçlarına bakıldığında MB'nin YVS'de bekletilen bioglass ve ham bioglass'tan çoğunlukla üstün olduğu görüldü. Ancak test metotları açısından değerlendirilecek olursa bazı ilave testlerin yapılmasının MB'nin potansiyel özelliklerini belirlemek açısından daha iyi olabileceği düşünülmektedir. Örneğin FT-IR ölçümlerinde tespit edilen absorpsiyon piklerinin ve SEM görüntülerinde tespit edilen hidroksiapatit ve amino asit kristali gibi yapıların EDS ile elemental kompozisyonunu belirleyerek kimyasal karakterizasyonunu yapmak daha objektif sonuçlar alınmasına olanak sağlayabilir. Benzer şekilde MB'nin potansiyel özelliklerini *in vitro* olarak çeşitli gen ekspresyonlarının gösterilebildiği moleküler tekniklerle veya *in vivo* olarak farklı hayvan ve defekt modelleri ile gerek

immunohistokimyasal gerekse moleküler tekniklerle spesifik gen ekspresyonlarının gösterildiği ileri çalışmalar yapılabilir.

Bu çalışmada modifiye bioglass için yapılan *in vitro* ve *in vivo* testlerden elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, modifiye bioglass'ın osteojenik potansiyelinin ham bioglass ve YVS'de bekletilen bioglass'a göre daha üstün olduğu; bioglass'ın, düşük maliyeti, kolay temin edilebilirliği ve uygulama pratikliği gibi avantajları olan amino asitlerle yüzey modifikasyonu yapılarak sert doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabileceği görülmektedir. Sonuç olarak modifiye bioglass'ın sert doku mühendisliği uygulamaları için uygun nitelikte bir biyomateryal olduğu ve ilave çalışmalarla klinik kullanımına doğru yol alınması gerektiği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdal-hay, A., Sheikh, F. A. ve Lim, J. K. (2013). Air jet spinning of hydroxyapatite/poly (lactic acid) hybrid nanocomposite membrane mats for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 635-643.
- Adawy, A., Abd El-Fattah, W. I., El-Sayed, E.S.M. ve Talaat, M.S. (2009). "Biomimetic Coating of Precalcified Ti-6Al-4V Alloy", *The Open Medical Devices Journal*, 1:19-28
- Agarwal, R. ve García, A. J. (2019). Surface modification of biomaterials. *In Principles of regenerative medicine* (pp. 651-660). Academic Press.
- Aguilar, L.M.C., Silva, S.M. ve Moulton, S.E. (2019). Growth factor delivery: Defining the next generation platforms for tissue engineering. *Journal of controlled Release*, 306, pp.40-58.
- Albrektsson, T. ve Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European spine journal*, 10(2), S96-S101.
- Andersen, M. A. (1989). Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *JBJS*, 71(6), 953.
- Anderson, J. M. (2001). Biological responses to materials. *Annual review of materials research*, 31(1), 81-110.
- Anderson, J. M., Rodriguez, A. ve Chang, D. T. (2008, April). Foreign body reaction to biomaterials. *In Seminars in immunology* (Vol. 20, No. 2, pp. 86-100). Academic Press.
- Arana-Chavez, V. E. ve Bradaschia-Correa, V. (2009). Clastic cells: Mineralized tissue resorption in health and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(3), 446-450.
- Arima, Y. ve Iwata, H. (2007). Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-define
- Aronson, J. (1997). Current concepts review-limb-lengthening, skeletal reconstruction, and bone transport with the Ilizarov method. *JBJS*, 79(8), 1243-58.
- Aszódi, A., Bateman, J. F., Gustafsson, E., Boot-Handford, R. ve Fässler, R. (2000). Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: What can we learn from knockout mice? *Cell structure and function*, 25(2), 73-84.
- Atala, A. (2006). Recent developments in tissue engineering and regenerative medicine. *Current Opinion in Pediatrics*, 18(2), 167-171. (1) (2008), pp. 1-5

Atala, A., Kasper, F. K. ve Mikos, A. G. (2012). Engineering complex tissues. *Science translational medicine*, 4(160), 160rv12-160rv12.

Baino, F., Hamzehlou, S. ve Kargozar, S. (2018). Bioactive glasses: Where are we and where are we going? *Journal of functional biomaterials*, 9(1), 25.

Bakhshandeh, B., Soleimani, M., Ghaemi, N. ve Shabani, I. (2011). Effective combination of aligned nanocomposite nanofibers and human unrestricted somatic stem cells for bone tissue engineering. *Acta Pharmacologica Sinica*, 32(5), 626-636.

Bakhshandeh, B., Zarrintaj, P., Oftadeh, M. O., Keramati, F., Fouladiha, H., Sohrabi-Jahromi, S. ve Ziraksaz, Z. (2017). Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 33(2), 144-172.

Balamurugan, A., Rebelo, A., Kannan, S., Ferreira, J. M. F., Michel, J., Balossier, G. ve Rajeswari, S. (2007). Characterization and in vivo evaluation of sol-gel derived hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V substrates. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 81(2), 441-447.

Bandyopadhyay, A., Shivaram, A., Tarafder, S., Sahasrabudhe, H., Banerjee, D. ve Bose, S. (2017). In vivo response of laser processed porous titanium implants for load-bearing implants. *Annals of biomedical engineering*, 45(1), 249-260.

Barrere, F., Van Blitterswijk, C.A. ve Groot K. (2006). Bone regeneration: Molecular and Cellular Interactions with Calcium Phosphate Ceramics. *International Journal of Nanomedicine*, 1: 317-332.

Bayraktar, D. ve Taş, A.C. (1999). "Chemical Preparation of Carbonated Calcium Hydroxyapatite Powders at 37°C in Urea-Containing Synthetic Body Fluids", *Journal of the European Ceramic Society*, 19:2573-2579.

Beck Jr, G. R. (2003). Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *Journal of cellular biochemistry*, 90(2), 234-243.

Beresford, J. N., Graves, S. E. ve Smoothy, C. A. (1993). Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation? *American journal of medical genetics*, 45(2), 163-178.

Bergsma, J. E., De Bruijn, W. C., Rozema, F. R., Bos, R. R. M. ve Boering, G. (1995). Late degradation tissue response to poly (L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials*, 16(1), 25-31.

Berisio, R., Vitagliano, L., Mazzarella, L. ve Zagari, A. (2002). Recent progress on collagen triple helix structure, stability and assembly. *Protein and Peptide Letters*, 9(2), 107-116.

Bernabé, P. F. E., Melo, L. G. N., Cintra, L. T. A., Gomes-Filho, J. E., Dezan Jr, E. ve Nagata, M. J. H. (2012). Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. *Clinical Oral Implants Research*, 23(3), 384-388.

- Bernardini, G., Chellini, F., Frediani, B., Spreafico, A. ve Santucci, A. (2015). Human platelet releasates combined with polyglycolic acid scaffold promote chondrocyte differentiation and phenotypic maintenance. *Journal of biosciences*, 40(1), 61-69.
- Berner, A., Reichert, J. C., Woodruff, M. A., Saifzadeh, S., Morris, A. J., Epari, D. R., Nerlich, M., Schuetz, M.A. ve Hutmacher, D. W. (2013). Autologous vs. allogenic mesenchymal progenitor cells for the reconstruction of critical sized segmental tibial bone defects in aged sheep. *Acta biomaterialia*, 9(8), 7874-7884.
- Berthiaume, F., Maguire, T. J. ve Yarmush, M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 2, 403-430.
- Beuerlein, M. J. ve McKee, M. D. (2010). Calcium sulfates: What is the evidence? *Journal of orthopaedic trauma*, 24, S46-S51.
- Beutler, E. (1989). Nutritional and metabolic aspects of glutathione. *Annual review of nutrition*, 9(1), 287-302.
- Bi, H. ve Jin, Y. (2013). Current progress of skin tissue engineering: Seed cells, bioscaffolds, and construction strategies. *Burns & trauma*, 1(2), 2321-3868.
- Bigham-Sadegh, A. ve Oryan, A. (2015). Selection of animal models for pre-clinical strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue regeneration and engineering. *Connective tissue research*, 56(3), 175-194.
- Bittner, S. M., Guo, J. L., Melchiorri, A. ve Mikos, A. G. (2018). Three-dimensional printing of multilayered tissue engineering scaffolds. *Materials Today*, 21(8), 861-874.
- Black, C. R., Goriainov, V., Gibbs, D., Kanczler, J., Tare, R. S. ve Oreffo, R. O. (2015). Bone tissue engineering. *Current molecular biology reports*, 1(3), 132-140.
- Blokhuis, T. J., Termaat, M. F., Den Boer, F. C., Patka, P., Bakker, F. C. ve Henk, J. T. M. (2000). Properties of calcium phosphate ceramics in relation to their in vivo behavior. *Journal of trauma and acute care surgery*, 48(1), 179.
- Blom, A. W., Wylde, V., Livesey, C., Whitehouse, M. R., Eastaugh-Waring, S., Bannister, G. C. ve Learmonth, I. D. (2009). Impaction bone grafting of the acetabulum at hip revision using a mix of bone chips and a biphasic porous ceramic bone graft substitute: Good outcome in 43 patients followed for a mean of 2 years. *Acta orthopaedica*, 80(2), 150-154.
- Boanini, E., Torricelli, P., Gazzano, M., Giardino, R. ve Bigi, A. (2006). Nanocomposites of hydroxyapatite with aspartic acid and glutamic acid and their interaction with osteoblast-like cells. *Biomaterials*, 27(25), 4428-4433.
- Boccaccini, A. R., Notingher, I., Maquet, V. ve Jérôme, R. (2003). Bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams filled with and coated by Bioglass® particles for tissue engineering applications. *Journal of materials science: materials in medicine*, 14(5), 443-450.

- Bohner, M. (2001). Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *European Spine Journal*, 10(2), S114-S121.
- Bonewald, L. F. (2007). Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1116(1), 281-290.
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of bone and mineral research*, 26(2), 229-238.
- Bonfield, W. (2018). Elasticity and viscoelasticity of cortical bone. In *Natural and living biomaterial*, (pp. 43-60). CRC Press.
- Bosch, C., Melsen, B. ve Vargervik, K. (1998). Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *The Journal of craniofacial surgery*, 9(4), 310-316.
- Bose, S., Robertson, S. F. ve Bandyopadhyay, A. (2018). Surface modification of biomaterials and biomedical devices using additive manufacturing. *Acta biomaterialia*, 66, 6-22.
- Boyce, B. F. ve Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of biochemistry and biophysics*, 473(2), 139-146.
- Brandi, M. L. (2010). How innovations are changing our management of osteoporosis. *Medicographia*, 32(1), 1-6.
- Brauker, J. H., Carr-Brendel, V. E., Martinson, L. A., Crudele, J., Johnston, W. D. ve Johnson, R. C. (1995). Neovascularization of synthetic membranes directed by membrane microarchitecture. *Journal of biomedical materials research*, 29(12), 1517-1524.
- Brinker, C. J. ve Scherer, G. W. (2013). *Sol-gel science: The physics and chemistry of sol-gel processing*. New York: Academic press.
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O. ve Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New england journal of medicine*, 331(14), 889-895.
- Bruder, S. P. ve Caplan, A. I. (2000). Bone regeneration through cellular engineering. *Principles of tissue engineering*, 2, 683-696.
- Buck, D. W. ve Dumanian, G. A. (2012). Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plastic and reconstructive surgery*, 129(6), 1314-1320.
- Buckwalter, J. A. (1991). Healing of the musculoskeletal tissues. *Rockwood and Green's fractures in adults*.
- Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R. ve Recker, R. (1996). Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instructional course lectures*, 45, 371-386.
- Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R. ve Recker, R. (1995). Bone biology. *J Bone Joint Surg Am*, 77(8), 1256-1275.

Buo, A. M. ve Stains, J. P. (2014). Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. *FEBS letters*, 588(8), 1315-1321.

Burdick, J. A., Mauck, R. L., Gorman III, J. H. ve Gorman, R. C. (2013). Acellular biomaterials: An evolving alternative to cell-based therapies. *Science translational medicine*, 5(176), 176ps4-176ps4.

Burg, K. J. L., Holder, W. D., Culberson, C. R., Beiler, R. J., Greene, K. G., Loebbeck, A. B., Roland, W.D., Mooney, D.J. ve Halberstadt, C. R. (1999). Parameters affecting cellular adhesion to polylactide films. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 10(2), 147-161.

Burr, D. B. (2019). Bone morphology and organization. In *Basic and applied bone biology* (pp. 3-26). New York: Academic Press.

Cacciotti, I., Lombardi, M., Bianco, A., Ravaglioli, A. ve Montanaro, L. (2012). Sol-gel derived 45S5 bioglass: Synthesis, microstructural evolution and thermal behaviour. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(8), 1849-1866.

Calori, G. M., Mazza, E. L., Mazzola, S., Romanò, F., Colombo, A., Monzani, V. ve Colombo, M. (2018). Pseudoartrosi e perdite di sostanza periprotetice: Inquadramento nel paziente a rischio. *LO SCALPELLO-OTODI Educational*, 32(1), 65-67.

Calori, G. M., Mazza, E., Colombo, M. ve Ripamonti, C. (2011). The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? *Injury*, 42, S56-S63.

Cao, W. ve Hench, L. L. (1996). Bioactive materials. *Ceramics international*, 22(6), 493-507.

Capulli, M., Paone, R. ve Rucci, N. (2014). Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Archives of biochemistry and biophysics*, 561, 3-12.

Carsin, H., Ainaud, P., Le Bever, H., Rives, J. M., Lakhel, A., Stephanazzi, J., Lambert, F. ve Perrot, J. (2000). Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: A five year single-center experience with 30 patients. *Burns*, 26(4), 379-387.

Catizone, A., Ricci, G., Del Bravo, J. ve Galdieri, M. (2006). Hepatocyte growth factor modulates in vitro survival and proliferation of germ cells during postnatal testis development. *Journal of endocrinology*, 189(1), 137-146.

Chang, H. N., Garetto, L. P., Potter, R. H., Katona, T. R., Lee, C. H. ve Roberts, W. E. (1997). Angiogenesis and osteogenesis in an orthopedically expanded suture. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 111(4), 382-390.

Chang, S. W. ve Buehler, M. J. (2014). Molecular biomechanics of collagen molecules. *Materials Today*, 17(2), 70-76.

Chehroudi, B. ve Brunette, D. M. (2002). Subcutaneous microfabricated surfaces inhibit epithelial recession and promote long-term survival of percutaneous implants. *Biomaterials*, 23(1), 229-237.

- Chen, L., Deng, C., Li, J., Yao, Q., Chang, J., Wang, L. ve Wu, C. (2019). 3D printing of a lithium-calcium-silicate crystal bioscaffold with dual bioactivities for osteochondral interface reconstruction. *Biomaterials*, 196, 138-150.
- Chen, Q. Z., Thompson, I. D. ve Boccaccini, A. R. (2006). 45S5 Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(11), 2414-2425.
- Chen, Y., Mak, A. F. T., Wang, M., Li, J. S. ve Wong, M. S. (2008). In vitro behavior of osteoblast-like cells on PLLA films with a biomimetic apatite or apatite/collagen composite coating. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(6), 2261-2268.
- Chevalley, T. H., Rizzoli, R., Manen, D., Caverzasio, J. ve Bonjour, J. P. (1998). Arginine increases insulin-like growth factor-I production and collagen synthesis in osteoblast-like cells. *Bone*, 23(2), 103-109.
- Cho, H. H., Kyoung, K. M., Seo, M. J., Kim, Y. J., Bae, Y. C. ve Jung, J. S. (2006). Overexpression of CXCR4 increases migration and proliferation of human adipose tissue stromal cells. *Stem cells and development*, 15(6), 853-864.
- Cipitria, A., Reichert, J. C., Epari, D. R., Saifzadeh, S., Berner, A., Schell, H., Mehta, M., Schuetz, M.A., Duda, G.N. ve Hutmacher, D. W. (2013). Polycaprolactone scaffold and reduced rhBMP-7 dose for the regeneration of critical-sized defects in sheep tibiae. *Biomaterials*, 34(38), 9960-9968.
- Civitelli, R., Stains, J. P., Shin, C. S. ve Jørgensen, N. R. (2008). Intercellular junctions and cell–cell communication in the skeletal system. *Principles of bone biology*, 425-445.
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, (Supplement 3), S131-S139.
- Clupper, D. C., Gough, J. E., Hall, M. M., Clare, A. G., LaCourse, W. C. ve Hench, L. L. (2003). In vitro bioactivity of S520 glass fibers and initial assessment of osteoblast attachment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 67(1), 285-294.
- Coleman, K., Dai, X., Deng, X., Lakehal, F. ve Tang, X. (2012). Medical device biocompatibility evaluation: An industry perspective. In *Biocompatibility and Performance of Medical Devices*, (pp. 201-227e). Woodhead Publishing.
- Comesaña, R., Lusquiños, F., Del Val, J., López-Álvarez, M., Quintero, F., Riveiro, A., Boutinguiza, M., Carlos, A., Jones, J.R., Hill, R.G. ve Pou, J. (2011). Three-dimensional bioactive glass implants fabricated by rapid prototyping based on CO2 laser cladding. *Acta Biomaterialia*, 7(9), 3476-3487.
- Cooper, D. K., Pierson III, R. N., Hering, B. J., Mohiuddin, M. M., Fishman, J. A., Denner, J., Ahn, C., Azimzadeh, A.M., Buhler, L.H., Cowan, P.J., Hawthorne, W.J., Kobayashi, T. ve Sachs, D. H. (2017). Regulation of clinical xenotransplantation time for a reappraisal. *Transplantation*, 101(8), 1766.

Cooper, R. R., Milgram, J. W. ve Robinson, R. A. (1966). Morphology of the osteon: An electron microscopic study. *JBJS*, 48(7), 1239-1271.

Crockett, J. C., Mellis, D. J., Scott, D. I. ve Helfrich, M. H. (2011). New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: Focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporosis International*, 22(1), 1-20.

Cui, N., Qian, J., Liu, T., Zhao, N. ve Wang, H. (2015). Hyaluronic acid hydrogel scaffolds with a triple degradation behavior for bone tissue engineering. *Carbohydrate polymers*, 126, 192-198.

Currey, J. D. (2012). The structure and mechanics of bone. *Journal of Materials Science*, 47(1), 41-54.

Curtis, A. S. ve Wilkinson, C. D. (1998). Reactions of cells to topography. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 9(12), 1313-1329.

Cutting, C. B., McCarthy, J. G. ve Berenstein, A. (1984). Blood supply of the upper craniofacial skeleton: The search for composite calvarial bone flaps. *Plastic and reconstructive surgery*, 74(5), 603-610.

D'Agostino, A., Stellavato, A., Busico, T., Papa, A., Tirino, V., Papaccio, G., La Gatta, A., De Rosa, M. ve Schiraldi, C. (2015). In vitro analysis of the effects on wound healing of high-and low-molecular weight chains of hyaluronan and their hybrid H-HA/L-HA complexes. *BMC Cell biology*, 16(1), pp.1-15.

Daculsi, G. ve Passuti, N. (1990). Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 11, 86-87.

Dallas, S. L., Prideaux, M. ve Bonewald, L. F. (2013). The osteocyte: An endocrine cell... and more. *Endocrine reviews*, 34(5), 658-690.

Damink, L. O., Dijkstra, P. J., Van Luyn, M. J. A., Van Wachem, P. B., Nieuwenhuis, P. ve Feijen, J. (1996). Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials*, 17(8), 765-773.

Damoulis, P. D. ve Hauschka, P. V. (1997). Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(3), 412-422.

Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P. ve Varanasi, S. S. (2008). The cell biology of bone metabolism. *Journal of clinical pathology*, 61(5), 577-587.

De Souza, L. P., Lopes, J. H., Ferreira, F. V., Martin, R. A., Bertran, C. A. ve Camilli, J. A. (2020). Evaluation of effectiveness of 45S5 bioglass doped with niobium for repairing critical-sized bone defect in in vitro and in vivo models. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 108(3), 446-457.

Dellooye, C., Cornu, O., Druez, V. ve Barbier, O. (2007). Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume*, 89, 574-579.

Denker, H. W. (1999). Embryonic stem cells: An exciting field for basic research and tissue engineering, but also an ethical dilemma? *Cells Tissues Organs*, 165(3-4), 246-249.

Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T. ve Sakthi, K. D. (2012). International Journal of Polymer Science: Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *Cellular Polymers*, 31(1), 51-52.

Dickson, I., Millar, E. A. ve Veis, A. (1975). Evidence for abnormality of bone-matrix proteins in osteogenesis imperfecta. *The Lancet*, 306(7935), 586-587.

Dimitriou, R., Tsiridis, E. G. ve Giannoudis, P. V. (2005). Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*, 36(12), 1392-1404.

Doherty, M. J., Ashton, B. A., Walsh, S., Beresford, J. N., Grant, M. E. ve Canfield, A. E. (1998). Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(5), 828-838.

Downey, P. A. ve Siegel, M. I. (2006). Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Physical therapy*, 86(1), 77-91.

Dreanca, A., Muresan-Pop, M., Taulescu, M., Tóth, Z. R., Bogdan, S., Pestean, C., Oren, S., Toma, C., Popescu, A., Pall, E., Sevastre, B., Baia, L. ve Magyari, K. (2021). Bioactive glass-biopolymers-gold nanoparticle based composites for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 123, 112006.

Ducheyne, P., Healy, K., Hutmacher, D. W., Grainger, D. W. ve Kirkpatrick, C. J. (2011). *Comprehensive Biomaterials*. Amsterdam: Elsevier Ltd.

Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. ve Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89(5), 747-754.

Dzobo, K., Thomford, N. E., Senthebane, D. A., Shipanga, H., Rowe, A., Dandara, C., Pillay, M. ve Motaung, K. S. C. M. (2018). Advances in regenerative medicine and tissue engineering: Innovation and transformation of medicine. *Stem cells international*, 2018.

Einhorn, T. A. (1998). The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 355, S7-S21.

Emery, S.E., Brazinski, M.S., Koka, A., Bensusan, J.S., Stevenson, S. (1994) The biological and biomechanical effects of irradiation on anterior spinal bone grafts in a canine model. *J Bone Jt Surg*, 76:540.

Erdost H. (2011). Kemik Dokusu. Temel Histoloji. A Özer (editör). Cilt 1. Baskı 2. s. 237-262. Nobel Yayınevi.

Erickson, I. E., Kestle, S. R., Zellars, K. H., Farrell, M. J., Kim, M., Burdick, J. A. ve Mauck, R. L. (2012). High mesenchymal stem cell seeding densities in hyaluronic acid hydrogels produce engineered cartilage with native tissue properties. *Acta biomaterialia*, 8(8), 3027-3034.

Eriksen, E. F., Axelrod, D. W. ve Melsen, F. (1994). *Bone histomorphometry*. New York: Raven Press.

- Eşrefoğlu M. (2016). *Genel Histoloji*. 2. Baskı, İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık.
- Evans, M. J. ve Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154-156.
- Eybl, E., Grimm, M., Grabenwöger, M., Böck, P., Müller, M. M. ve Wolner, E. (1992). Endothelial cell lining of bioprosthetic heart valve materials. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 104(3), 763-769.
- Fackelman, G. E. (Ed.). (2002). *Bone in Clinical Orthopedics*. New York: Thieme.
- Fakhry, M., Hamade, E., Badran, B., Buchet, R. ve Magne, D. (2013). Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World journal of stem cells*, 5(4), 136.
- Feng, Q., Wei, K., Lin, S., Xu, Z., Sun, Y., Shi, P., Li, G. ve Bian, L. (2016). Mechanically resilient, injectable, and bioadhesive supramolecular gelatin hydrogels crosslinked by weak host-guest interactions assist cell infiltration and in situ tissue regeneration. *Biomaterials*, 101, 217-228.
- Fernandez de Grado, G., Keller, L., Idoux-Gillet, Y., Wagner, Q., Musset, A. M., Benkirane-Jessel, N., Bornert, F. ve Offner, D. (2018). Bone substitutes: A review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *Journal of tissue engineering*, 9, 2041731418776819.
- Fillingham, Y. A., Lenart, B. A. ve Gitelis, S. (2012). Function after injection of benign bone lesions with a bioceramic. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 470(7), 2014-2020.
- Fillingham, Y. ve Jacobs, J. (2016). Bone grafts and their substitutes. *The bone & joint journal*, 98(1_Supple_A), 6-9.
- Fini, M., Torricelli, P., Giavaresi, G., Carpi, A., Nicolini, A. ve Giardino, R. (2001). Effect of L-lysine and L-arginine on primary osteoblast cultures from normal and osteopenic rats. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 55(4), 213-220.
- Finkemeier, C. G. (2002). Bone-grafting and bone-graft substitutes. *JBJS*, 84(3), 454-464.
- Flemming, R. G., Murphy, C. J., Abrams, G. A., Goodman, S. L. ve Nealey, P. F. (1999). Effects of synthetic micro-and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials*, 20(6), 573-588.
- Flenniken, A.M., Osborne, L.R., Anderson, N., Ciliberti, N., Fleming, C., Gittens, J.E., Gong, X.Q., Kelsey, L.B., Lounsbury, C., Moreno, L., Nieman, B.J., Peterson, K., Qu, D., Roscoe, W., Shao, Q., Tong, D., Veitch, G.I., Voronina, I., Vukobradovic, I., Wood, G.A., Zhu, Y., Zirngibl, R.A., Aubin, J.E., Bai, D., Bruneau, B.G., Grynpas, M., Henderson, J.E., Henkelman, R.M., McKerlie, C., Sled, J.G., Stanford, W.L., Laird, D.W., Kidder, G.M., Adamson, S.L. ve Rossant, J. A. (2005). Gja1 missense mutation in a mouse model of oculodentodigital dysplasia. *Development*. 2005 Oct;132(19):4375-86. doi: 10.1242/dev.02011. PMID: 16155213.

Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. ve Cerri, P. S. (2015). Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed research international*, 2015.

Fodor, W. L. (2003). Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: The potential to replace, repair and regenerate. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 1-6.

Franz-Odendaal, T. A., Hall, B. K. ve Witten, P. E. (2006). Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Developmental dynamics: An official publication of the American Association of Anatomists*, 235(1), 176-190.

Freyman, T. M., Yannas, I. V. ve Gibson, L. J. (2001). Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Progress in Materials science*, 46(3-4), 273-282.

Freymann, U., Endres, M., Neumann, K., Scholman, H. J., Morawietz, L. ve Kaps, C. (2012). Expanded human meniscus-derived cells in 3-D polymer-hyaluronan scaffolds for meniscus repair. *Acta biomaterialia*, 8(2), 677-685.

Friess, W. (1998). Collagen-biomaterial for drug delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 45(2), 113-136.

Frohbergh, M. E., Katsman, A., Botta, G. P., Lazarovici, P., Schauer, C. L., Wegst, U. G. ve Lelkes, P. I. (2012). Electrospun hydroxyapatite-containing chitosan nanofibers crosslinked with genipin for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 33(36), 9167-9178.

Garlotta, D. (2001). A literature review of poly (lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 9(2), 63-84.

Garnero, P. (2015). The role of collagen organization on the properties of bone. *Calcified tissue international*, 97(3), 229-240.

Geris, L., Gerisch, A., Vander Sloten, J., Weiner, R. ve Van Oosterwyck, H. (2008). Angiogenesis in bone fracture healing: A bioregulatory model. *Journal of theoretical biology*, 251(1), 137-158.

Gerstenfeld, L. C., Alkhiary, Y. M., Krall, E. A., Nicholls, F. H., Stapleton, S. N., Fitch, J. L., Bauer, M., Kayal, R., Graves, D.T., Jepsen, K.J. ve Einhorn, T. A. (2006). Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54(11), 1215-1228.

Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T. ve Einhorn, T. A. (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of cellular biochemistry*, 88(5), 873-884.

Ghafoor, S. (2019). Bioactive Glass: Regeneration in Critical Size Defects in Tibia of Animal Models. *JPDA*, 28(03), 137.

Giannoudis, P. V. ve Einhorn, T. A. (2009). Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury*, 40, S1-S3.

Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H. ve Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes: An update. *Injury*, 36(3), S20-S27.

Goldberg, V. M. ve Akhavan, S. (2005). Biology of bone grafts. *Bone regeneration and repair*, 57-65.

Goldhahn, J., Féron, J. M., Kanis, J., Papapoulos, S., Reginster, J. Y., Rizzoli, R., Dere, W., Mitlak, B., Tsouderos, Y. ve Boonen, S. (2012). Implications for fracture healing of current and new osteoporosis treatments: An ESCEO consensus paper. *Calcified tissue international*, 90(5), 343-353.

Goller, G., Demirkiran, H., Oktar, F. N. ve Demirkesen, E. (2003). Processing and characterization of bioglass reinforced hydroxyapatite composites. *Ceramics International*, 29(6), 721-724.

Gomes, P. S. ve Fernandes, M. H. (2011). Rodent models in bone-related research: The relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory animals*, 45(1), 14-24.

Gosain, A. K., Song, L., Yu, P., Mehrara, B. J., Maeda, C. Y., Gold, L. I. ve Longaker, M. T. (2000). Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF- β isoforms. *Plastic and reconstructive surgery*, 106(2), 360-371.

Gough, J. E., Notingher, I. ve Hench, L. L. (2004). Osteoblast attachment and mineralized nodule formation on rough and smooth 45S5 bioactive glass monoliths. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 68(4), 640-650.

Gough, J. E., Scotchford, C. A. ve Downes, S. (2002). Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly (vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 61(1), 121-130.

Goulet, J. A., Senunas, L. E., DeSilva, G. L. ve Greenfield, M. L. V. (1997). Autogenous iliac crest bone graft: complications and functional assessment. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 339, 76-81.

Grabowski, P. (2009). Physiology of bone. *Calcium and Bone Disorders in Children and Adolescents*, 16, 32-48.

Grande, D. A., Pitman, M. I., Peterson, L., Menche, D. ve Klein, M. (1989). The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *Journal of Orthopaedic Research*, 7(2), 208-218.

Green, E., Lubahn, J. D. ve Evans, J. (2005). Risk factors, treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture. *Journal of surgical orthopaedic advances*, 14(2), 64-72.

Green, J., Schotland, S., Stauber, D. J., Kleeman, C. R. ve Clemens, T. L. (1995). Cell-matrix interaction in bone: type I collagen modulates signal transduction in osteoblast-like cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 268(5), C1090-C1103.

Green, S. A., Jackson, J. M., Wall, D. M., Marinow, H. ve Ishkanian, J. (1992). Management of segmental defects by the Ilizarov intercalary bone transport method. *Clinical orthopaedics and related research*, (280), 136-142.

Greenbaum, M. A. ve Kanat, I. O. (1993). Current concepts in bone healing. Review of the literature. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 83(3), 123-129.

Grigoriadis A. E., Heersche J. N. M. ve Aubin J. E., (1988). Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *Journal of Cell Biology*, vol. 106, no. 6, pp. 2139–2151.

Gugala, Z., Lindsey, R. W. ve Gogolewski, S. (2007, August). New approaches in the treatment of critical-size segmental defects in long bones. In *Macromolecular symposia* (Vol. 253, No. 1, pp. 147-161). Weinheim: WILEY-VCH Verlag.

Gundberg, C. M. (2003). Matrix proteins. *Osteoporosis international*, 14(5), 37-42.

Gupta, A. R. (2001). Perioperative and long-term complications of iliac crest bone graft harvesting for spinal surgery: a quantitative review of the literature. *Int Med J.*, 8, 163-166.

Hadjidakis, D. J. ve Androulakis, I. I. (2006). Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092(1), 385-396.

Hassan, M. Q., Maeda, Y., Taipaleenmaki, H., Zhang, W., Jafferji, M., Gordon, J. A., Li, Z., Croce, C.M., Van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S.ve Lian, J. B. (2012). miR-218 directs a Wnt signaling circuit to promote differentiation of osteoblasts and osteomimicry of metastatic cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(50), 42084-42092.

Haugen, H. J., Lyngstadaas, S. P., Rossi, F. ve Perale, G. (2019). Bone grafts: Which is the ideal biomaterial? *Journal of Clinical Periodontology*, 46, 92-102.

Hellberg, C., Östman, A. ve Heldin, C. H. (2010). PDGF and vessel maturation. *Angiogenesis inhibition*, 103-114.

Hench, L. L. (1998). Bioactive materials: The potential for tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials*, 41(4), 511-518.

Hench, L. L. (2006). The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(11), 967-978. DOI 10.1007/s10856-006-0432-z

Hench, L. L. (2009). Genetic design of bioactive glass. *Journal of the European Ceramic Society*, 29(7), 1257-1265.

Hench, L. L., Splinter, R. J., Allen, W. C. ve Greenlee, T. K. (1971). Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 5, 117–141. doi:10.1002/jbm.820050611

Hing, K. A., Wilson, L. F. ve Buckland, T. (2007). Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *The Spine Journal*, 7(4), 475-490.

Hoppe, A., Gldal, N. S. ve Boccaccini, A. R. (2011). A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, 32(11), 2757-2774.

Horst, M., Madduri, S., Milleret, V., Sulser, T., Gobet, R. ve Eberli, D. (2013). A bilayered hybrid microfibrous PLGA–acellular matrix scaffold for hollow organ tissue engineering. *Biomaterials*, 34(5), 1537-1545.

Hu, H., Hilton, M. J., Tu, X., Yu, K., Ornitz, D. M. ve Long, F. (2005). Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development*, vol. 132, no. 1, pp. 49–60.

Huan, Z. ve Chang, J. (2007). Self-setting properties and in vitro bioactivity of calcium sulfate hemihydrate–tricalcium silicate composite bone cements. *Acta biomaterialia*, 3(6), 952-960.

Huang, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A. ve Madihally, S. V. (2005). In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(36), 7616-7627.

Huiskes, R., Ruimerman, R., Van Lenthe, G. H. ve Janssen, J. D. (2000). Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature*, 405(6787), 704-706.

Hulse, D. ve Hyman, B. (1993). Fracture biology and biomechanics. *Textbook of small animal surgery*, 2, 1785-1792.

Hunter, N. L. ve Sherman, R. E. (2017). Combination products: modernizing the regulatory paradigm. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(8), 513-514.

Hunziker, E. B. (1994). Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microscopy research and technique*, 28(6), 505-519.

Hutmacher D.W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21:2529–43.

Iwasaki, T., Tokuda, Y., Kotake, A., Okada, H., Takeda, S., Kawano, T. ve Nakayama, Y. (2015). Cellular uptake and in vivo distribution of polyhistidine peptides. *Journal of Controlled Release*, 210, 115-124.

Izal, I., Aranda, P., Sanz-Ramos, P., Ripalda, P., Mora, G., Granero-Moltó, F., Deplaine, H., Gomez-Ribelles, J.L., Ferrer, G.G., Acosta, V., Ochoa, I., Garcia-Aznar, J.M., Andreu, E.J., Monleon-Pradas, M., Doblare, M. ve Prósper, F. (2013). Culture of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on of poly (L-lactic acid) scaffolds: Potential application for the tissue engineering of cartilage. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 21(8), 1737-1750.

Jahed, V., Vasheghani-Farahani, E., Bagheri, F., Zarrabi, A., Fink, T. ve Larsen, K. L. (2019). Enhanced cellular uptake of phenamil through inclusion complex with histidine functionalized β -cyclodextrin as penetrative osteoinductive agent. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 8221.

Jepsen, K. J. (2009). Systems analysis of bone. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 1(1), 73-88.

- Jin, R., Yang, G. ve Li, G. (2010). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: Role of inflammatory cells. *Journal of leukocyte biology*, 87(5), 779-789.
- Jones, J. R. (2013). Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta biomaterialia*, 9(1), 4457-4486.
- Jones, J. R. ve Boccaccini, A. R. (2005). Biomedical applications: Tissue engineering. *Cellular ceramics: Structure, manufacturing, properties and applications*, 547-570.
- Jones, J. R. ve Hench, L. L. (2003). Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 7(4-5), 301-307.
- Kaderly, R. E. (1991, February). Primary bone healing. In *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)* (Vol. 6, No. 1, pp. 21-25).
- Kapinas, K., Kessler, C., Ricks, T., Gronowicz, G. ve Delany, A. M. (2010). miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25221-25231.
- Karageorgiou, V. ve Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474-5491.
- Karsenty, G., Kronenberg, H. M. ve Settembre, C. (2009). Genetic control of bone formation. *Annual Review of Cell and Developmental*, 25, 629-648.
- Kashif, I., Soliman, A. A., Sakr, E. M. ve Ratep, A. (2012). Effect of different conventional melt quenching technique on purity of lithium niobate (LiNbO₃) nano crystal phase formed in lithium borate glass. *Results in Physics*, 2, 207-211.
- Kasuga, T., Hosoi, Y., Nogami, M. ve Niinomi, M. (2001). Apatite formation on calcium phosphate invert glasses in simulated body fluid. *Journal of the American Ceramic Society*, 84(2), 450-52.
- Keane, T. J. ve Badylak, S. F. (2014, June). Biomaterials for tissue engineering applications. In *Seminars in pediatric surgery* (Vol. 23, No. 3, pp. 112-118). WB Saunders.
- Keating, J. F., Simpson, A. H. R. W. ve Robinson, C. M. (2005). The management of fractures with bone loss. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 87(2), 142-150.
- Keramaris, N. C., Calori, G. M., Nikolaou, V. S., Schemitsch, E. H. ve Giannoudis, P. V. (2008). Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*, 39, S45-S57.
- Keselowsky, B. G., Collard, D. M. ve García, A. J. (2003). Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 66(2), 247-259.

Kew, S. J., Gwynne, J. H., Enea, D., Brookes, R., Rushton, N., Best, S. M. ve Cameron, R. E. (2012). Synthetic collagen fascicles for the regeneration of tendon tissue. *Acta biomaterialia*, 8(10), 3723-3731.

Khan, S. N., Cammisa Jr, F. P., Sandhu, H. S., Diwan, A. D., Girardi, F. P. ve Lane, J. M. (2005). The biology of bone grafting. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 13(1), 77-86.

Kim, H. M., Miyaji, F., Kokubo, T., Ohtsuki, C. ve Nakamura, T. (1995). Bioactivity of Na₂O-CaO-SiO₂ glasses. *Journal of the American Ceramic Society*, 78(9), 2405-2411.

Kim, J. H., Sim, J. H., Lee, S., Seol, M. A., Ye, S. K., Shin, H. M., Lee, E.B., Lee, Y.J., Choi, Y.J., Yoo, W.H., Kim, J.H., Kim, W.U., Lee, D.S., Kim, J.H., Kang, I., Kang, S.W. ve Kim, H. R. (2017). Interleukin-7 induces osteoclast formation via STAT5, independent of receptor activator of NF-kappaB ligand. *Frontiers in immunology*, 8, 1376.

Kim, S. E., Yun, Y. P., Shim, K. S., Park, K., Choi, S. W., Shin, D. H. ve Suh, D. H. (2015). Fabrication of a BMP-2-immobilized porous microsphere modified by heparin for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 134, 453-460.

Kim, S. R., Lee, J. H., Kim, Y. T., Riu, D. H., Jung, S. J., Lee, Y. J., Chunk, S.C. ve Kim, Y. H. (2003). Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors. *Biomaterials*, 24(8), 1389-1398.

Kim, Y. S., Smoak, M. M., Melchiorri, A. J. ve Mikos, A. G. (2019). An overview of the tissue engineering market in the United States from 2011 to 2018. *Tissue engineering part A*, 25(1-2), 1-8.

Kimsa, M. C., Strzalka-Mrozik, B., Kimsa, M. W., Gola, J., Nicholson, P., Lopata, K. ve Mazurek, U. (2014). Porcine endogenous retroviruses in xenotransplantation Molecular aspects. *Viruses*, 6(5), 2062-2083.

King, W. J. ve Krebsbach, P. H. (2012) Growth Factor Delivery: How Surface Interactions Modulate Release in Vitro and in Vivo. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 64 (12), 1239–1256

Kitaori, T., Ito, H., Schwarz, E. M., Tsutsumi, R., Yoshitomi, H., Oishi, S., Nakano, M., Fujii, N., Nagasawa, T. ve Nakamura, T. (2009). Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 60(3), 813-823.

Kokubo, T. ve Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27(15), 2907-2915.

Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S. Ve Kishimoto, T. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89(5), 755-764.

Koons, G. L., Diba, M. ve Mikos, A. G. (2020). Materials design for bone-tissue engineering. *Nature Reviews Materials*, 5(8), 584-603.

Kowalchuk, R. M. ve Pollack, S. R. (1993). Stress-Generated potentials in bone: Effects of bone fluid composition and kinetics. *Journal of orthopaedic research*, 11(6), 874-883.

Kumar, G. ve Narayan, B. (2014). The biology of fracture healing in long bones. In *Classic Papers in Orthopaedics*, (pp. 531-533). Springer, London.

Kundu, B., Lemos, A., Soundrapandian, C., Sen, PS., Datta, S., Ferreira, JMF. ve Basu, D. (2010). "Development of porous HAp and β -TCP scaffolds by starch consolidation with foaming method and drug-chitosan bilayered scaffold based drug delivery system". *J Mater. Sci. Mater. Med*, 21 (11): 2955-69.

Kuroiwa, M., Chihara, K. ve Higashi, S. (1994). Electron microscopic studies on Sharpey's fibers in the alveolar bone of rat molars. *Kaibogaku zasshi. Journal of Anatomy*, 69(6), 776-782.

Kwong, F. N. ve Harris, M. B. (2008). Recent developments in the biology of fracture repair. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 16(11), 619-625.

Langer, R. ve Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920-926.

Laurencin, C. T., Lu, H. H. ve Khan, Y. (2002). Processing of polymer scaffolds: Polymer-ceramic composite foams. *Methods of tissue engineering*, 705-714.

Lauzon, M. A., Bergeron, É., Marcos, B. ve Faucheux, N. (2012). Bone repair: New developments in growth factor delivery systems and their mathematical modeling. *Journal of controlled release*, 162(3), 502-520.

Lee, K. Y. ve Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1), 106-126.

Lee, S. K. ve Lorenzo, J. (2006). Cytokines regulating osteoclast formation and function. *Current opinion in rheumatology*, 18(4), 411-418.

Lee, S. S., Huang, B. J., Kaltz, S. R., Sur, S., Newcomb, C. J., Stock, S. R., Shah, R.N. ve Stupp, S. I. (2013). Bone regeneration with low dose BMP-2 amplified by biomimetic supramolecular nanofibers within collagen scaffolds. *Biomaterials*, 34(2), 452-459.

Lee, W. H., Loo, C. Y. ve Rohanizadeh, R. (2014). A review of chemical surface modification of bioceramics: Effects on protein adsorption and cellular response. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 122, 823-834.

Lee, W. H., Loo, C. Y., Van, K. L., Zavgorodniy, A. V. ve Rohanizadeh, R. (2012). Modulating protein adsorption onto hydroxyapatite particles using different amino acid treatments. *Journal of The Royal Society Interface*, 9(70), 918-927.

- Lee, W. H., Loo, C. Y., Zavgorodniy, A. V. ve Rohanizadeh, R. (2013). High protein adsorptive capacity of amino acid-functionalized hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(3), 873-883.
- LeGeros, R. Z. (2002). Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 395, 81-98.
- Lei, Y., Rahim, M., Ng, Q. ve Segura, T. (2011). Hyaluronic acid and fibrin hydrogels with concentrated DNA/PEI polyplexes for local gene delivery. *Journal of controlled release*, 153(3), 255-261.
- Lewandrowski, K. U., Cattaneo, M. V., Gresser, J. D., Wise, D. L., White, R. L., Bonassar, L. ve Trantolo, D. J. (1999). Effect of a poly (propylene fumarate) foaming cement on the healing of bone defects. *Tissue Engineering*, 5(4), 305-316.
- Li, L., Li, J., Guo, J., Zhang, H., Zhang, X., Yin, C., Wang, Y., Zhu, Y. ve Yao, Q. (2019). 3D molecularly functionalized cell-free biomimetic scaffolds for osteochondral regeneration. *Advanced Functional Materials*, 29(6), 1807356.
- Li, Z. ve Zhang, M. (2005). Chitosan–alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 75(2), 485-493.
- Li, Z., Ramay, H. R., Hauch, K. D., Xiao, D. ve Zhang, M. (2005). Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *biomaterials*, 26(18), 3919-3928.
- Lin S.Y. ve Wang S.L. (2011). Advances in simultaneous DSC–FTIR microspectroscopy for rapid solid-state chemical stability studies: Some dipeptide drugs as examples. *Adv Drug Delivery Rev*, 64 (2012) 461-478.
- Lindsey, R. W., Gugala, Z., Milne, E., Sun, M., Gannon, F. H. ve Latta, L. L. (2006). The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. *Journal of orthopaedic research*, 24(7), 1438-1453.
- Loessner, D., Meinert, C., Kaemmerer, E., Martine, L. C., Yue, K., Levett, P. A., Klein, T.J., Melchels, F.P.W., Khademhosseini, A. ve Hutmacher, D. W. (2016). Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl–based hydrogels as modular tissue culture platforms. *Nature protocols*, 11(4), 727-746.
- Longhini, R., Aparecida de Oliveira, P., Sasso-Cerri, E. ve Cerri, P. S. (2014). Cimetidine reduces alveolar bone loss in induced periodontitis in rat molars. *Journal of Periodontology*, 85(8), 1115-1125.
- Lueckgen, A., Garske, D. S., Ellinghaus, A., Mooney, D. J., Duda, G. N. ve Cipitria, A. (2019). Enzymatically-degradable alginate hydrogels promote cell spreading and in vivo tissue infiltration. *Biomaterials*, 217, 119294.
- Luo, Z., Zhang, S., Pan, J., Shi, R., Liu, H., Lyu, Y., Han, X., Yang, Y., Xu, Z., Sui, Y., Luo, E., Zhang, Y. ve Wei, S. (2018). Time-responsive osteogenic niche of stem

cells: a sequentially triggered, dual-peptide loaded, alginate hybrid system for promoting cell activity and osteo-differentiation. *Biomaterials*, 163, 25-42.

Lutolf, M. P. ve Hubbell, J. A. (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature biotechnology*, 23(1), 47-55.

Luxenburg, C., Geblinger, D., Klein, E., Anderson, K., Hanein, D., Geiger, B. ve Addadi, L. (2007). The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: From podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS ONE*, 2, e179.

Mahla, R. S. (2016). Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. *International journal of cell biology*, 2016.

Mak, A. F. T. (1990). Streaming potential in bone. *Biomechanics of Diarthrodial Joints*, 175-194.

Mallakpour, S. ve Aalizadeh, R. (2013). A simple and convenient method for the surface coating of TiO₂ nanoparticles with bioactive chiral diacids containing different amino acids as the coupling agent. *Progress in Organic Coatings*, 76(4), 648-653.

Mallakpour, S. ve Dinari, M. (2011). Insertion of novel optically active poly (amide-imide) chains containing pyromellitoyl-bis-L-phenylalanine linkages into the nanolayered silicates modified with L-tyrosine through solution intercalation. *Polymer*, 52(12), 2514-2523.

Mallakpour, S., Dinari, M. ve Behranvand, V. (2013). Ultrasonic-assisted synthesis and characterization of layered double hydroxides intercalated with bioactive N, N'-(pyromellitoyl)-bis-l- α -amino acids. *RSC advances*, 3(45), 23303-23308.

Manolagas, S. C. (2006). Choreography from the tomb: An emerging role of dying osteocytes in the purposeful, and perhaps not so purposeful, targeting of bone remodeling. *IBMS BoneKEy*, 3, 5.

Marks Jr, S. C. ve Popoff, S. N. (1988). Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton. *American Journal of Anatomy*, 183(1), 1-44.

Marsell, R. ve Einhorn, T. A. (2010). Emerging bone healing therapies. *Journal of orthopaedic trauma*, 24, S4-S8.

Marsell, R. ve Einhorn, T. A. (2011). The biology of fracture healing. *Injury*, 42(6), 551-555.

Martin, R. B. ve Burr, D. B. (1989). *Structure, function, and adaptation of compact bone*. New York: Raven Press.

Mason, C. ve Dunnill, P. (2008). A brief definition of regenerative medicine. *Regenerative Medicine*, vol 3, no 1.

Matos, M. A., Araújo, F. P. ve Paixão, F. B. (2008). Histomorphometric evaluation of bone healing in rabbit fibular osteotomy model without fixation. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 3(1), 1-5.

Matsumoto, T., Kuroda, R., Mifune, Y., Kawamoto, A., Shoji, T., Miwa, M., Asahara, T. ve Kurosaka, M. (2008). Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing. *Bone*, 43(3), 434-439.

McGovern, J. A., Griffin, M. ve Hutmacher, D. W. (2018). Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Disease models & mechanisms*, 11(4), dmm033084.

McKay, C. S. ve Finn, M. G. (2014). Click chemistry in complex mixtures: Bioorthogonal bioconjugation. *Chemistry & biology*, 21(9), 1075-1101.

McKee, M. D. (2006). Management of segmental bony defects: the role of osteoconductive orthobiologics. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 14(10), S163-S167.

McNamara, I., Deshpande, S. ve Porteous, M. (2010). Impaction grafting of the acetabulum with a mixture of frozen, ground irradiated bone graft and porous synthetic bone substitute (Apapore 60). *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 92(5), 617-623.

Meyer, K. ve Palmer, J. W. (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, 107(3), 629-634.

Miao, T., Wang, J., Zeng, Y., Liu, G. ve Chen, X. (2018). Polysaccharide-based controlled release systems for therapeutics delivery and tissue engineering: from bench to bedside. *Advanced science*, 5(4), p.1700513.

Miguez-Pacheco, V., Hench, L. L. ve Boccaccini, A. R. (2015). Bioactive glasses beyond bone and teeth: Emerging applications in contact with soft tissues. *Acta biomaterialia*, 13, 1-15.

Minoux, M. ve Rijli, F. M. (2010). Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development*, 137(16), 2605-2621.

Mohamad Yunos, D., Bretcanu, O. ve Boccaccini, A. R. (2008). Polymer-bioceramic composites for tissue engineering scaffolds. *Journal of Materials Science*, 43(13), 4433-4442.

Mollazadeh, S., Javadpour, J. ve Khavandi, A., (2007) "In Situ Synthesis And Characterization of Nano-Size Hydroxyapatite in Poly(Vinyl Alcohol) Matrix", *Ceramics International*, 33, 1579-1583.

Monier, M., Ayad, D. M. ve Abdel-Latif, D. A. (2012). Adsorption of Cu (II), Cd (II) and Ni (II) ions by cross-linked magnetic chitosan-2-aminopyridine glyoxal Schiff's base. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94, 250-258.

Mountziaris, P. M. ve Mikos, A. G. (2008). Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14(2), 179-186.

Mu, C., Zhang, K., Lin, W. ve Li, D. (2013). Ring-opening polymerization of genipin and its long-range crosslinking effect on collagen hydrogel. *Journal of biomedical materials research Part A*, 101(2), 385-393.

- Mulari, M., Vääräniemi, J. ve Väänänen, H. K. (2003). Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microscopy Research and Technique*, 61, 496–503.
- Mullender, M. G., Van Der Meer, D. D., Huiskes, R. ve Lips, P. (1996). Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. *Bone*, 18(2), 109-113.
- Murphy, C. M., Haugh, M. G. ve O'Brien, F. J. (2010). The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31(3), 461-466.
- Nagy, A., Gocza, E., Diaz, E. M., Prideaux, V. R., Iványi, E., Markkula, M. ve Rossant, J. (1990). Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development*, 110(3), 815-821.
- Nakamura, T., Shirakata, Y., Shinohara, Y., Miron, R. J., Hasegawa-Nakamura, K., Fujioka-Kobayashi, M. ve Noguchi, K. (2017). Comparison of the effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and-9 on bone formation in rat calvarial critical-size defects. *Clinical oral investigations*, 21(9), 2671-2679.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R. ve De Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1), 17-29.
- Narayanan, R. P., Melman, G., Letourneau, N. J., Mendelson, N. L. ve Melman, A. (2012). Photodegradable iron (III) cross-linked alginate gels. *Biomacromolecules*, 13(8), 2465-2471.
- Navsaria, H. A., Myers, S. R., Leigh, I. M. ve McKay, I. A. (1995). Culturing skin in vitro for wound therapy. *Trends in biotechnology*, 13(3), 91-100.
- Nayak, S., Manivasagam, G. ve Sen, D. (2018). Progress of regenerative therapy in orthopedics. *Current Osteoporosis Reports*, 16(2), 169-181.
- Neffe, A. T., Pierce, B. F., Tronci, G., Ma, N., Pittermann, E., Gebauer, T., Frank, O., Schossig, M., Xu, X., Willie, B.M., Forner, M., Ellinghaus, A., Lienau, J., Duda, G.N. ve Lendlein, A. (2015). One step creation of multifunctional 3D architected hydrogels inducing bone regeneration. *Advanced Materials*, 27(10), 1738-1744.
- Nerem, R. M. (1992). Tissue engineering in the USA. *Medical and Biological Engineering and computing*, 30(4), CE8-CE12.
- Nesbitt, S. A. ve Horton, M. A. (1997). Trafficking of matrix collagens through bone resorbing osteoclasts. *Science*, 276, 266–273.
- Neubauer, V. J., Döbl, A. ve Scheibel, T. (2021). Silk-Based Materials for Hard Tissue Engineering. *Materials*, 14(3), 674.
- Niyibizi, C. ve Eyre, D. R. (1989). Bone type V collagen: Chain composition and location of a trypsin cleavage site. *Connective tissue research*, 20(1-4), 247-250.

Ohtsuki, C., Kokubo, T. ve Yamamuro, T. (1992). Mechanism of apatite formation on $\text{CaOSiO}_2\text{P}_2\text{O}_5$ glasses in a simulated body fluid. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 143, 84-92.

Olsen, B. R., Reginato, A. M. ve Wang, W. (2000). Bone development. *Annual review of cell and developmental biology*, 16(1), 191-220.

Olson, J. L., Atala, A. ve Yoo, J. J. (2011). Tissue engineering: Current strategies and future directions. *Chonnam medical journal*, 47(1), 1-13.

Ono D., Bamba T., Oku Y., Yonetani T. ve Fukusaki E. (2011). Application of Fourier transform near-infrared spectroscopy to optimization of green tea steaming process conditions. *J Biosci Bioeng*, vol:112 No. 3, 247-251.

Ortega, N., Behonick, D. J. ve Werb, Z. (2004). Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends in cell biology*, 14(2), 86-93.

Oryan, A., Monazzah, S. ve Bigham-Sadegh, A. (2015). Bone injury and fracture healing biology. *Biomedical and environmental sciences*, 28(1), 57-71.

Pape, H. C., Giannoudis, P. V., Grimme, K., van Griensven, M. ve Krettek, C. (2002). Effects of intramedullary femoral fracture fixation: What is the impact of experimental studies in regards to the clinical knowledge? *Shock*, 18(4), 291-300.

Park, S. A., Lee, S. H. ve Kim, W. D. (2011). Fabrication of porous polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering. *Bioprocess and biosystems engineering*, 34(4), 505-513.

Patka, P. (1984). Bone replacement by calcium phosphate ceramics: an experimental study. *VU Uitgeverij/Free University Press*.

Peng, H., Yin, Z., Liu, H., Chen, X., Feng, B., Yuan, H., Au, B., Ouyang, H. ve Zhang, Y. (2012). Electrospun biomimetic scaffold of hydroxyapatite/chitosan supports enhanced osteogenic differentiation of mMSCs. *Nanotechnology*, 23(48), 485102.

Perng, C. K., Wang, Y. J., Tsi, C. H. ve Ma, H. (2011). In vivo angiogenesis effect of porous collagen scaffold with hyaluronic acid oligosaccharides. *Journal of Surgical Research*, 168(1), 9-15.

Perren, S. M. (2002). Evolution of the internal fixation of long bone fractures: The scientific basis of biological internal fixation: Choosing a new balance between stability and biology. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 84(8), 1093-1110.

Pertici, V., Trimaille, T., Laurin, J., Felix, M. S., Marqueste, T., Pettmann, B., Chauvin, J.P., Gigmes, D. ve Decherchi, P. (2014). Repair of the injured spinal cord by implantation of a synthetic degradable block copolymer in rat. *Biomaterials*, 35(24), 6248-6258.

Peters, C. L., Hines, J. L., Bachus, K. N., Craig, M. A. ve Bloebaum, R. D. (2006). Biological effects of calcium sulfate as a bone graft substitute in ovine metaphyseal defects. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of*

The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 76(3), 456-462.

Phan, T. C. A., Xu, J. ve Zheng, M. H. (2004). Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histology and histopathology.*, 19(4),1325-44.

Pienkowski, D. ve Pollack, S. R. (1983). The origin of stress-generated potentials in fluid-saturated bone. *Journal of Orthopaedic Research*, 1(1), 30-41.

Place, E. S., Nair, R., Chia, H. N., Szulgit, G., Lim, E. H. ve Stevens, M. M. (2012). Latent TGF- β Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Advanced healthcare materials*, 1(4), 480-484.

Poh, P. S., Hutmacher, D. W., Holzapfel, B. M., Solanki, A. K., Stevens, M. M. ve Woodruff, M. A. (2016). In vitro and in vivo bone formation potential of surface calcium phosphate-coated polycaprolactone and polycaprolactone/bioactive glass composite scaffolds. *Acta biomaterialia*, 30, 319-333.

Prasad, T., Shabeena, E. A., Vinod, D., Kumary, T. V. ve Anil Kumar, P. R. (2015). Characterization and in vitro evaluation of electrospun chitosan/polycaprolactone blend fibrous mat for skin tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(1), 1-13.

Qian, H., Wohl, A. R., Crow, J. T., Macosko, C. W. ve Hoyer, T. R. (2011). A strategy for control of “random” copolymerization of lactide and glycolide: Application to synthesis of PEG-b-PLGA block polymers having narrow dispersity. *Macromolecules*, 44(18), 7132-7140.

Qian, Y., Han, Q., Chen, W., Song, J., Zhao, X., Ouyang, Y., Yuan, W. ve Fan, C. (2017). Platelet-rich plasma derived growth factors contribute to stem cell differentiation in musculoskeletal regeneration. *Frontiers in chemistry*, 5, 89.

Quarto, N., Senarath-Yapa, K., Renda, A. ve Longaker, M. T. (2015). TWIST1 silencing enhances in vitro and in vivo osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by triggering activation of BMP-ERK/FGF signaling and TAZ upregulation. *Stem cells*, 33(3), 833-847.

Rahn, B. A. (1982). Bone healing: Histologic and physiologic concepts. *Bone in clinical orthopaedics*, 335-386.

Raisz, L. G. (1999). Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clinical chemistry*, 45(8), 1353-1358.

Raisz, L. G. ve Rodan, G. A. (1998). Embryology and cellular biology of bone. In *Metabolic bone disease and clinically related disorders*, (pp. 1-22). Academic Press.

Ramaswamy, Y., Wu, C., Zhou, H. ve Zreiqat, H. (2008). Biological response of human bone cells to zinc-modified Ca-Si-based ceramics. *Acta biomaterialia*, 4(5), 1487-1497.

Rámila, A. ve Vallet-Regí, M. (2001). Static and dynamic in vitro study of a sol-gel glass bioactivity. *Biomaterials*, 22(16), 2301-2306.

- Rasal, R. M. ve Hirt, D. E. (2009). Toughness decrease of PLA-PHBHHx blend films upon surface-confined photopolymerization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 88(4), 1079-1086.
- Rath, S. N., Brandl, A., Hiller, D., Hoppe, A., Gbureck, U., Horch, R. E., Boccacini, A.R. ve Kneser, U. (2014). Bioactive copper-doped glass scaffolds can stimulate endothelial cells in co-culture in combination with mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 9(12), e113319.
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. ve Lemons, J. E. (2004). Biomaterials science: An introduction to materials in medicine. *San Diego, California*, 162-4.
- Rautaray, D., Mandal, S. ve Sastry, M. (2005). Synthesis of hydroxyapatite crystals using amino acid-capped gold nanoparticles as a scaffold. *Langmuir*, 21(11), 5185-5191.
- Ravarian, R., Moztaizadeh, F., Hashjin, M. S., Rabiee, S. M., Khoshakhlagh, P. ve Tahriri, M. (2010). Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite. *Ceramics International*, 36(1), 291-297.
- Ravichandran, R., Sundarajan, S., Venugopal, J. R., Mukherjee, S. ve Ramakrishna, S. (2012). Advances in polymeric systems for tissue engineering and biomedical applications. *Macromolecular bioscience*, 12(3), 286-311.
- Reichert, J. C., Epari, D. R., Wulschleger, M. E., Saifzadeh, S., Steck, R., Lienau, J., Sommerville, S., Dickinson, I.C., Schütz M.A., Duda, G.N. ve Hutmacher, D. W. (2010). Establishment of a preclinical ovine model for tibial segmental bone defect repair by applying bone tissue engineering strategies. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 16(1), 93-104.
- Ren, X., Zhao, M., Lash, B., Martino, M. M. ve Julier, Z. (2020). Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7, 1–9.
- Ripamonti, U. (1996). Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials*, 17(1), 31-35.
- Roberts, T. T. ve Rosenbaum, A. J. (2012). Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: The bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis*, 8(4), 114-124.
- Robling, A. G., Castillo, A. B. ve Turner, C. H. (2006). Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 8, 455-498.
- Rocheffort, G. Y., Pallu, S. ve Benhamou, C. L. (2010). Osteocyte: The unrecognized side of bone tissue. *Osteoporosis international*, 21(9), 1457-1469.
- Romano, G. (2004). Stem cell transplantation therapy: Controversy over ethical issues and clinical relevance. *Drug news & perspectives*, 17(10), 637-645.

Roy, M., Bandyopadhyay, A. ve Bose, S. (2011). Induction plasma sprayed nano hydroxyapatite coatings on titanium for orthopaedic and dental implants. *Surface and Coatings Technology*, 205(8-9), 2785-2792.

Roy, M., Fielding, G. A., Beyenal, H., Bandyopadhyay, A. ve Bose, S. (2012). Mechanical, in vitro antimicrobial, and biological properties of plasma-sprayed silver-doped hydroxyapatite coating. *ACS applied materials & interfaces*, 4(3), 1341-1349.

Saboori, A., Rabiee, M., Moztarzadeh, F., Sheikhi, M., Tahriri, M. ve Karimi, M. (2009). Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of sol-gel-derived SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO bioglass. *Materials science and engineering: C*, 29(1), 335-340.

Safadi, F. F., Barbe, M. F., Abdelmagid, S. M., Rico, M. C., Aswad, R. A., Litvin, J. ve Popoff, S. N. (2009). Bone structure, development and bone biology. In *Bone pathology* (pp. 1-50). Humana Press.

Sağlam M, Özer A. ve Aştı RN. (2008). *Genel Histoloji*. 6. Baskı, Yorum Yayınevi, Ankara.

Saito, E., Saito, A., Kuboki, Y., Kimura, M., Honma, Y., Takahashi, T. ve Kawanami, M. (2012). Periodontal repair following implantation of beta-tricalcium phosphate with different pore structures in class III furcation defects in dogs. *Dental materials journal*, 31(4), 681-688.

Salgado, A. J., Coutinho, O. P. ve Reis, R. L. (2004). Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromolecular bioscience*, 4(8), 743-765.

Salgado, A. J., Coutinho, O. P. ve Reis, R. L. (2004). Novel starch-based scaffolds for bone tissue engineering: Cytotoxicity, cell culture, and protein expression. *Tissue engineering*, 10(3-4), 465-474.

Salgado, A. J., Oliveira, J. M., Martins, A., Teixeira, F. G., Silva, N. A., Neves, N. M., Sousa, N. ve Reis, R. L. (2013). Tissue engineering and regenerative medicine: Past, present, and future. *International review of neurobiology*, 108, 1-33.

Sanders, D. W., Bhandari, M., Guyatt, G., Heels-Ansdell, D., Schemitsch, E. H., Swiontkowski, M., Marc, M.D., Tornetta, P.M.D. ve Walter, S. (2014). Critical-sized defect in the tibia: Is it critical? Results from the SPRINT trial. *Journal of orthopaedic trauma*, 28(11), 632-635.

Sapir, Y., Kryukov, O. ve Cohen, S. (2011). Integration of multiple cell-matrix interactions into alginate scaffolds for promoting cardiac tissue regeneration. *Biomaterials*, 32(7), 1838-1847.

Sarig, S. (2004). Aspartic acid nucleates the apatite crystallites of bone: A hypothesis. *Bone*, 35(1), 108-113.

Sarker, B., Zehnder, T., Rath, S. N., Horch, R. E., Kneser, U., Detsch, R. ve Boccaccini, A. R. (2017). Oxidized alginate-gelatin hydrogel: A favorable matrix for growth and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells in 3D. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(8), 1730-1737.

Schaffler, M. B., Cheung, W. Y., Majeska, R. ve Kennedy, O. (2014). Osteocytes: Master orchestrators of bone. *Calcified tissue international*, 94(1), 5-24.

Schenk, R. (1994). Histological and ultrastructural features of fracture healing. *Bone formation and repair*.

Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P. ve Little, D. G. (2008, October). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 19, No. 5, pp. 459-466). Academic Press.

Sfeir, C., Ho, L., Doll, B. A., Azari, K. ve Hollinger, J. (2005). Fracture Repair in: Bone Regeneration and Repair. *Biol. Clin. Appl.*, 21.

Shafiee, A. ve Atala, A. (2017). Tissue engineering: Toward a new era of medicine. *Annual review of medicine*, 68, 29-40.

Shapiro, F. (1988). Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 70(7), 1067-1081.

Shapiro, F. (2008). Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater*, 15(53), e76.

Shen, Y., Yang, S., Liu, J., Xu, H., Shi, Z., Lin, Z., Ying, X., Guo, P., Lin, T., Yan, S., Huang, Q. ve Peng, L. (2014). Engineering scaffolds integrated with calcium sulfate and oyster shell for enhanced bone tissue regeneration. *ACS applied materials & interfaces*, 6(15), 12177-12188.

Shrivats, A. R., McDermott, M. C. ve Hollinger, J. O. (2014). Bone tissue engineering: State of the union. *Drug discovery today*, 19(6), 781-786.

Silva, S. S., Ferreira, R. A., Fu, L., Carlos, L. D., Mano, J. F., Reis, R. L. ve Rocha, J. (2005). Functional nanostructured chitosan-siloxane hybrids. *Journal of Materials Chemistry*, 15(35-36), 3952-3961.

Silver, I. A., Deas, J. ve Erecińska, M. (2001). Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: Effects of 45S5 Bioglass®, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials*, 22(2), 175-185.

Sodek, J. ve Mckee, M. D. (2000). Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology 2000*, 24(1), 99-126.

Soleimani, M., Mobasheri, H., Bakhshandeh, B., Shakhssalim, N., Soudi, S., Hafizi, M., Vasei, M. ve Dodel, M. (2012). Effective combination of hydrostatic pressure and aligned nanofibrous scaffolds on human bladder smooth muscle cells: Implication for bladder tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(9), 2281-2290.

Sommerfeldt, D. ve Rubin, C. (2001). Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *European Spine Journal*, 10(2), S86-S95.

Song, K., Li, L., Li, W., Zhu, Y., Jiao, Z., Lim, M., Fang, M., Shi, F., Wang, L. ve Liu, T. (2015). Three-dimensional dynamic fabrication of engineered cartilage based on chitosan/gelatin hybrid hydrogel scaffold in a spinner flask with a special designed steel frame. *Materials Science and Engineering: C*, 55, 384-392.

- Srinivasa Reddy, C., Reddy Venugopal, J., Ramakrishna, S. ve Zussman, E. (2014). Polycaprolactone/oligomer compound scaffolds for cardiac tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(10), 3713-3725.
- Stakleff, K. S., Lin, F., Callahan, L. A. S., Wade, M. B., Esterle, A., Miller, J., Graham, M. ve Becker, M. L. (2013). Resorbable, amino acid-based poly (ester urea) s crosslinked with osteogenic growth peptide with enhanced mechanical properties and bioactivity. *Acta Biomaterialia*, 9(2), 5132-5142.
- Stallard, C. P., Solar, P., Biederman, H. ve Dowling, D. P. (2016). Deposition of Non-Fouling PEO-Like Coatings Using a Low Temperature Atmospheric Pressure Plasma Jet. *Plasma Processes and Polymers*, 13(2), 241-252.
- Standard, A. (2013). Standard Guide for in vivo Evaluation of Osteoinductive Potential for Materials Containing Demineralized Bone (DBM). *Proceedings of the ASTM F2529*, 13.
- Stevens MM. (2008). Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Materials Today*. 11: 18-25.
- Tas, A.C., (2000). Combustion Synthesis of Calcium Phosphate Bioceramic Powders. *Journal of the European Ceramic Society*, 20:2389-2394.
- Tay, F. R. (2014). Bioactivity of mineral trioxide aggregate and mechanism of action. In *Mineral Trioxide Aggregate in Dentistry*, (pp. 61-85). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Teitelbaum, S. L. (2007). Osteoclasts: What do they do and how do they do it? *The American journal of pathology*, 170(2), 427-435.
- Teitelbaum, S. L., Abu-Amer, Y. ve Ross, F. P. (1995). Molecular mechanisms of bone resorption. *Journal of Cellular Biochemistry*, 59, 1–10.
- Temenoff, J. S., Lu, L. ve Mikos, A. G. (2000). Bone tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds. *Bone engineering*, 454.
- Thomas, M. V. ve Puleo, D. A. (2009). Calcium sulfate: Properties and clinical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 88(2), 597-610.
- Thrivikraman, G., Madras, G. ve Basu, B. (2014). In vitro/in vivo assessment and mechanisms of toxicity of bioceramic materials and its wear particulates. *RSC Advances*, 4(25), 12763-12781.
- Tidball, J. G. (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(2), R345-R353.
- Tiwari, S., Patil, R. ve Bahadur, P. (2019). Polysaccharide based scaffolds for soft tissue engineering applications. *Polymers*, 11(1), 1.
- Tomé, M., López-Romero, P., Albo, C., Sepúlveda, J. C., Fernández-Gutiérrez, B., Dopazo, A., Bernad, A. ve González, M. A. (2011). miR-335 orchestrates cell

proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death & Differentiation*, 18(6), 985-995.

Topaloğlu, U., Ketani, M. A. ve Saruhan, B. G. (2017). Kemik doku ve kemikleşme çeşitleri. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10(1), 62-71.

Toricelli, P., Fini, M., Giavaresi, G. ve Giardino, R. (2001). Bone tissue cultures: An in vitro model for the evaluation of bone defect healing after L-arginine and L-lysine administration. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 29(4), 325-334.

Toricelli, P., Fini, M., Giavaresi, G., Giardino, R., Gnudi, S., Nicolini, A. ve Carpi, A. (2002). L-arginine and L-lysine stimulation on cultured human osteoblasts. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56(10), 492-497.

Toworfe, G. K., Composto, R. J., Shapiro, I. M. ve Ducheyne, P. (2006). Nucleation and growth of calcium phosphate on amine-, carboxyl- and hydroxyl-silane self-assembled monolayers. *Biomaterials*, 27(4), 631-642.

Treccani, L., Klein, T. Y., Meder, F., Pardun, K. ve Rezwan, K. (2013). Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications. *Acta biomaterialia*, 9(7), 7115-7150.

Trippel, S. B. (1998). Potential role of insulinlike growth factors in fracture healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 355, S301-S313.

Ubaidus, S., Li, M., Sultana, S., De Freitas, P. H. L., Oda, K., Maeda, T., Takagi, R. ve Amizuka, N. (2009). FGF23 is mainly synthesized by osteocytes in the regularly distributed osteocytic lacunar canalicular system established after physiological bone remodeling. *Journal of electron microscopy*, 58(6), 381-392.

Uddin, M. H., Matsumoto, T., Ishihara, S., Nakahira, A., Okazaki, M. ve Sohmura, T. (2010). Apatite containing aspartic acid for selective protein loading. *Journal of dental research*, 89(5), 488-492.

Urban, R. M., Turner, T. M., Hall, D. J., Infanger, S. I., Cheema, N., Lim, T. H., Moseley, J., Carroll, M. ve Roark, M. (2004). Effects of altered crystalline structure and increased initial compressive strength of calcium sulfate bone graft substitute pellets on new bone formation. *Orthopedics*, 27(1), S113-S118.

Urist, M. R. (1965). Bone: Formation by autoinduction. *Science*, 150(3698), 893-899.

Vaananen, H. K., Zhao, H., Mulari, M. ve Halleen, J. M. (2000). The cell biology of osteoclast function. *Journal of Cell Science*, 113, 377-381.

Valerio, P., Pereira, M. M., Goes, A. M. ve Leite, M. F. (2004). The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*, 25(15), 2941-2948.

Vallet-Regí, M., Romero, E., Ragel, C. V. ve LeGeros, R. Z. (1999). XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of in vitro growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The*

Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials, 44(4), 416-421.

Vallet-Regí, M., ve Ruiz-Hernández, E. (2011). Bioceramics: From bone regeneration to cancer nanomedicine. *Advanced Materials*, 23(44), 5177-5218.

Van Luyn, M. J. A., Van Wachem, P. B., Olde Damink, L., Dijkstra, P. J., Feijen, J. ve Nieuwenhuis, P. (1992). Relations between in vitro cytotoxicity and crosslinked dermal sheep collagens. *Journal of biomedical materials research*, 26(8), 1091-1110.

Vats, A., Tolley, N. S., Polak, J. M. ve Gough, J. E. (2003). Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: A review of clinical applications. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, 28(3), 165-172.

Ventre, M., Causa, F. ve Netti, P. A. (2012). Determinants of cell-material crosstalk at the interface: Towards engineering of cell instructive materials. *Journal of the Royal Society Interface*, 9(74), 2017-2032.

Wang, S., Yang, Y., Zhao, Z., Wang, X., Mikos, A. G., Qiu, Z., Song, T., Sun, X., Zhao, L., Zhang, C. ve Cui, F. (2017). Mineralized collagen-based composite bone materials for cranial bone regeneration in developing sheep. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(6), 1092-1099.

Wang, S., Zhao, Z., Yang, Y., Mikos, A. G., Qiu, Z., Song, T., Cui, F., Wnag, X. ve Zhang, C. (2018). A high-strength mineralized collagen bone scaffold for large-sized cranial bone defect repair in sheep. *Regenerative Biomaterials*, 5(5), 283-292.

Wang, X. (2013). Overview on biocompatibilities of implantable biomaterials. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications in Biomedicine; Lazinica, R., Ed*, 111-155.

Wang, X., Ding, J., Feng, Y., Weng, L., Zhao, G., Xiang, J., Zhang, M. ve Xing, D., (2017). Targeting of growth factors in the treatment of hepatocellular carcinoma: The potentials of polysaccharides. *Oncology letters*, 13(3), pp.1509-1517.

Westhauser, F., Weis, C., Prokscha, M., Bittrich, L. A., Li, W., Xiao, K., Kineser, U., Kauczor, H.U., Schmidmaier, G., Boccaccini, A.R. ve Moghaddam, A. (2016). Three-dimensional polymer coated 45S5-type bioactive glass scaffolds seeded with human mesenchymal stem cells show bone formation in vivo. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(7), 1-7.

Wheeler, D. L. ve Enneking, W. F. (2005). Allograft bone decreases in strength in vivo over time. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 36-42

Wilson, L. D., Pratt, D. Y. ve Kozinski, J. A. (2013). Preparation and sorption studies of β -cyclodextrin-chitosan-glutaraldehyde terpolymers. *Journal of colloid and interface science*, 393, 271-277.

Woodruff, D. P. (2016). *Modern techniques of surface science*. Cambridge: Cambridge university press.

Wynyard, S., Nathu, D., Garkavenko, O., Denner, J. ve Elliott, R. (2014). Microbiological safety of the first clinical pig islet xenotransplantation trial in New Zealand. *Xenotransplantation*, 21(4), 309-323.

- Xue, C., Hu, N., Gu, Y., Yang, Y., Liu, Y., Liu, J., Ding, F. ve Gu, X. (2012). Joint use of a chitosan/PLGA scaffold and MSCs to bridge an extra large gap in dog sciatic nerve. *Neurorehabilitation and neural repair*, 26(1), 96-106.
- Yamaza, T., Goto, T., Kamiya, T., Kobayashi, Y., Sakai, H. ve Tanaka, T. (1998). Study of immunoelectron microscopic localization of cathepsin K in osteoclasts and other bone cells in the mouse femur. *Bone*, 23, 499-509.
- Yang, C., Hillas, P. J., Báez, J. A., Nokelainen, M., Balan, J., Tang, J., Spiro, R. ve Polarek, J. W. (2004). The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs*, 18(2), 103-119.
- Yang, G. J., Lin, M., Zhang, L. ve Gou, Z. R. (2013). Progress of calcium sulfate and inorganic composites for bone defect repair. *Journal of Inorganic Materials*, 28, 795-803.
- Yang, X., Ricciardi, B. F., Hernandez-Soria, A., Shi, Y., Camacho, N. P. ve Bostrom, M. P. (2007). Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone*, 41(6), 928-936.
- Yang, Y.J. ve Gellman, H. (2011). Histology of bone: Emedicine. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/1254517-overview>. Accessed February 20, 2011
- Yang, Z., Yuan, H., Tong, W., Zou, P., Chen, W. ve Zhang, X. (1996). Osteogenesis in extraskelally implanted porous calcium phosphate ceramics: Variability among different kinds of animals. *Biomaterials*, 17(22), 2131-2137.
- Yao, Q., Noeaid, P., Detsch, R., Roether, J. A., Dong, Y., Goudouri, O. M., Schubert, D.W. ve Boccaccini, A. R. (2014). Bioglass®/chitosan-polycaprolactone bilayered composite scaffolds intended for osteochondral tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(12), 4510-4518.
- Yavropoulou, M. P. ve Yovos, J. G. (2008). Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 8(3), 204-216.
- Ye, Q., Zhou, F. ve Liu, W. (2011). Bioinspired catecholic chemistry for surface modification. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 4244-4258.
- Yewle, J. N., Wei, Y., Puleo, D. A., Daunert, S. ve Bachas, L. G. (2012). Oriented immobilization of proteins on hydroxyapatite surface using bifunctional bisphosphonates as linkers. *Biomacromolecules*, 13(6), 1742-1749.
- Yin, F., Cai, J., Zen, W., Wei, Y., Zhou, W., Yuan, F., Singh, S.R. ve Wei, Y. (2015). Cartilage regeneration of adipose-derived stem cells in the TGF- β 1-immobilized PLGA-gelatin scaffold. *Stem cell reviews and reports*, 11(3), 453-459.
- Yoshida, H., Hayashi, S. I., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L.D. ve Nishikawa, S. I. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*, 345(6274), 442-444.

Yu, B., Han, K., Ma, H., Zhang, C., Su, J., Zhao, J., Li, J., Bai, Y. ve Tang, H. (2009). Treatment of tibial plateau fractures with high strength injectable calcium sulphate. *International orthopaedics*, 33(4), 1127-1133.

Yu, J., Lee, A. R., Lin, W. H., Lin, C. W., Wu, Y. K. ve Tsai, W. B. (2014). Electrospun PLGA fibers incorporated with functionalized biomolecules for cardiac tissue engineering. *Tissue Engineering Part A*, 20(13-14), 1896-1907.

Zelzer, E. ve Olsen, B. R. (2005). 6 multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. *Current topics in developmental biology*, 65, 170-188.

Zengin, E., Chalajour, F., Gehling, U. M., Ito, W. D., Treede, H., Lauke, H., Weil, J., Reichenspurner, H., Kilic, N. ve Ergün, S. (2006). Vascular wall resident progenitor cells: A source for postnatal vasculogenesis.

Zhang, M., Powers Jr, R. M. ve Wolfinbarger Jr, L. (1997). A quantitative assessment of osteoinductivity of human demineralized bone matrix. *Journal of periodontology*, 68(11), 1076-1084.

Zhang, Y., Huang, X., Duan, B., Wu, L., Li, S. ve Yuan, X. (2007). Preparation of electrospun chitosan/poly (vinyl alcohol) membranes. *Colloid and Polymer Science*, 285(8), 855-863.

Zhao, S., Zhang, J., Zhu, M., Zhang, Y., Liu, Z., Ma, Y., Zhu, Y. ve Zhang, C. (2015). Effects of functional groups on the structure, physicochemical and biological properties of mesoporous bioactive glass scaffolds. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(8), 1612-1623.

EKLER

EK.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı

	Toplantı Tarihi : 23.09.2021
	Toplantı Sayısı : 2021/69
	Karar No : 34

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

1) Projenin Başlığı:
Modifiye Bioglass: Sert Doku Mühendisliği açısından İn Vitro ve İn Vivo etkinlik değerlendirmesi.

2) Proje Yöneticisi:
Unvan, Adı, Soyadı : Prof. Dr. Siyami KARAHAN
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Fakülte/Enstitü
Üniversite/Kurum
Cep Telefonu
İş Telefonu
E-Mail Adresi
Yazışma Adresi
Yaşışhan / KIRIKKALE
Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası ☒var/ ☐yok
Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası yıl/sayı /

3) Yardımcı Araştırmacılar:

Sayı	Araştırmacının
1)	Unvanı, Adı ve Soyadı:Araş. Gör. Yasin ÖZKABADAYI Projedeki görevi:Araştırmacı Görev yeri: Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
2)	Unvanı, Adı ve Soyadı:Prof. Dr. Mustafa TÜRK Projedeki görevi:Danışman
3)	Unvanı, Adı ve Soyadı:Dr. Öğr. Üyesi Ali KUMANDAŞ Projedeki görevi:Araştırmacı

4) Proje Tarihleri:

Proje Başlangıç Tarihi : 15.10.2021
Proje Bitiş Tarihi : 15.05.2022
Proje Süresi : 7 Ay

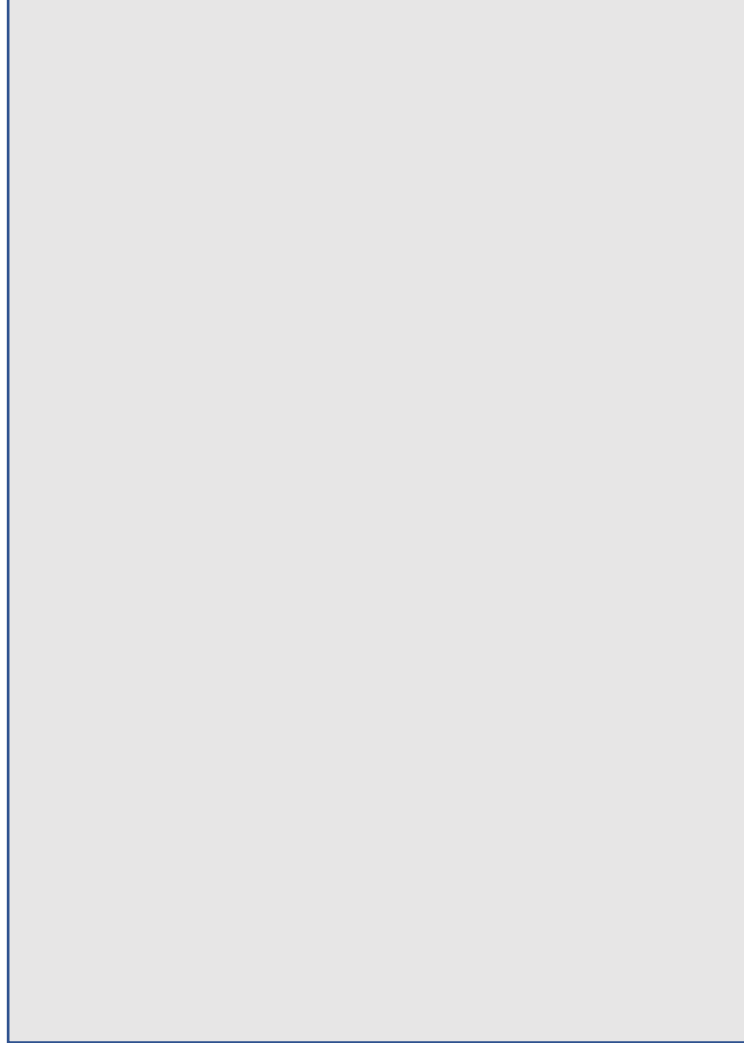
5) Hayvan Türü,ırkı, Sayısı, Cinsiyeti, Yaşı, Ağırlığı:

Tür	ırk	Sayı	Cinsiyet	Yaş	Ağırlığı
☒ Fare	Atimik çıplak	5	☒ E ☐ D		
☒ Sıçan	Wistar Albino	84	☒ E ☐ D	8-10 haftalık	300-350 gram
☒ Kobay	Guinea pig	4	☒ E ☒ D		300-500 gr
☒ Tavşan	Yeni Zellanda	12	☒ E ☒ D		2 kg
☒ Fare	BALB-C	40	☒ E ☒ D	8-12 haftalık	

6) Projenin Özeti

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanım alanı bulan bioglass, yapısında %45 SiO₂, %24,5 CaO, %25,5 Na₂O ve %6 P₂O₅ içeren bir malzemedir. Biyoglass üretiminde üretim tekniğine bağlı olarak karşılaşılan en önemli problem, bioglass'ın bioaktivitesinin korunmasıdır. Bu çalışmanın amacı modifiye teknik kullanarak bioglass üretmek ve üretilen Modifiye Bioglass'ın Sert doku mühendisliği açısından *İn vitro* ve *in vivo* değerlendirilmesidir. Bu amaçla modifiye olarak biyomateriyal üretildikten sonra karakterizasyon testleri yapılacaktır. Biyomateriyal üretiminde optimizasyon sağlandıktan sonra *in vitro* testlere başlanacaktır. *İn vitro* olarak biyomateriyale tutunan hücre morfolojilerinin taramalı elektron mikroskop görüntülemesi, hücre canlılığı için Calcein AM/Propidium iodide boyaması, apoptoz-nekroz için Annexin-V Fluos boyaması, kalsiyum birikimlerini göstermek için Alizarin Red S boyama, ALP aktivitesinin gösterilmesi, *in vitro* mikronükleus testi ile genotoksitenin gösterilmesi ve MTT ile *in vitro* sitotoksite gösterilecektir. *İn vitro* testleri takiben *in vivo* deneylere başlanacaktır. Bu amaçla sistemik toksisite testleri, osteoindüktif potansiyel testi, deri içi irritasyon testi, pirojenite testi, sensitizasyon testi ve ekstremitte performans testi yapılacaktır. *İn vivo* ve *in vitro* deneylerden elde edilen sonuçlar istatistik olarak değerlendirilecektir. Gruplardaki zamana göre değişimleri karşılaştırmak için tekrarlı ölçümlerde varyans analizi (Repeated measures ANOVA) uygulanacaktır.

KARAR: Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğr. Üyesi, Prof. Dr. Siyami KARAHAN'ın " **Modifiye Bioglass: Sert Doku Mühendisliği açısından İn Vitro ve İn Vivo etkinlik değerlendirmesi.** " isimli projesi, Kırıkkale Üniversitesi Hüseyin Aytemiz Deney Hayvanları Araştırma Ünitesinde yapılması şartı ile, Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu Yönergesinde belirtilmiş olan Etik İlkelerine uygun olduğuna karar verilmiştir.



Tarım ve Orman Bakanlığının 15.02.2014 tarihli Resmi Gazetede yayınlanarak yürürlüğe giren Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik hükümlerince karar alınmış olup ilgili yönetmelik hükümlerine uymayanlara ve yetkisi olmadığı halde hayvan deneyi yapanlara 5199 Hayvanları Koruma Kanununun 28 inci maddesinin birinci fıkrasının (f) bendi gereğince işlem uygulanır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yasin ÖZKABADAYI

Doğum Tarihi :

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu

Lisans : Kırıkkale Üniversitesi (2010-2016)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl/Yıllar : Kırıkkale Üniversitesi 2004- Devam ediyor

Yayınları (SCI, SCI Expanded)

KÜRÜM, A., KOCAMIŞ, H., Karahan, S., TÜRK, M. ve ÖZKABADAYI, Y. (2021). OVGPI Expression in BOEC and Oviduct: An Immunohistochemical and Immunocytochemical Study. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 27(2).

Araştırma Alanları : Hücre kültürü, histokimya
immunohistokimya.